



HAL
open science

Etude de la biosynthèse lipidique au cours de la différentiation kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée

Joudi Bakar

► **To cite this version:**

Joudi Bakar. Etude de la biosynthèse lipidique au cours de la différenciation kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF018 . tel-03656226

HAL Id: tel-03656226

<https://theses.hal.science/tel-03656226v1>

Submitted on 2 May 2022

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

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

Étude de la biosynthèse lipidique au cours de la différenciation
kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée

*Study of lipid biosynthesis during keratinocyte differentiation in relation
to the integrity of the cutaneous barrier function*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571, sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et
biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat: chimie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296,
Châtenay-Malabry, France.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay
le 22/04/2021, par**

Joudi BAKAR

Composition du Jury

Igor CHOURPA

Professeur, Université de Tours

Président

Carlo BICCHI

Professeur, Université de Turin

Rapporteur & Examineur

Franck BONNIER

Maître de conférences, HDR, Université de Tours

Rapporteur & Examineur

Ali TFAYLI

Professeur, Université Paris-Saclay

Examineur

Brigitte CLOSS

Docteure, Entreprise Silab

Examinatrice

Direction de la thèse

Arlette BAILLET-GUFFROY

Professeure, Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

Rime MICHAEL-JUBELI

Maîtresse de conférences, Université Paris-Saclay

Co- Directrice de thèse

Membres invités

Michel SALMON

Docteur, Entreprise StratiCELL

Membre invité

Sylvie BORDES

Chercheuse, Entreprise Silab

Membre invitée

Remerciements

Plus de quatre ans au sein de ce laboratoire, plus de quatre ans entourée par une équipe très aimable qui m'a soutenue tout au long de la réalisation de ma thèse. La clé de réussite de la thèse est de se trouver dans une ambiance de joie et de bienveillance. Bien que je sois depuis plus de 7 ans loin de ma famille, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes, qui sont pour moi ma deuxième famille

Je remercie Monsieur le **Pr. Carlo BICCHI**, Monsieur le **Dr. Franck BONNIER** d'avoir la lourde tâche de rapporter ce travail de recherche et de participer à mon jury de soutenance. Je remercie également Monsieur le **Pr. Igor CHOURPA** d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de thèse et le laboratoire que vous dirigez de nous avoir offert les cellules de kératinocytes de la lignée HaCaT.

Je remercie de tout mon cœur ma directrice de thèse Madame le **Pr. Arlette Baillet-Guffroy**. Madame, vous m'avez acceptée depuis mon stage de recherche en 2017 au sein de votre équipe. Vous m'avez fait confiance, vous m'avez encouragée à participer au concours ministériel de l'école doctorale. Aujourd'hui, je voudrais vous remercier et vous dire que cette thèse n'a jamais pu être réalisée sans votre présence, sans votre aide et votre soutien. Je ne peux pas oublier tous les beaux moments passés ensemble et surtout durant nos voyages annuels à Brive. Votre qualité scientifique, votre personnalité et votre sens de l'humanité, me permettent de vous exprimer mes mille mercis.

Madame le **Dr. Rime Michael-Jubeli**, mon encadrante scientifique, ma sœur, mon amie, mon idole, je n'ai pas de mots suffisants pour exprimer votre place dans ma vie. Rime, vous avez fait tous vos efforts pour que je décroche cette thèse, vous m'avez encouragée à postuler à l'aide de recherche de la fondation Silab Jean PAUFIQUE. Je ne peux pas oublier tout ce que vous avez fait pour moi et pour mener à bien ma thèse et surtout durant mon absence de congé de maternité. Le fruit de tous vos efforts m'a permis de soutenir aujourd'hui une belle thèse avec 3 prix. Dans la vie de chacun il y a des moments inoubliables, le jour où j'ai présenté mon travail pour la première fois devant l'entreprise Silab, j'ai senti directement à quel degré vous êtes proche de moi. Merci infiniment Rime, merci de votre confiance, merci pour vos compétences et aides scientifiques, merci de votre soutien durant chaque étape de cette thèse. Vous étiez et vous restez pour moi plus qu'une encadrante.

Je tiens à remercier de tout mon cœur Monsieur le **Pr Ali Tfayli**. Vous m'avez appris dès le premier jour comment je peux bien réussir durant cette thèse. Vos expériences et conseils scientifiques, la rapidité de vos réflexions à résoudre les petits et les gros problèmes rencontrés, aussi et sans aucun doute votre soutien tout au long de cette thèse, m'ont permis de soutenir aujourd'hui avec un gros bagage scientifique acquis. À part vos fortes compétences scientifiques, vous étiez et vous restez pour nous tous, la personne qui distribue de la joie et de la bonne humeur. Merci.

Madame le **Dr. Sana Tfaili**, je vous remercie pour vos conseils et votre aide scientifique et personnelle. Votre optimisme et vos mots adressés à moi tout au long de ma thèse m'ont encouragée fortement à traverser toutes les difficultés rencontrées. Sana votre bonjour de chaque matin va me manquer trop. Merci.

Mes remerciements s'adressent au Monsieur le **Pr. Pierre Chaminade**, directeur de laboratoire de chimie analytique pour m'avoir accueillie depuis l'année 2017 dans le laboratoire.

Je remercie évidemment la **Fondation Silab Jean PAUFIQUE**, pour son aide majeure, qui a permis de financer mes activités de recherche et de mener à bien cette thèse, particulièrement Madame le **Dr. Brigitte Closs** présidente de la fondation. Je vous remercie aussi pour votre chaleureux accueil annuel afin de vous présenter toutes nos activités scientifiques. Je remercie également Madame le **Dr. Laure Gibot** d'avoir suivi mon travail en tant que marraine pour la Fondation et Madame **Sylvie BORDES** pour sa compétence et ses conseils dans le domaine des modèles cellulaires *in vitro*.

Je remercie Monsieur **Dr. Michel Salmon**, pour votre contribution annuelle sur mes travaux de recherche dans le cadre du Comité de suivi de thèse. Je remercie également l'entreprise StratiCELL® que vous dirigez pour les échantillons biologiques offerts.

Je remercie mes collègues de laboratoire, **Ali, Aline, Rindala, Kodjo**, qui étaient autour de moi durant cette thèse. Nous avons passé des moments inoubliables. **Ali Assi** merci pour ta contribution à la réalisation de ce travail, ton expérience en chimie m'a beaucoup aidée.

Je remercie l'équipe biologique de Lip(sys)², Monsieur le **Pr. Jean-Louis Paul**, Madame le **Pr. Natalie Fournier**, Monsieur le **Dr Maxim Nowak** pour votre accueil. Merci **Hani Darkoub** pour ton aide.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe Lip(sys)², en particulier Madame le **Dr. Danielle Libong** pour votre expérience scientifique, Madame **Sonia Abreu**, Monsieur **Martin Souce**, Madame **Juliette Battet**.

Merci à la plateforme SAMM, Madame le **Dr. Audrey Solgady**, et Monsieur **Bastien Prost** pour votre accueil et vos conseils scientifiques.

Merci à mes proches amis, **Abdalla, Nadine, Diana, Afif**, et **Almar**.

Et finalement un grand merci à mon mari **Antoine**, tu m'a encouragée sans limite tout au long de cette thèse, ainsi que **ma famille** qui est loin en distance mais proche de mon cœur, ma sœur **Thérèse** et mes deux nièces, mon frère **Antony** et **mes parents (Georges et Jina)**, vous étiez tous à côté de moi dès le début de mon cursus professionnel.

Ce travail je le dédie à mon petit prince, mon fils **Pierre**. Peut-être je n'étais pas assez proche de toi tout le temps, j'ai essayé tout ce que je peux pour te rendre le bébé le plus heureux. Merci à toi mon bébé, je suis sûre que quand tu grandiras tu vas apprécier ce travail.

Résumé

La différenciation des kératinocytes s'accompagne de profondes modifications de la composition lipidique du contenu cellulaire pour former à la fin le ciment intercornéocytaire responsable de la fonction de la barrière cutanée. Les céramides forment la classe lipidique majeure de l'épiderme. Cette classe est très complexe, elle-même se divise en sous-classes qui diffèrent par leur microhétérogénéité structurale.

Le but de ce travail a été de développer une approche analytique permettant d'étudier la biosynthèse de ces lipides épidermiques au cours de la différenciation kératinocytaire. A ce sujet, deux techniques analytiques ont été utilisées : 1) La Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase normale couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution NP-HPLC/HR-MSⁿ. Une méthode a été développée afin de séparer les classes lipides de différente polarité en une seule analyse et de caractériser les structures fines des lipides et notamment la micro-hétérogénéité structurale des céramides. 2) La Microspectroscopie Raman qui offre des informations à l'échelle moléculaire et « tissulaire ». Les images spectrales en pseudo-couleurs ont la capacité de mieux suivre l'évolution des lipides au cours de la différenciation et de renseigner sur l'organisation lipidique du *Stratum Corneum*.

Trois modèles cellulaires ont été utilisés pour répondre aux objectifs fixés :

- Un modèle cellulaire en **2D** : pour le suivi de la différenciation dès les étapes précoces (couche basale). Ce modèle a permis de fournir des informations au niveau cellulaire par imagerie Raman. Il a également été utilisé pour mettre en place les premiers développements en NP-HPLC/HR-MSⁿ.
- Un modèle d'épiderme reconstruit humain (en **3D**) **sain**, mimant mieux l'environnement *in vivo* : pour le suivi de la différenciation à partir de *Stratum Granulosum* (SG) et jusqu'à la formation des multicouches de *Stratum Corneum* (SC). Ce modèle a permis de fournir des informations au niveau tissulaire (couches épidermiques) et de réaliser toute la caractérisation approfondie des céramides, en tenant compte de l'ensemble des micro-hétérogénéités structurales
- Un modèle d'épiderme reconstruit humain (en **3D**) **altéré** : pour illustrer l'adéquation de la méthode en NP-HPLC/HR-MSⁿ afin de mettre en évidence l'impact sur le profil lipidique d'un déficit enzymatique ciblé et d'appréhender l'effet potentiel d'une molécule active.

Les résultats majeurs obtenus à partir des travaux expérimentaux sont les suivants :

- Le développement d'outils analytiques pertinents dans l'élucidation de mélanges lipidiques complexes et leur évolution au niveau cellulaire ou tissulaire.
- L'application innovante de la Microspectroscopie Raman au niveau de la cellule de kératinocyte (modèle cellulaire en 2D) : plusieurs modifications moléculaires au sein de la cellule ont été observées et notamment entre les jours 9 et 13 de la différenciation indiquant le passage entre SG et SC.
- L'identification pour la première fois dans la littérature de deux nouvelles sous-classes de céramides (1-O-E (EO) Cer et A-1-O (EO) Cer) dans le modèle d'épiderme reconstruit humain sain mais également dans le SC humain, à partir des données fournies par la méthode développée en NP-HPLC/HR-MSⁿ.
- La mise en évidence d'une perturbation du profil lipidique sur un modèle d'épiderme reconstruit humain altéré.

L'ensemble de ces résultats a pu offrir une meilleure compréhension du métabolisme lipidique lors de la maturation des kératinocytes, de façon très détaillée au niveau moléculaire, qui permettrait d'appréhender de façon plus raisonnée les perturbations de la fonction barrière cutanée, physiologiques ou pathologiques.

Mots clés : Lipides, Céramides, Différenciation, Kératinocytes, Micro-hétérogénéité, NP-HPLC/HR-MSⁿ, Microspectroscopie Raman, Épiderme Reconstruit Humain.

Abstract

The keratinocytes differentiation is accompanied by profound modifications of the lipid composition of the cell contents to form at the terminal differentiation stage the intercorneocyte cement (lipid matrix) responsible for the skin barrier function. Ceramides are the major lipid class of the epidermis. This class is very complex, itself is divided into subclasses which differ in their structural micro-heterogeneity.

The aim of this work was to develop an analytical approach to study the biosynthesis of these epidermal lipids during keratinocyte differentiation. On this subject, two analytical techniques were used: 1) Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry NP-HPLC/HR-MSⁿ. A method has been developed in order to separate the lipid classes of different polarity in a one single run and to characterize the fine structures of lipids in particular the structural micro-heterogeneity of ceramides. 2) Raman Microspectroscopy, which provides information at levels of molecules and of tissues. Pseudo-color spectral images have the ability to better follow the evolution of lipids during differentiation and to provide information on the lipid organization of the *Stratum Corneum*.

Three cellular models were used to achieve our objectives:

- A 2D cell model: for monitoring the differentiation from the early stages (basal layer). This model made it possible to provide information at the cellular level by Raman imaging. It was also used to establish the first developments in NP-HPLC/HR-MSⁿ.
- A healthy 3D reconstructed human model of epidermis, better mimicking the environment *in vivo*: for monitoring differentiation from *Stratum Granulosum (SG)* and up to the formation of *Stratum Corneum (SC)* multilayers. This model allowed to provide information at the tissue level (epidermal layers). In addition, it is on this model that all the in-depth characterization of ceramides was carried out, taking into account all the structural heterogeneities.
- An altered 3D human reconstructed epidermis model: to illustrate the suitability of the NP-HPLC/HR-MSⁿ method in order to highlight the impact on the lipid profile of a targeted enzymatic deficit and to understand the potential effect of an active molecule

The major results obtained from the experimental work are as follows:

- The development of relevant analytical tools in the elucidation of complex lipid mixtures and their evolution at the cellular or tissue level.
- The innovative application of Raman Microspectroscopy at the level of the keratinocyte cell (2D cell model): several molecular modifications within the cell were observed and in particular between days 9 and 13 of differentiation indicating the passage between SG and SC.
- The identification for the first time in the literature of two new subclasses of ceramides (1-OE (EO) Cer and A-1-O (EO) Cer) in the healthy human reconstructed epidermis model but also in the human SC, from data provided by the developed method in NP-HPLC/HR-MSⁿ.
- Demonstration of a disruption of the lipid profile on an altered reconstructed human epidermis model.

All of these results have been able to provide a better understanding of lipid metabolism during keratinocyte maturation, in very detail at the molecular level, which would allow a more reasoned understanding of the physiological or pathological disturbances of the skin barrier function.

Key words: Lipids, Ceramides, Differentiation, Keratinocytes, Micro-heterogeneity, NP-HPLC/HR-MSⁿ, Raman Microspectroscopy, Reconstructed Human Epidermis.

Liste des abréviations

2D : Deux Dimensions

3D : Trois Dimensions

Cers : Céramides

CHOL : Cholestérol

FFAs : Acides Gras Libres

GlcCers : GlucosylCéramides

HaCaT : lignée cellulaire de kératinocytes humains immortalisés spontanément

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

HR-MS : Spectrométrie de Masse à Haute Résolution

Lbs : Corps Lamellaires

LD : Gouttelettes Lipidiques

NP-HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Normale

PL : Phospholipides

RE : Réticulum Endoplasmique

RHE : Epiderme Reconstituit Humain

SB : *Stratum Basale*

SC : *Stratum Corneum*

SG : *Stratum Granulosum*

Sms : Sphingomyélines

SS : *Stratum Spinosum*

VLC : Très Longue Chaîne hydrocarbonée

ULC : Ultra Longue Chaîne hydrocarbonée

Sommaire

Introduction générale	11
Étude bibliographique	14
CHAPITRE 1 : Physiologie cutanée	15
1.1 Structure de la peau humaine	16
1.2 Différenciation des kératinocytes	18
1.3 Différenciation <i>in vitro</i> : comparaison entre les modèles cellulaires utilisés (2D, 3D)	22
1.4 Grandes classes de lipides épidermiques	27
1.5 Fonction de la barrière épidermique : rôle des céramides	33
CHAPITRE 2 : Classe de céramides	34
2.1 Micro-hétérogénéité structurale des céramides (sous-classes de Céramides)	35
2.2 Biosynthèse des céramides au cours de la différenciation des kératinocytes	40
CHAPITRE 3 : Méthodes d'analyse des lipides épidermiques	47
3.1 Séparation chromatographique des lipides épidermiques	48
3.2 Analyse par spectroscopie vibrationnelle	58
Travaux expérimentaux	70
CHAPITRE 4 : Développement de méthodes analytiques sur le modèle cellulaire en 2D : Lignée cellulaire (HaCaT)	72
4.1 Culture cellulaire en 2D et induction de la différenciation <i>in vitro</i>	73
4.2 Développement et optimisation de la méthode d'analyse des lipides en NP-HPLC/HR-MS ⁿ	74
4.3 Optimisation des analyses spectrales en microspectroscopie Raman sur un modèle en 2D	82
Article 1: Biomolecular modifications during the keratinocytes differentiation: Raman spectroscopy and chromatographic techniques	85
CHAPITRE 5 : Développement de méthodes analytiques sur un modèle cellulaire en 3D : Épiderme Reconstruit Humain (RHE)	110
Article 2: Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in Reconstructed Human Epidermis using NPLC/HR-MS ⁿ : 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass	115
Article 3: <i>Stratum Corneum</i> lipid profiles, <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> and <i>in vivo</i> : Characterization of the α -hydroxy double esterified ceramides	134

Article 4: Assessment of the skin barrier function in Reconstructed Human Epidermis using a multimodal approach at molecular, tissue and functional levels	157
CHAPITRE 6 : Application à l'analyse d'un modèle d'Épiderme Reconstituit Humain (RHE) altéré de type atopique et étude de preuve de concept d'un actif « correcteur »	181
6.1 Définition de la dermatite atopique (AD)	182
6.2 Physiopathologie de l'AD	182
6.3 Perturbation de la biosynthèse des lipides dans l'AD et impact des cytokines Th2	183
6.4 Modèles cellulaires 3D mimant l'épiderme atopique	188
Article 5: Th2 cytokines impact on ceramide sub-classes in Reconstructed Human Epidermis models	191
Conclusion générale	214
Perspectives	218
Présentation de la soutenance de thèse	220
Productions scientifiques	238

Liste des figures

FIGURE 1-1 : Biomarqueurs du processus de la différenciation des kératinocytes de la couche basale jusqu'à la couche cornée	20
FIGURE 1-2 : Contribution de chaque classe lipidique dans la formation du ciment intercornéocytaire	30
FIGURE 2-1 : Céramides dans l'épiderme humain	38
FIGURE 2-2 : Distribution des sous-classes de céramides dans le SC humain	39
FIGURE 2-3 : Biosynthèse des VLC et ULC d'acides gras	41
FIGURE 2-4 : Biosynthèse des bases sphingoides au niveau du RE	42
FIGURE 2-5 : Biosynthèse des glucosylcéramides et sphingomyélines au niveau de l'appareil de Golgi	43
FIGURE 2-6 : Génération des céramides (cornés) à partir de leur précurseurs GlcCers et Sms	45
FIGURE 2-7 : Schéma résumé de l'évolution de la biosynthèse des céramides au cours de la différenciation kératinocytaire	46
FIGURE 3-1 : Schéma général d'application des sources ionisation (APPI, APCI, ESI) pour l'analyse des petites molécules en fonction de leur polarité et leur masse moléculaire	53
FIGURE 3-2 : Schéma simplifié d'une source APPI	53
FIGURE 3-3 : Schéma de l'instrument LTQ-Velos Pro combiné avec l'Orbitrap	55
FIGURE 3-4 : Schéma du détecteur Corona (CAD)®	57
FIGURE 3-5 : Trois types de diffusion du rayon incident	59
FIGURE 4-1 : Profil du gradient d'éluion optimisé	76
FIGURE 4-2 : Chromatogramme obtenu à partir de l'analyse de standards analytiques couvrant l'ensemble des classes lipidiques de différentes polarités	77
FIGURE 4-3 : Chromatogramme obtenu à partir de l'analyse des lipides extraits de la culture cellulaire des kératinocytes HaCaT en 2D	78
FIGURE 6-1 : Profils de céramides comparés entre la peau saine et la peau atopique (zones affectée et non-affectée)	184
FIGURE 6-2 : Enzymes impliquées dans la biosynthèse des céramides épidermiques	187

Liste des tableaux

TABLEAU 1-1 : Comparaison entre les modèles de culture cellulaire en 2D et 3D.....	23
TABLEAU 1-2 : Formules chimiques des différentes classes de lipides épidermiques.	31
TABLEAU 2-1 : Nomenclature des sous-classes des céramides selon Motta et al	37
TABLEAU 4-1 : Intensité des signaux liés aux ions issus de la fragmentation moléculaire en fonction de la source d'ionisation.....	79
TABLEAU 4-2 : Ions majoritaires issus de l'ionisation des standards analytiques en modes APPI positif et négatif.....	80
TABLEAU 4-3 : Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses en microspectroscopie Raman sur le modèle cellulaire en 2D	83
TABLEAU 5-1 : Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses en microspectroscopie Raman sur le modèle cellulaire en 3D	113
TABLEAU 6-1 : Modifications de la composition et l'organisation des lipides du SC dans la peau atopique	185

Introduction générale

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau, il assure la fonction de la barrière cutanée. Il joue un rôle essentiel pour maintenir l'hydratation cutanée et protège notre organisme contre les infections et agressions extérieures.

L'épiderme lui-même est composé de plusieurs couches : la couche basale (première couche après le derme), la couche épineuse, la couche granuleuse et finalement la couche cornée (la plus externe). L'épiderme est capable de se renouveler continuellement à partir de la couche basale et jusqu'à la formation de la couche cornée et la desquamation (perte des couches superficielles de l'épiderme). Cet auto-renouvellement est assuré par le processus de la différenciation. En effet, au cours de la différenciation, c'est à dire au cours de passage de la couche basale vers la couche cornée, les cellules épidermiques (les kératinocytes) subissent plusieurs modifications aux niveaux de la morphologie cellulaire, de l'expression des gènes et des contenus protéique et lipidique. Ces trois types de modifications sont considérés comme des biomarqueurs des étapes de la différenciation qui permettent de distinguer une couche épidermique d'une autre.

Dans cette thèse, notre centre d'intérêt a été principalement de mettre en place des outils analytiques afin de suivre les modifications lipidiques survenues au cours de la différenciation kératinocytaire et d'illustrer leur pertinence dans ce domaine biologique.

En effet, la fonction de la barrière cutanée est située au niveau de la couche cornée (SC). Cette dernière est composée des cornéocytes entourés par un ciment lipidique qui joue un rôle clé dans l'efficacité d'une barrière cutanée saine. Ce ciment intercornéocytaire est composé surtout de céramides (~ 50%), d'acides gras libres et de cholestérol. La classe des céramides a attiré le plus d'attention de par sa complexité ; les recherches bibliographiques ont montré son rôle essentiel pour maintenir la qualité de la barrière cutanée.

La classe des céramides est très complexe, elle-même est divisée en plusieurs sous-classes qui diffèrent par leur micro-hétérogénéité structurale due à la longueur de(s) chaîne(s) alkyle(s), au nombre de fonctions hydroxyle, au degré d'insaturation et à l'isomérisation. Dans les maladies cutanées telles que l'atopie, des perturbations survenues au niveau des sous-classes de céramides ont été observées. Au vu de l'importance des lipides en général et des céramides en particulier, ce travail de recherche est ciblé sur l'étude de l'évolution des lipides au cours des étapes successives de la différenciation des kératinocytes. Cet objectif

nécessite de développer et d'utiliser des méthodes analytiques performantes capables de suivre, sous des angles d'approche différents, les modifications à l'échelle moléculaire induites par ce phénomène physiologique. Deux méthodes analytiques ont été sélectionnées pour réaliser notre objectif : 1) la Chromatographie Liquide à Haute Performance à polarité de Phases Normale (NP-HPLC) couplée simultanément au Détecteur d'Aérosols Chargés (Corona- CAD) et à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (HR-MSⁿ) et 2) et la microspectroscopie Raman.

Les travaux expérimentaux réalisés durant cette thèse sont composés de 3 parties :

- 1- Une première démarche, prérequis avant tout développement, est le choix du modèle cellulaire qui peut répondre à nos besoins. En effet les cultures en 2D telle que la lignée cellulaire HaCaT ont permis d'avoir des résultats préliminaires concernant les modifications biomoléculaires survenues au cours de la différenciation au niveau d'une cellule unique (en utilisant la microspectroscopie Raman), ce qui n'est pas réalisable en utilisant les modèles en 3D tels que l'épiderme reconstruit qui se compose de plusieurs couches (information au niveau des couches épidermiques). Les recherches bibliographiques ont montré la capacité des cellules HaCaT à se différencier préalablement *in vitro* vers des cellules de la couche basale. Ainsi, le suivi de la différenciation ultérieure de ces cellules et de l'évolution de leur contenu lipidique est possible dès les étapes précoces de la différenciation. Par contre, les modèles 3D sont commercialisés à partir du 12^{ème} jour de la différenciation pour lequel le SC a déjà commencé à s'installer. De plus, les modèles cellulaires en 2D, beaucoup moins coûteux que les modèles cellulaires en 3D, permettent de mettre en place les premiers développements analytiques et certaines optimisations dans les protocoles expérimentaux. Malgré la facilité d'utilisation des cellules HaCaT et leur capacité à se différencier au moins partiellement *in vitro*, ce modèle cellulaire en 2D ne mime pas l'environnement biologique *in vivo* comme les modèles cellulaires en 3D.
- 2- Le passage aux modèles 3D (Épiderme Reconstruit Humain (RHE)) semble évident à cette étape et surtout après la mise en place de nos protocoles analytiques (particulièrement chromatographique) qui ont nécessité un nombre important d'échantillons avant d'adopter le protocole final. Sur ces modèles 3D, la caractérisation des lipides a été particulièrement approfondie en développant une méthodologie qui permet de caractériser les structures fines des lipides et plus particulièrement de distinguer l'ensemble de la micro-hétérogénéité structurale au sein des différentes sous-classes de céramides. En parallèle, la microspectroscopie Raman peut fournir des informations moléculaires au niveau de chaque couche épidermique et permet aussi d'étudier l'organisation des lipides au sein de la couche cornée.

- 3- Enfin, dans le but d'apporter une contribution sur l'intérêt des modèles d'Épiderme Humain Reconstituit en substitution des tests sur animaux dans les études de preuve de concept d'efficacité, nous nous sommes intéressés à appliquer une molécule « active » sur un modèle de RHE malade mimant la dermatite atopique. Le but de cette étude est, d'une part, de voir l'impact de la maladie atopique sur la biosynthèse des lipides épidermiques, d'autre part, de mettre en évidence l'aptitude de cette nouvelle molécule à restaurer le taux et la composition des lipides, perturbés dans la maladie atopique.

Étude bibliographique

CHAPITRE 1

Physiologie cutanée

1.1-Structure de la peau humaine

La peau humaine est l'organe le plus vaste de notre organisme, c'est l'enveloppe de notre corps qui couvre environ une surface de 2 m² chez l'homme adulte. La peau est considérée comme un organe complexe divisé en trois compartiments : l'hypoderme (couche profonde), le derme (couche intermédiaire) et l'épiderme (couche superficielle) ^{9,10}.

L'hypoderme : l'hypoderme est un tissu grasseux vascularisé contenant des adipocytes qui stockent les lipides, il sert de protection thermique et mécanique ¹¹.

Le derme : le derme est un tissu dense et fibro-élastique, constitué de cellules et d'une matrice extracellulaire. Les fibroblastes représentent la population majoritaire des cellules dermiques et les autres types cellulaires sont : cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques ou autres cellules immunitaires. Un réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs traverse le derme afin de mettre en relation la peau avec le reste de l'organisme ^{11,12}.

L'épiderme : l'épiderme est la couche la plus externe de la peau. Il assure le contact avec l'environnement extérieur, son épaisseur varie selon la localisation anatomique environ de 75 à 150 µm et peut atteindre 600 à 700 µm à la plante des pieds et à la paume des mains ^{4,13}. Ce compartiment est pluristratifié, kératinisé, squameux mais non vascularisé. L'épiderme est composé de quatre différents types de cellules ¹² :

-Les Kératinocytes : qui représentent 80% des cellules épidermiques, qui contiennent différents types de kératines et de lipides ¹¹. Ce type cellulaire est présent dans les différentes couches de l'épiderme. Les kératinocytes se différencient tout au long de leur migration à partir de la couche basale et jusqu'à la formation de la couche cornée (surface de la peau). Ils contribuent avec les mélanocytes dans le processus de la mélanogénèse.

-Les Mélanocytes : qui sont présents seulement dans la couche basale de l'épiderme, ils produisent la mélanine qui est responsable de la pigmentation de la peau ¹¹.

-Les cellules de Langerhans : qui participent au système immunitaire.

-Les cellules Merkel : qui sont responsables de la sensation ¹⁴.

L'épiderme humain est composé de plusieurs couches :

-La couche basale (*Stratum Basale*) : c'est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est composée de cellules de forme cubique ou prismatique qui se rangent entre elles pour former une seule couche cellulaire. Ces cellules sont attachées par des jonctions hémidesmosomes avec une membrane basale qui sépare le derme et l'épiderme. La couche basale est considérée comme une couche de prolifération, car elle permet le renouvellement cellulaire qui donne naissance aux kératinocytes des couches plus superficielles. Cette fonction de renouvellement cellulaire est cruciale pour compenser la desquamation ^{11, 15}.

-La couche épineuse (*Stratum Spinosum*) : c'est la première couche suprabasale, dont les cellules s'attachent entre elles par des desmosomes et s'organisent d'une manière permettant la formation de plusieurs couches. Les cellules de la couche inférieure sont de forme polygonale qui s'aplatit dans la couche supérieure ¹¹. Cette modification de la morphologie cellulaire est due au processus de la différenciation.

-La couche granuleuse (*Stratum Granulosum*) : les cellules de cette couche s'aplatissent et s'organisent entre elles pour former de 1 à 5 couches ¹². Ces cellules contiennent des grains de kératohyaline riches en protéines et des granules lamellaires riches en lipides. Cette couche participe à la formation du ciment intercornéocytaire de la couche cornée ¹¹.

-La couche cornée (*Stratum Corneum*) : cette couche est la plus externe de l'épiderme, qui se trouve en contact direct avec l'environnement extérieur. Les cellules de cette couche sont des cornéocytes très aplatis, riches en kératines et qui s'organisent sous forme de 15-20 couches ¹². Ces cellules ont perdu leur noyau et leurs organelles cytoplasmiques, pour cela elles sont considérées comme des cellules mortes ¹¹. Les cornéocytes sont intégrés dans un ciment intercornéocytaire riche en lipides qui joue un rôle très important dans la fonction de la barrière cutanée ¹⁵. Le SC lui-même est divisé en deux parties : la partie la plus profonde est le *Stratum Compactum* qui se situe directement au-dessus de la couche granuleuse, dont les cellules sont attachées entre elles grâce aux cornéodesmosomes, la partie supérieure est le *Stratum Disjunctum*, au sein duquel les cornéocytes perdent les liaisons entre eux, ce qui conduit au processus de la desquamation ¹⁶.

1.2-Différenciation des kératinocytes

L'épiderme a une capacité de se renouveler d'une façon continue afin de compenser l'étape de la desquamation. Cette fonction est assurée par le processus de la différenciation. Les cellules de la couche basale, sont des cellules indifférenciées, à haut potentiel de prolifération et capables de s'auto renouveler et de générer des cellules filles. À chaque division cellulaire, les kératinocytes migrent verticalement et entrent en différenciation progressive jusqu'à la dernière couche épidermique (la couche cornée)^{5, 17, 18, 19}. La différenciation des kératinocytes et le passage de la couche basale vers les couches supérieures jusqu'à la couche cornée prend environ 28 à 30 jours^{4, 14}. Au cours de la différenciation, les kératinocytes subissent plusieurs modifications au niveau : de leur morphologie, l'expression des gènes et leur composition protéique et lipidique. Ces modifications peuvent être considérées comme des biomarqueurs de chaque étape de la différenciation.

Les cellules de la couche basale se caractérisent par une forme cellulaire cubique et par un noyau volumineux. Ces cellules expriment les kératines 5 et 14 (K5, K14) qui sont des marqueurs spécifiques de la couche basale¹⁷. Cependant dans les couches suprabasales, les cellules expriment les kératines 1 et 10 (K1, K10) qui remplacent les K5 et K14 de la couche basale^{11, 20}.

La couche épineuse, elle-même composée de plusieurs couches cellulaires, présentent des cellules de différents types morphologiques selon leur localisation (décrit précédemment). Au plus profond, les cellules sont plus volumineuses et s'aplatissent progressivement en traversant les différentes couches cellulaires épineuses^{21, 22, 23}. L'involucrine, est une protéine considérée comme l'une des précurseurs de l'enveloppe cornée. Elle est retrouvée dans les cellules de la couche épineuse.

La couche granuleuse peut être distinguée par plusieurs éléments. Les cellules de cette couche sont les dernières cellules nucléées avant d'atteindre la couche cornée. Cette couche est connue par la présence des granules de kératohyaline qui sont riches en protéines telles que la profilaggrine et la loricine et aussi par la présence des corps lamellaires (Lbs)¹¹. Ces corps sont des organites essentiels durant la biosynthèse lipidique et ils sont caractéristiques de la couche granuleuse. Certaines études ont montré que ces corps se trouvent même dans les kératinocytes des couches précoces mais leur nombre augmente dans la couche granuleuse⁷. Les Lbs sont riches en sphingolipides (particulièrement les glucosylcéramides et les sphingomyélines), mais aussi en phospholipides et en cholestérols³. Ces corps jouent un rôle clé pour former le ciment intercornéocytaire responsable de la fonction barrière cutanée^{5, 24}.

Durant le passage de la couche granuleuse vers la couche cornée, les granules de kératohyaline se dissolvent, les microfibrilles de kératines s'accumulent, le noyau et les organites cytoplasmiques disparaissent

pour donner les cornéocytes ¹⁸. Ce passage de la couche granuleuse vers la couche cornée s'accompagne de modifications du contenu cellulaire lipidique : 1) déplétion des phospholipides et enrichissement en lipides neutres, 2) génération et rétention de grandes quantités de sphingolipides, 3) enrichissement des sphingolipides composés de longues chaînes hydrocarbonées ²⁵.

Les cornéocytes de la couche cornée sont entourés par le ciment intercornéocytaire composé principalement de céramides, acides gras et cholestérols ^{10, 16}. (Les biomarqueurs lipidiques au cours de la différenciation seront expliqués en détail ultérieurement dans le paragraphe : Biosynthèse des céramides au cours de la différenciation des kératinocytes, page 40).

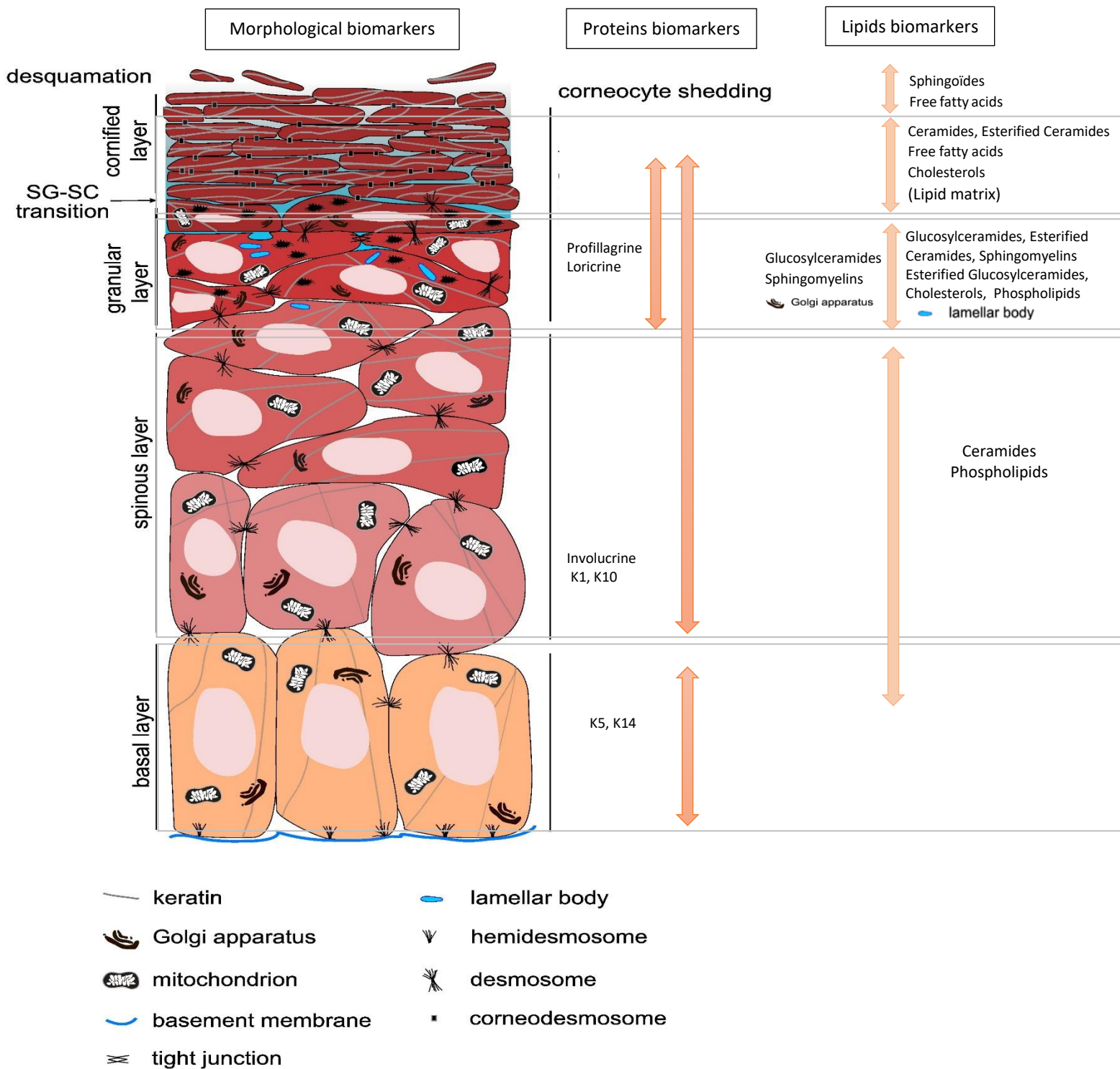


FIGURE 1-1 : Biomarqueurs du processus de la différenciation des kératinocytes de la couche basale jusqu'à la couche cornée.

Cette figure est reprise d'Echkar et al ⁵ et modifiée.

En parallèle de la représentation de l'évolution morphologique et du contenu protéique des cellules de kératinocytes, la Figure1-1, représente les modifications lipidiques qui interviennent au cours de la différenciation depuis la couche basale jusqu'à la couche cornée ^{2,4,5,7}.

Les phospholipides sont les composants principaux de la membrane cellulaire des kératinocytes. Ces phospholipides disparaissent dans les dernières étapes de la différenciation au niveau de la couche cornée ^{8, 9}. La biosynthèse des céramides au niveau du Reticulum Endoplasmique (RE) est initiée à partir des étapes précoces de la différenciation. Les céramides formés sont soumis à des modifications au niveau de l'appareil de Golgi : ils sont glycosylés pour donner des glucosylcéramides et phosphorylés pour donner des sphingomyélines. Les corps lamellaires sont caractéristiques de la couche granuleuse. Dans ces corps, sont stockés les glucosylcéramides, les sphingomyélines, les phospholipides et les cholestérols. Par ailleurs, certains glucosylcéramides et céramides y sont estérifiés. À l'interface de SG et SC les corps lamellaires vont libérer leur contenu lipidique. Les glucosylcéramides, les glucosylcéramides estérifiés et les sphingomyélines vont régénérer les céramides qui participent avec les cholestérols et les acides gras libres à la formation du ciment intercornéocytaire. Dans la partie haute du SC les céramides sont hydrolysés pour donner des acides gras libres et des bases sphingoïdes.

1.3-Différenciation *in vitro*: comparaison entre les modèles cellulaires utilisés (2D, 3D)

La mise en œuvre du 7^{ème} amendement européen à la directive sur les cosmétiques (76/768/ CEE) a interdit les tests sur les animaux. Depuis mars 2013, il n'est plus autorisé dans l'Union Européenne d'effectuer des tests sur les animaux pour les cosmétiques, ainsi les chercheurs doivent remplacer ces tests par l'utilisation de méthodes alternatives ²⁶. Les modèles de culture cellulaire *in vitro* sont largement utilisés en recherche et proposés comme méthodes alternatives. Premièrement, les cultures cellulaires bidimensionnelle (2D) : il s'agit de monocouches de cellules, cultivées sur des substrats plats et rigides. Ce modèle classique est largement utilisé et il a montré certains avantages mais aussi des inconvénients, notamment ce type de modèle ne reflète pas le vrai environnement biologique. Deuxièmement, les cultures cutanées tridimensionnelles (3D) : cultivées sur des matrices, elles ont été décrites comme des modèles particulièrement intéressants pour la recherche ²⁶. Un tableau comparatif entre les deux modèles est présenté ci-dessous (Tableau 1-1).

TABLEAU 1-1 : Comparaison entre les modèles de culture cellulaire en 2D et 3D.

	Comparaison entre les modèles de culture cellulaire en 2D et 3D	
	Les modèles de culture en 2D	Les modèles de culture en 3D
Approche Biologique	<ul style="list-style-type: none"> - Les cellules se développent sous forme de monocouches bidimensionnelles. - Certaines cellules en monocouches ont la capacité de se différencier et de former des multicouches ²⁷, mais sans former un épiderme entièrement stratifié ²⁸. - Ces modèles ne reproduisent pas la complexité du microenvironnement <i>in vivo</i> ³⁸. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les cellules se développent dans un microenvironnement en trois dimensions. - Les cellules en 3D présentent un degré plus élevé de différenciation morphologique et fonctionnelle ce qui est similaire aux caractéristiques des cellules <i>in vivo</i>. - Ces modèles reproduisent plus fidèlement les microenvironnements, les interactions entre cellules et les processus biologiques qui se produisent <i>in vivo</i> ³⁸. - Ces modèles comblent le fossé entre les cultures de cellules 2D et les modèles animaux <i>in vivo</i>.
Faisabilité, approche technique	<ul style="list-style-type: none"> - Ces modèles sont simples, rapides et reproductibles ^{27, 28}. Ils constituent les modèles les plus utilisés pour réaliser des tests <i>in vitro</i> ³⁸. - La validation de certains protocoles analytiques peut être réalisée sur ces modèles et permettre l'obtention de résultats préliminaires avant de travailler sur des modèles 3D très coûteux. - La capacité d'avoir des informations biomoléculaires au niveau d'une cellule unique est possible en utilisant la microspectroscopie Raman. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ces modèles sont complexes, mais les conditions physiologiques sont plus pertinentes que les tests biochimiques et les cultures cellulaires classiques (2D). - La capacité d'avoir des informations biomoléculaires n'est accessible par microspectroscopie Raman qu'au niveau tissulaire.
Approche Économique	<ul style="list-style-type: none"> - Moins coûteux. 	<ul style="list-style-type: none"> - Plus onéreux.

Afin de suivre la différenciation des kératinocytes *in vitro*, plusieurs modèles cellulaires (2D et 3D) ont été utilisés. Depuis plusieurs années, Rheinwald et Green, ont utilisé la culture monocouche (2D) de kératinocytes humains sur des plaques de culture en plastique. Ce modèle a été la principale technique pour étudier la biologie et la physiopathologie cutanées *in vitro*. Ces chercheurs ont également été les premiers à décrire que de telles cultures monocouches peuvent se différencier et former des structures multicouches^{27,28}. Généralement les cellules utilisées en 2D pour suivre le processus de la différenciation sont, soit des cellules primaires isolées à partir des donneurs (NHK)^{29,30}, soit des cellules immortalisées comme les HaCaT. Chacune de ces lignées cellulaires présente des avantages mais aussi des inconvénients qui vont être décrits ultérieurement.

Afin de reproduire les interactions cellulaires et mimer le plus possible le microenvironnement biologique, il faut utiliser les modèles cellulaires en 3D. Plusieurs modèles de peaux reconstruites ou d'épidermes reconstruits en 3D ont été développés, «in house» modèles (développés au sein d'un laboratoire pour ses propres recherches) et modèles commercialisés en respectant des guidelines nationaux et internationaux³¹. Parmi ces modèles commercialisés on trouve : EpiCS® (CellSystems, Allemagne), Epiderm™ (MatTek, USA), EpiSkin® (L'Oréal, France), et RHE StratiCELL® (Belgique)²⁸. En général, les cellules utilisées pour former le modèle cellulaire reconstruit en 3D sont des cellules primaires (NHK) qui ont une capacité élevée à se différencier *in vitro* d'une manière comparable avec l'épiderme *in vivo*²⁶. D'autres modèles sont élaboré à partir des cellules immortalisées comme les lignées HaCaT^{32,33} et N-TERT^{34*}.

Les modèles cellulaires utilisés au cours de cette thèse afin d'étudier la biosynthèse des lipides durant la différenciation kératinocytaire *in vitro* sont :

- **La lignée cellulaire HaCaT (Human keratinocyte cell line) en 2D**

Les kératinocytes humains (NHK) sont des cellules primaires isolées à partir de donneurs. Une fois cultivées *in vitro* et sous certaines conditions, ces cellules ont montré une grande capacité de se différencier et former les différentes couches de l'épiderme. Malheureusement, les cellules primaires ont deux inconvénients majeurs. Premièrement, elles ont besoin de facteurs de croissance supplémentaires pour survivre *in vitro*, et deuxièmement, une fois induites pour la différenciation, elles meurent rapidement et ne permettent pas une étude à long terme des signaux de différenciation²⁰.

*N-TERT : cellules immortalisés générées par transduction de kératinocytes primaires humains avec le gène de la télomérase inverse transcriptase (hTERT)³⁴.

La lignée cellulaire humaine naturellement immortalisée HaCaT peut être cultivée dans des milieux traditionnels et peut être maintenue en culture pendant de longues périodes (2 semaines)²⁰. Certaines études ont montré que cette lignée a une capacité faible de se différencier, cependant, d'autres études ont montré que les cellules HaCaT présentent les principaux marqueurs protéiques montrant qu'elles sont capables de se différencier, formant ainsi une structure épidermique stratifiée et même un épiderme lorsqu'elles sont transplantées chez des souris^{13, 35, 36}. Afin de réaliser notre objectif principal d'analyser les lipides tout au long de la différenciation des kératinocytes, nous avons choisi la lignée HaCaT pour plusieurs raisons : pas besoin d'accès aux donneurs, facile à manipuler, maintenance pour une longue période *in vitro* et une capacité de division non limitée. Ceci nous permettra de suivre la différenciation étape par étape en développant nos protocoles analytiques avant de passer vers les modèles cellulaires en 3D plus onéreux.

- **L'Épiderme Humain Reconstitué en 3D (RHE) des laboratoires EpiSkin®**

Le modèle cellulaire en 3D utilisé durant ces travaux est celui de l'épiderme humain reconstitué des laboratoires EpiSkin®. C'est un modèle tridimensionnel (3D) de kératinocytes épidermiques normaux d'origine humaine, cultivés pour former un modèle multicouche hautement différencié de l'épiderme. Il se compose des couches basale, épineuse et granuleuse organisées ainsi que d'une couche cornée contenant des lipides lamellaires intercellulaires représentant les classes principales de lipides comparables à celles trouvées *in vivo*. Ce modèle a été obtenu par culture de cellules kératinocytes humaines non transformées, sur collagène et sous des conditions permettant d'atteindre la différenciation terminale des kératinocytes. Le RHE EpiSkin® est un modèle conforme à la norme de qualité ISO 9001, assurant la traçabilité et la reproductibilité des tissus épidermiques. La viabilité et la morphologie cellulaire, ainsi la fonction de barrière cutanée sont assurées à chaque production³⁷.

- **L'Épiderme Reconstitué Humain en 3D (RHE) des laboratoires StratiCELL®**

Un autre modèle de RHE, fourni par les laboratoires StratiCELL®, a été également utilisé durant cette thèse. C'est un modèle tridimensionnel (3D) de kératinocytes humains provenant de différents donneurs, assurant le plus haut niveau de standardisation et de reproductibilité des résultats des tests. Les tissus sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate cultivés à l'interface air-liquide avec un milieu de culture cellulaire approprié, exempt de sérum animal. Après deux semaines de différenciation, un épiderme complet est reconstitué.

Les laboratoires StratiCELL ont aussi leurs propres modèles RHE mimant les maladies cutanées telles que l'atopie (RHE altérés). Ces modèles ont été incubés avec un cocktail de cytokines Th2 (IL-4, IL-13 et IL-

25) afin de reproduire les aspects morphologiques et fonctionnels de la maladie atopique. Ces modèles (RHE altérés) ont servi afin de tester l'efficacité de molécules potentiellement actives vis-à-vis de cette maladie ¹²⁰.

1.4-Grandes classes de lipides épidermiques

Plusieurs grandes classes lipidiques sont présentes au niveau épidermique:

- **Les Acides gras libres (FFAs) :** la classe des acides gras libres (FFAs) est considérée parmi les classes lipidiques essentielles dans le SC. Cette classe forme environ 25% de lipides totaux du ciment intercornéocytaire. Ils consistent en une seule chaîne hydrocarbonée (nombre d'atomes de carbone entre 14 et 34) terminée par une fonction acide carboxylique. Les acides gras libres les plus abondants dans le SC humain sont ceux avec une longueur de chaîne de 24 et 26 atomes de carbone³⁹. Les acides gras libres saturés couvrent la majorité des acides gras mais il existe aussi en faible quantité des acides gras libres mono-insaturés et poly-insaturés⁶. Les acides gras libres possédant une fonction hydroxyle en plus (OH-FFAs) sont aussi mentionnés dans la littérature^{3, 39, 40}. Les FFAs de longueurs de chaîne de 16 atomes de carbone (C16) sont synthétisés dans le cytosol des kératinocytes en utilisant l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA³. Ces FFAs vont intervenir dans la biosynthèse des céramides. Ainsi au niveau du Réticulum Endoplasmique (RE), ils sont soumis aux enzymes d'élongation (ELOVLs) qui conduisent à former des acides gras libres de longueur de chaîne supérieure à C16⁴¹. Ces derniers vont participer à la formation des céramides de longue chaîne et de très longue chaîne hydrocarbonée. En parallèle de leur rôle crucial pour générer les céramides, les FFAs de longue chaîne alkyle supérieure à C16 interviennent également dans la formation de phospholipides stockés dans les corps lamellaires (Lbs) qui ultérieurement servent à générer de nouveau les acides gras libres du ciment intercornéocytaire^{2,3}.
- **Les lipides stérols :** ils comprennent le cholestérol et ses dérivés (cholestérol sulfate, esters de cholestérol et oxystérol). Le cholestérol (CHOL) est parmi les composants principaux (15%) du ciment intercornéocytaire. Au cours de la différenciation, le cholestérol est retenu tel qu'il est dans les corps lamellaires (Lbs) à côté des glucosylcéramides, des sphingomyélines et des phospholipides^{42, 43}. À l'interface du SG et SC, il est libéré par les LBs pour participer à la formation du ciment intercornéocytaire. Le cholestérol peut aussi se convertir en oxystérol et en cholestérol sulfate⁴². Ce dernier est très amphiphile et peut donc traverser la membrane des kératinocytes et entrer directement dans la couche cornée où il sera partiellement reconverti en cholestérol par la cholestérol sulfatase^{2, 3}. Le cholestérol sulfate est impliqué dans la régularisation de l'étape de desquamation^{41, 44}. En plus, une quantité moins importante d'esters de cholestérol qui peut, en partie, être originaire de la glande sébacée persiste également au niveau du SC⁴³ (Figure 1-2).

- **Les sphingolipides** : les sphingolipides sont des lipides qui ont à la fois des fonctions structurales et biologiques dans l'épiderme humain. Ces lipides sont complexes, ils se composent d'une base sphingoïde liée à un acide gras par une liaison amide⁴⁵. La base sphingoïde est constituée d'une chaîne hydrocarbonée pouvant contenir des doubles liaisons, d'un groupement amine en position 2 et de 2, 3 et parfois 4 groupements hydroxyles (dans le cas de céramides Cer [NT]*) en positions 1, 3, 4 et 5 (voir la classification des sous-classes des céramides à la page 35). On peut distinguer 3 types principaux de sphingolipides : les céramides, les glycosphingolipides (glucosylcéramides), et les phosphosphingolipides (sphingomyélines). Ces trois classes des lipides sont considérées parmi les biomarqueurs lipidiques principaux de l'étape de la différenciation des kératinocytes. (Voir le paragraphe : Biosynthèse des céramides au cours de la différenciation des kératinocytes, page 40.
 - **Les céramides** : la classe des céramides (Cers) forme environ 50% de lipides de ciment intercornéocytaire⁴⁵. La diminution du taux de céramides au niveau du SC entraîne une augmentation de la perte de l'eau et la dysfonctionnalité de la barrière épidermique. Les céramides sont les précurseurs de tous les sphingolipides et sont composés d'une base sphingoïde liée à un acide gras par une liaison amide^{9, 46, 47}. Cette classe est très complexe, elle est divisée en sous-classes qui se différencient par plusieurs éléments : la longueur de la chaîne alkyle, le degré d'insaturation, le nombre de fonction hydroxyle et l'isomérisation. Vu la diversité de cette classe et son rôle majeur dans la formation d'une barrière cutanée fonctionnelle, nous allons nous concentrer ultérieurement en particulier sur cette classe lipidique.
 - **Les glycosphingolipides (glucosylcéramides)** : les glucosylcéramides (GlcCers) sont des glycosphingolipides dont le groupement hydroxyle de la fonction alcool primaire de la base sphingoïde est lié à un résidu de glucose¹¹. Les GlcCers jouent un rôle essentiel dans le processus de biosynthèse des céramides du SC⁴⁵. Ils sont des précurseurs de la plupart des sous-classes de céramides⁴⁸. Cette classe est synthétisée durant la différenciation des kératinocytes par la glycosylation des céramides dans l'appareil de Golgi. Après leur stockage dans les corps lamellaires (Lbs), ils seront libérés à l'interface des couches SG et SC pour régénérer les céramides.

Cer [NT]*: l'une des sous-classes de céramides dont la partie acide gras est Non hydroxylée liée avec la base dihydroxy-sphinganine par une bande d'amide.

Pour ces raisons, le taux des GlcCers est le plus élevé dans le SG. Cette observation peut être utilisée comme un indice d'une étape de la différenciation. (Voir le paragraphe de la biosynthèse des céramides, page 40).

- **Les phosphosphingolipides (sphingomyélines) :** les sphingomyélines (Sms) sont des phosphosphingolipides dont le groupement hydroxyle de la fonction alcool primaire de la base sphingoïde est estérifié avec la phosphocholine. Au cours de la différenciation, les Sms sont synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi à partir de leurs précurseurs (les céramides), qui sont phosphorylés par l'ajout de la phosphocholine. À la dernière étape de la différenciation et surtout à l'interface du SG et SC, les Sms vont régénérer les céramides du SC. Pour cela, ils sont considérés comme des lipides précurseurs dans la biosynthèse des céramides notamment pour les sous-classes Cer[AS]* et Cer[NS]**².

-Les glycérolipides : les glycérolipides regroupent trois classes de lipides qui se composent d'une molécule de glycérol liée par liaison ester avec un seul acide gras dans le cas de (monoglycérides), deux acides gras (diglycérides), ou trois acides gras (triglycérides). Parmi les glycérolipides, les triglycérides sont les plus importants pour la fonction de la barrière cutanée. Ils jouent un rôle important dans la formation des céramides et des glucosylcéramides de très longue chaîne de carbone : les triglycérides génèrent l'acide linoléique (sous sa forme linoléate), ce dernier est incorporé avec une haute spécificité en position ω de céramides et de glucosylcéramides pour former les Cers et les GlcCers estérifiés qui sont connus par leur chaîne carbonée très longue et par leur rôle clé dans la fonction de la barrière cutanée². Des quantités moins importantes de diglycérides et triglycérides, qui peuvent en partie être originaires de la glande sébacée, persistent également au niveau du SC⁴³.

-Les glycérophospholipides : ils forment avec les sphingomyélines la classe des phospholipides (PL). Les glycérophospholipides se composent de deux chaînes d'acides gras liés par une liaison ester avec un glycérol. Ce dernier est également estérifié avec un groupe phosphate qui lui-même est lié à un résidu (X) qui diffère selon le type du PL. Les PL sont les composants principaux de la membrane cellulaire des kératinocytes.

Cer[AS]*: l'une des sous-classes de céramides dont la partie acide gras est α hydroxylée, liée avec la base sphingosine par une liaison amide. Cer[NS]** : l'une des sous-classes de céramides dont la partie acide gras est Non hydroxylée, liée avec la base sphingosine par une liaison amide.

Particulièrement à l'étape de la cornification, les phospholipides sont absents^{8, 9, 49}. Au cours de la différenciation, les FFAs de longueur de chaîne supérieure à C16 seront liés avec glucose 3-phosphate pour former des phospholipides. Après le stockage de ces PL dans les corps lamellaires, ils sont ensuite sécrétés à l'interface du SG et SC. A cette étape, ils sont soumis à une enzyme phospholipase permettant de générer à nouveau les FFAs. Ces derniers vont participer à la formation du ciment intercornéocytaire^{3, 50}.

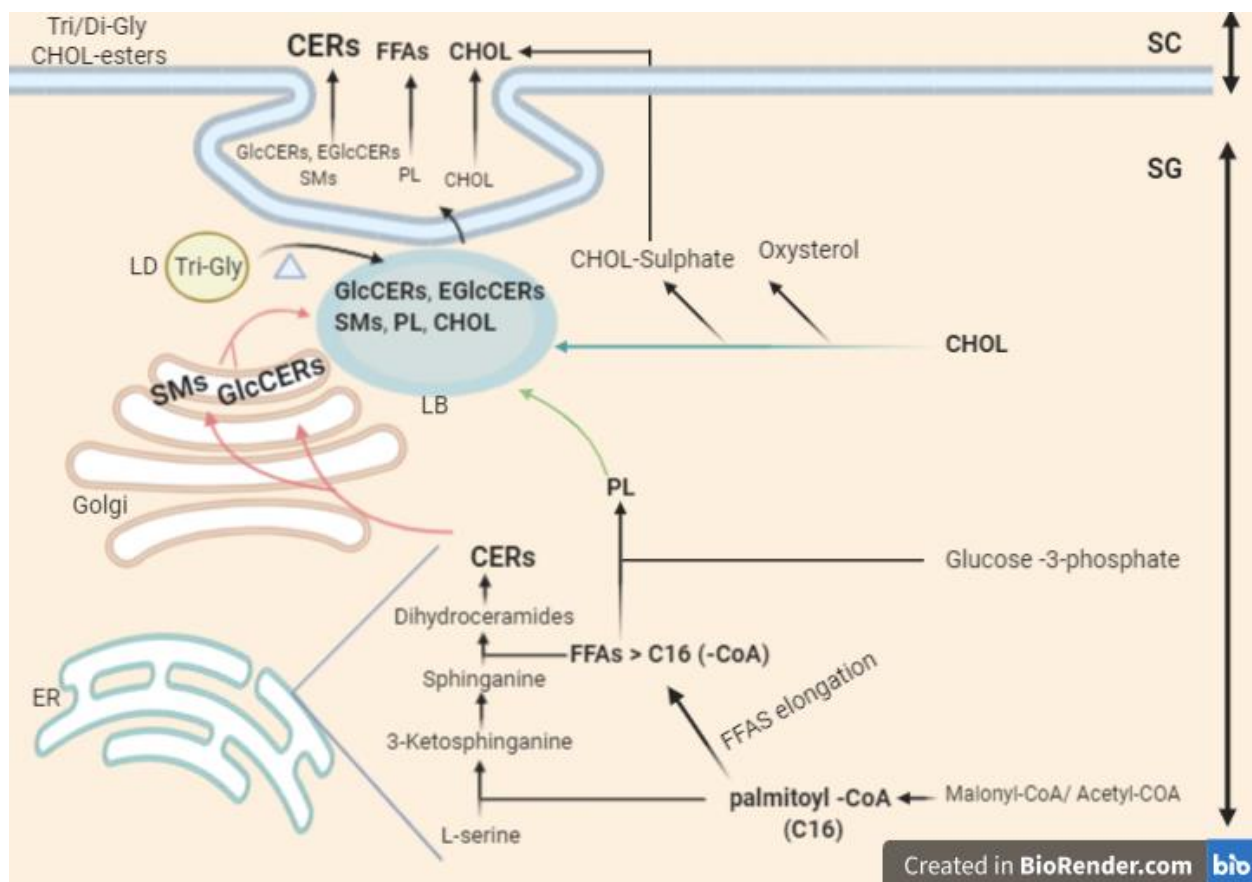
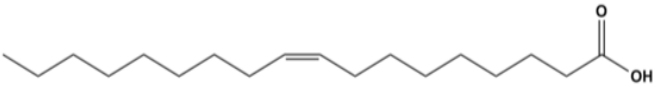
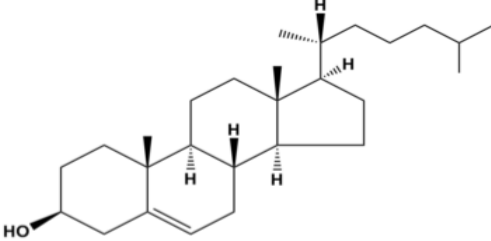
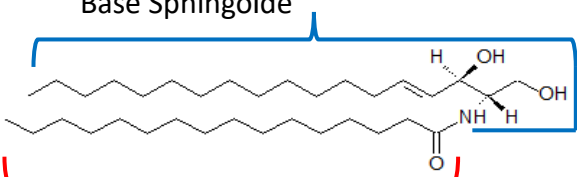
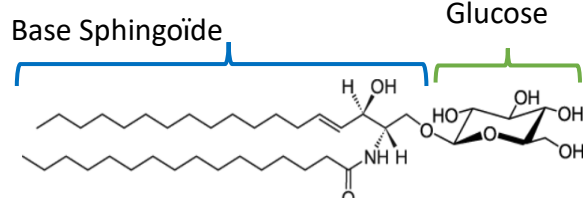
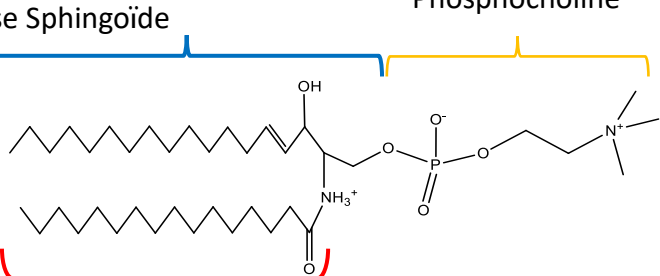


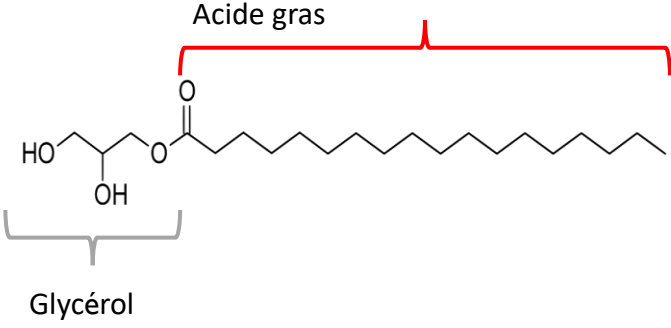
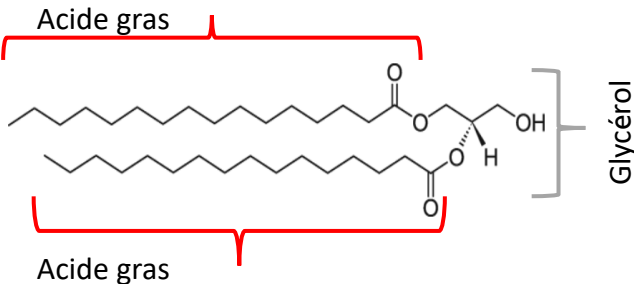
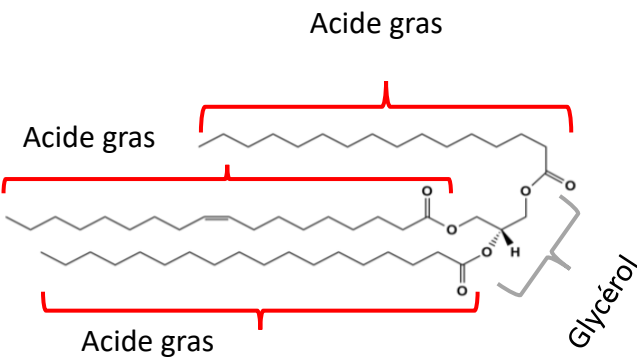
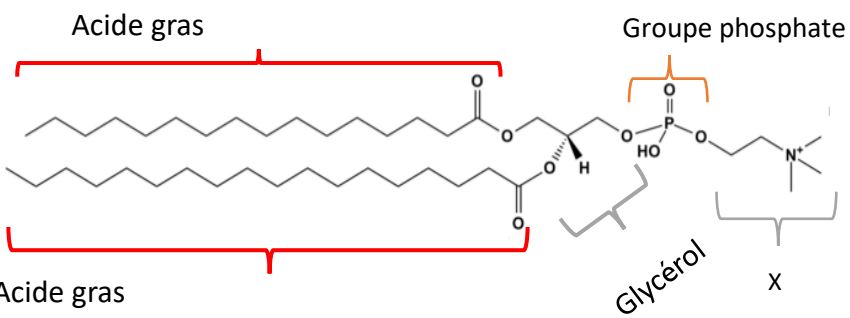
FIGURE 1-2 : Contribution de chaque classe lipidique dans la formation du ciment intercornéocytaire.

ER: réticulum endoplasmique, SMs: sphingomyélines, GlcCERs: glucosylcéramides, EGlcCERs: glucosylcéramides estérifiés avec l'acide linoléique, FFAs : acides gras libres, CHOL : cholestérol, Tri-Gly : triglycérides, Di-Gly: diglycérides, PL: phospholipides, CERs: céramides, LD: gouttelette lipidique, LB: corps lamellaire, Δ = libération de l'acide linoléique à partir des triglycérides pour former les EGlcCERs.

Cette figure a été créée en utilisant le site : BioRender.com (Created with BioRender.com)

TABLEAU 1-2 : Formules chimiques des différentes classes de lipides épidermiques.

Classe lipidique	Formule chimique
Acides gras libres	 <p>Exemple : acide gras C (18 :1)</p>
Cholestérol	
Céramides	<p>Base Sphingoiïde</p>  <p>Acide gras</p>
Glucosylcéramides	<p>Base Sphingoiïde</p> <p>Glucose</p>  <p>Acide gras</p>
Sphingomyélines	<p>Base Sphingoiïde</p> <p>Phosphocholine</p>  <p>Acide gras</p>

<p>Monoglycéride</p>	 <p>Acide gras</p> <p>Glycérol</p>
<p>Diglycérides</p>	 <p>Acide gras</p> <p>Acide gras</p> <p>Glycérol</p>
<p>Triglycérides</p>	 <p>Acide gras</p> <p>Acide gras</p> <p>Acide gras</p> <p>Glycérol</p>
<p>Glycérophospholipides</p>	 <p>Acide gras</p> <p>Acide gras</p> <p>Groupe phosphate</p> <p>Glycérol</p> <p>X</p> <p>Exemple : la phosphatidylcholine PC dont le X : Choline</p>

1.5-Fonction de la barrière épidermique : rôle des céramides

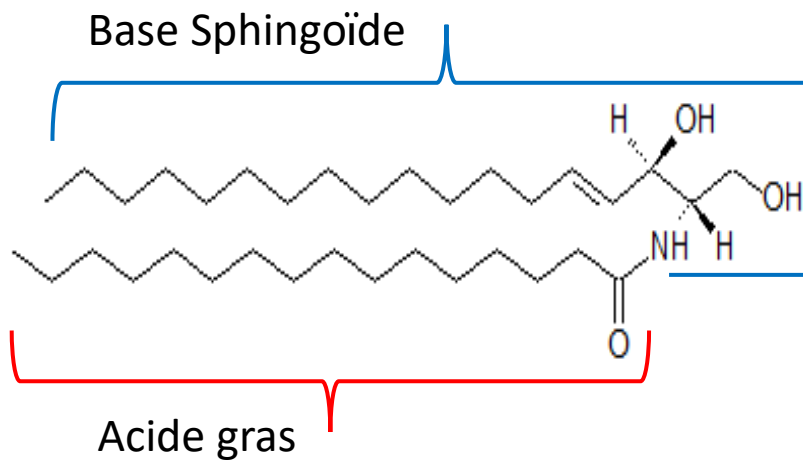
La peau humaine joue un rôle de barrière assurant le maintien de l'homéostasie tissulaire. De l'extérieur vers l'intérieur, la peau protège le corps contre la diffusion des molécules, l'exposition aux produits chimiques, le rayonnement ultraviolet (UV) et la pénétration des agents pathogènes. De l'intérieur vers l'extérieur, le passage de l'eau et des électrolytes est empêché, protégeant le corps contre la déshydratation. La fonction de barrière cutanée est localisée au niveau de l'épiderme et elle peut être divisée en quatre compartiments : la barrière physique, chimique, immunologique et microbienne. La couche cornée (SC) et les jonctions serrées forment la barrière physique. Le SC exerce la plupart des fonctions défensives de l'épiderme de l'extérieur vers l'intérieur. La barrière chimique du SC est assurée par les lipides qui font partie intégrante de cette barrière ^{15, 28, 51}. Les lipides du ciment intercornéocytaire (50% céramides, 25% cholestérols, 15% acides gras à longues et ultra longues chaînes et autres lipides) ⁴⁵ sont cruciaux pour avoir une barrière cutanée fonctionnelle. Les lipides les plus importants dans la fonction barrière sont les céramides ¹⁵. Dans les maladies cutanées telle que l'atopie dans laquelle la fonction de barrière cutanée est perturbée, une diminution du taux des céramides au niveau du SC a été observée ⁴⁶. Comme le cas de la sous-classe de céramides estérifiés Cer [EOS]* qui a montré une diminution claire dans la maladie d'atopie. Ces résultats peuvent confirmer l'importance des céramides au niveau des sous-classes (micro-hétérogénéité structurale) et montrent aussi l'importance de Cer [EOS] dans la fonction de la barrière cutanée ^{6, 7, 9, 51}. (Les sous- classes de céramides impactées dans la maladie atopique seront détaillées dans le chapitre 6).

Vu le rôle clé et majeur de la classe des céramides dans la fonction barrière cutanée, le chapitre suivant (chapitre 2) va être centré particulièrement sur cette classe lipidique.

Cer[EOS]* : l'une des sous-classes de céramides dont la partie acide gras est estérifiée en position (ω) avec l'acide linoléique.

CHAPITRE 2

Classe de céramides



2.1-Micro-hétérogénéité structurale des céramides (sous-classes de céramides)

La famille des céramides appartient à la classe des sphingolipides. Cette classe des céramides est très complexe, elle est divisée en différentes sous-classes qui diffèrent par leur micro-hétérogénéité structurale due aux variations de la longueur de(s) chaîne(s) alkyle(s), du nombre de groupements hydroxyles, du degré d'insaturation et de l'isomérisation². Il a été mentionné l'existence de 342 à 1000 structures différentes de céramides au niveau du SC⁵².

En général, la longueur totale des chaînes carbonées des sous-classes Cers (c'est-à-dire le nombre d'atomes de carbone de la base sphingoïde et de la chaîne d'acide gras), varie entre C32 et C54 pour les céramides non estérifiés (non acyl-Cers). Cependant, pour les céramides estérifiés, la longueur totale de chaîne carbonée est encore plus élevée, avec une variation entre C64 et C78 (cela inclut les atomes de carbone de la partie d'acide gras estérifiée)⁶. Les recherches publiées à ce jour montrent l'existence de 16 grandes sous-classes des céramides dans l'épiderme humain.

La nomenclature des céramides actuellement adoptée (et depuis lors développée) est définie par l'équipe de Motta⁵³. Cette nomenclature consiste à utiliser un minimum de deux lettres, la première lettre correspond à la partie « acide gras » et la deuxième lettre pour la partie « sphingoïde ». Concernant la base sphingoïde (deuxième lettre), on peut trouver 5 types : dihydrosphingosine (**dS**), sphingosine (**S**), phytosphingosine (**P**), 6-hydroxysphingosine (**H**), et dihydroxy-sphinganine (**T**)^{2, 52, 54}. Pour la partie d'acide gras (première lettre) on trouve les acides gras : Non-hydroxylés (**N**), α -hydroxylés (**A**), et ω -hydroxylés (**O**). En plus, les acides gras de très longue chaîne de carbone (ULC) qui sont hydroxylés en position ω (**O**) peuvent être estérifiés pour former la sous-classe des céramides (ULC) estérifiés. Ces derniers jouent un rôle très important dans la fonction barrière cutanée^{2, 6}. Les céramides de cette sous-classe sont estérifiés soit avec un autre acide gras (principalement acide linoléique (C18:2)) et dans ce cas la lettre (**E**) précède (**EO**) ou bien avec le glutamate (résidu de protéines et notamment involucrine) à la surface des cornéocytes et la lettre **P** précède (**PO**)¹⁵. En 2013, l'équipe de Rabionet⁵⁵ a découvert une nouvelle sous-classe céramidique : Cer (**1-O** acyl céramides) dont l'hydroxyle primaire en position 1 de la base sphingoïde est estérifié avec une chaîne d'acyle saturé (**1-O-E**)^{2, 55}.

Le Tableau (2-1) et la Figure (2-1) présentent les différentes sous-classes de céramides regroupées selon la nature de la partie d'acide gras :

-Les céramides dont la partie « acide gras » est non hydroxylée (**N**) comme les céramides : Cer 2 (**NS**), Cer 3 (**NP**), Cer 8 (**NH**), Cer 10 (**NdS**), et Cer (**NT**). En regardant la distribution des céramides au niveau du SC (Figure 2-2) nous observons que ce groupe de céramides et particulièrement le Cer (**NP**)

est le plus abondant par rapport à l'ensemble des sous-classes céramidiques (sans prendre en compte la sous-classe 1-O acyl céramides) ⁶.

- Les céramides dont la partie « acide gras » est hydroxylée en position (α) comme les céramides: Cer 5 (**AS**), Cer 6 (**AP**), Cer 7 (**AH**), et Cer 11 (**AdS**).

- Les céramides dont la partie « acide gras » est hydroxylée en position (ω) comme les céramides : Cer (**OS**), Cer (**OP**) et Cer (**OH**). Selon la figure (2-2), ce groupe de céramides est le moins abondant au niveau du SC humain par rapport à l'ensemble des sous-classes céramidiques (sans prendre en compte les ceramides 1-O acyl céramides) ⁶.

- Les céramides dont la partie « acide gras » (longueur de la chaîne d'alkyle est environ 30-32 atomes de carbone) ²⁴ est estérifiée en position (ω) par l'acide linoléique C(18:2). Cette classe est aussi connue sous le nom d'«acyl céramides». Les céramides de ce groupe sont : Cer 1(**EOS**), Cer 4 (**EOH**), Cer 9 (**EOP**), Cer (**EOdS**).

En plus de ces groupes de céramides, la sous-classe des céramides (1-O-Acyl céramides) a été ajoutée. L'estérification de cette sous-classe est sur la base sphingoïde (**1-O-E**) et non pas sur la partie « acide gras ». Deux sous-classes ont été détectées : Cer (**1-O-ENS**) et Cer (**1-O-EAS**) ⁵⁵.

TABLEAU 2-1 : Nomenclature des sous-classes de céramides selon Motta et al ⁵³.

Nomenclature des sous-classes de céramides				
Sous-classe de céramides		Partie de l'acide gras	Partie de base sphingoïde	Ester (en cas de présence)
Les céramides dont la partie de l'acide gras est Non hydroxylée	NS	Non-hydroxy	Sphingosine	-
	NP	Non-hydroxy	Phytosphingosine	-
	NH	Non-hydroxy	6-hydroxy-sphingosine	-
	NdS	Non-hydroxy	Dihydro-Sphingosine	-
	NT	Non-hydroxy	Dihydroxy-sphinganine ²	-
Les céramides dont la partie de l'acide gras est hydroxylée en position (α)	AS	α -hydroxy	Sphingosine	-
	AP	α -hydroxy	Phytosphingosine	-
	AH	α -hydroxy	6-hydroxy-sphingosine	-
	AdS	α -hydroxy	Dihydro- Sphingosine	-
Les céramides dont la partie de l'acide gras est hydroxylée en position (ω)	OS	ω -hydroxy	Sphingosine	-
	OP	ω -hydroxy	Phytosphingosine	-
	OH	ω -hydroxy	6-hydroxy-sphingosine	-
Les céramides estérifiés en position (ω) de la partie de l'acide gras avec l'acide linoléique	EOS	ω -hydroxy	Sphingosine	Ester avec l'acide linoléique (C18:2)
	EOP	ω -hydroxy	Phytosphingosine	Ester avec l'acide linoléique (C18:2)
	EOH	ω -hydroxy	6-hydroxy-sphingosine	Ester avec l'acide linoléique (C18:2)
	EOdS	ω -hydroxy	Dihydro- Sphingosine	Ester avec l'acide linoléique (C18:2)
Les céramides estérifiés sur l'hydroxyle primaire en position 1 de la base sphingoïde avec une chaîne d'acyle saturé ⁵⁵	1-O-ENS	Non-hydroxy	Sphingosine	Ester avec une chaîne acyle saturée
	1-O-EAS	α -hydroxy	Sphingosine	Ester avec une chaîne acyle saturée

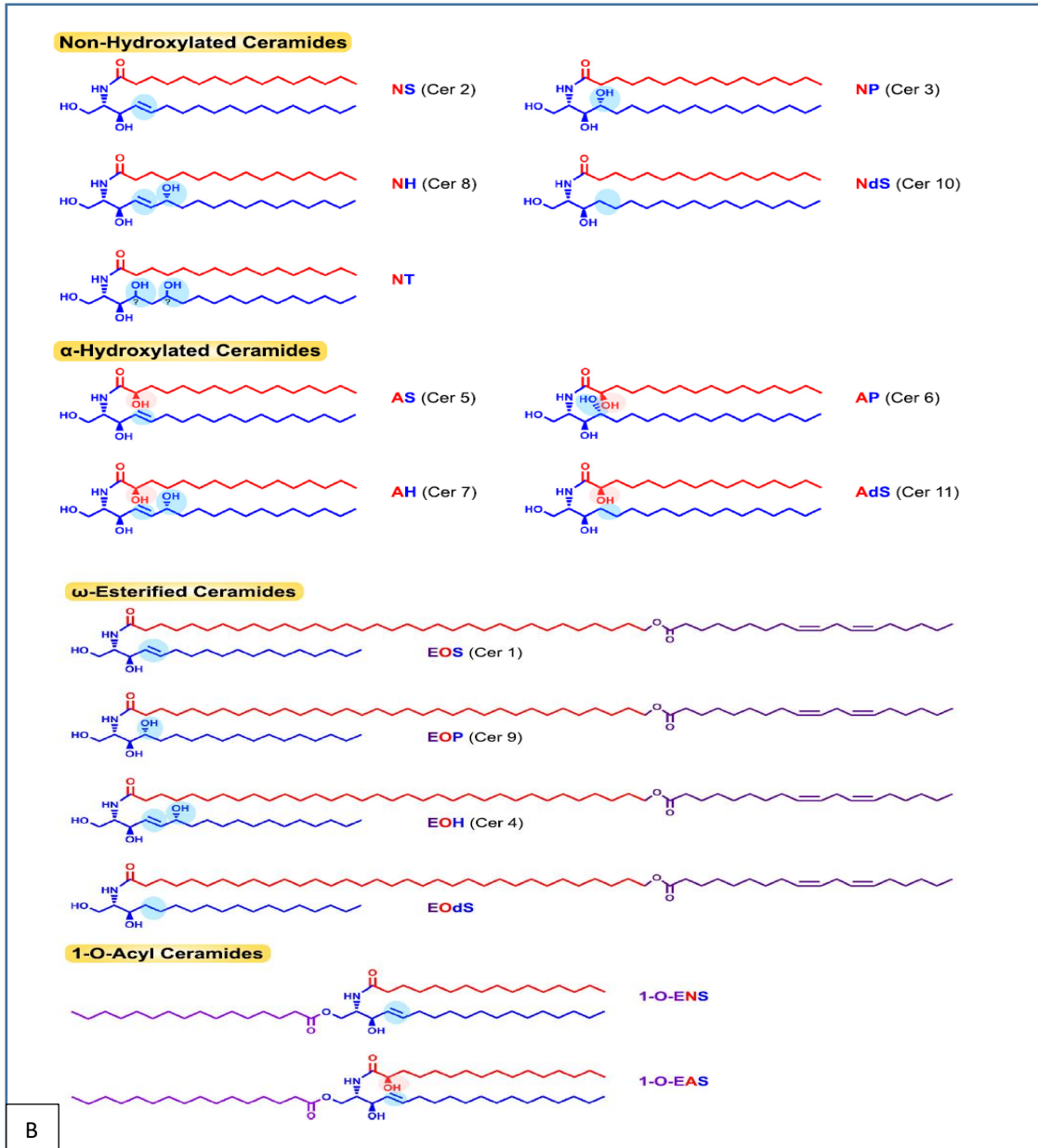
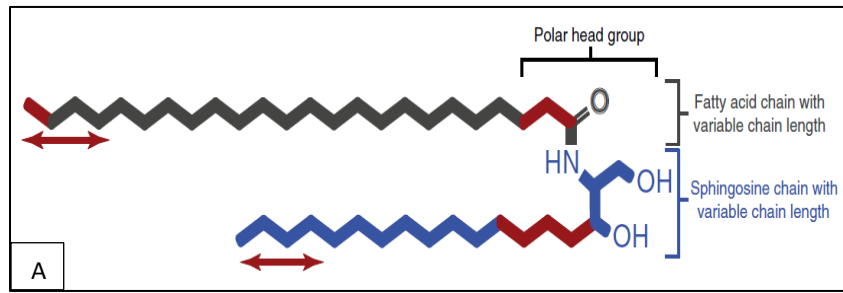


FIGURE 2-1 : Céramides dans l'épiderme humain (selon Rabionet et al. 2014)

A: La molécule de céramide est composée d'un acide gras lié à une base sphingoïde par une liaison amide ³. B: Diversité structurale des sous-classes de céramides : La partie acide gras est mentionnée en rouge, elle peut être : Non hydroxylée (N), α hydroxylée (A), estérifiée en position ω (O). La base sphingoïde mentionnée en bleu peut être : dihydrosphingosine (dS), sphingosine (S), phytosphingosine (P), 6-hydroxysphingosine (H), et dihydroxy-dihydro sphingosine (T). Concernant les céramides estérifiés, la partie ester est mentionnée en violet. L'estérification peut être sur la partie acide gras en position ω (E) (estérification avec l'acide linoléique), ou l'estérification peut être sur l'hydroxyle primaire en position 1 de la base sphingoïde (1-O-E) (estérification avec une chaîne acyle saturée) ².

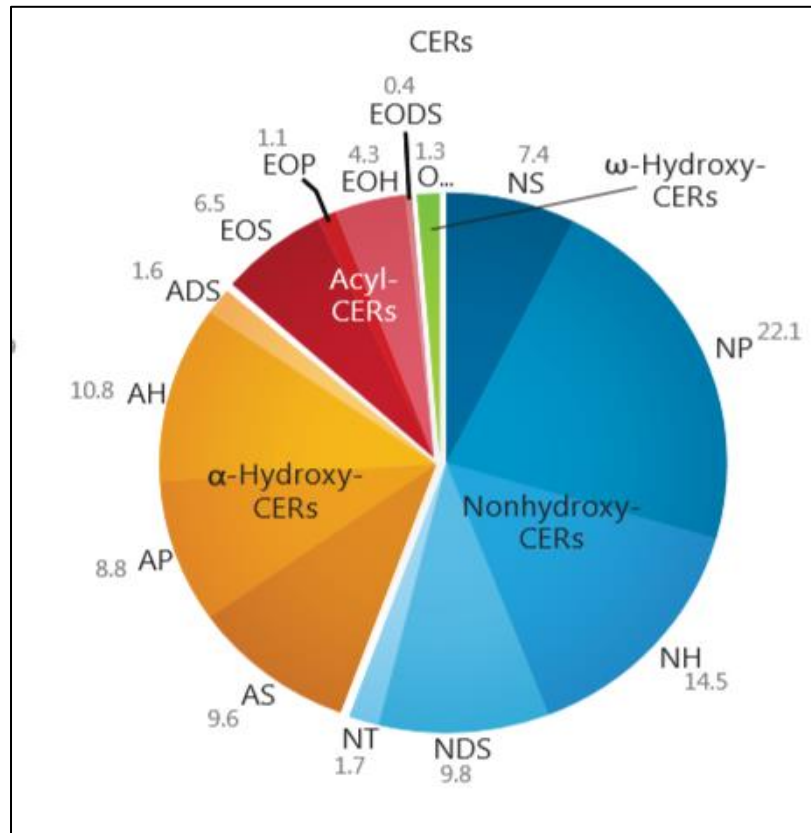


FIGURE 2-2 : Distribution des sous-classes de céramides dans le SC humain établie par Bouwstra et al. 2016. Cette étude ne prend pas en compte la sous-classe des céramides Cer (1-O-Acyl céramides) ⁶.

2.2- Biosynthèse des céramides au cours de la différenciation des kératinocytes

Depuis plusieurs années, certaines études ont montré que la composition lipidique change au cours de la différenciation des kératinocytes^{51,56}. La classe des céramides qui forme les composants majeurs des lipides du ciment intercornéocytaire (50%) joue un rôle primordial dans la formation et le maintien de la fonction de barrière cutanée^{2, 7}.

La biosynthèse des céramides épidermiques est initiée à partir des étapes précoces de la différenciation des kératinocytes⁷. En général, dans le réticulum endoplasmique (RE), des acides gras vont se conjuguer avec la base sphingoïde pour générer des céramides selon la voie *de novo*.

Dans cette partie, nous allons présenter la biosynthèse des céramides de manière détaillée en commençant par illustrer la synthèse des acides gras de très longues (VLC) et ultra longues chaînes (ULC), en passant par les molécules précurseurs de la synthèse des Cers et jusqu'à la génération des Cers de la couche cornée. De plus, dans la Figure (2-7), est résumé l'ensemble des étapes essentielles de la biosynthèse des céramides.

- Synthèse des très longues (VLC) et ultra longues chaînes (ULC) d'acides gras

Les acides gras peuvent être également classés selon la longueur de leur chaîne d'alkyle : une chaîne longue (LC, C14 - C19), une chaîne très longue (VLC, C20 - C26) ou une chaîne ultra longue (ULC, > C26)². La synthèse de (VLC-FAs) et de (ULC-FAs) est cruciale pour former les céramides de très longues chaînes (VLC-Cers) et ultra longues chaînes (ULC-Cers). Comme expliqué précédemment dans le paragraphe (les grandes classes des lipides épidermiques page 27) les acides gras de 16 atomes de carbone (acide palmitique), après leur conversion en acyl-CoAs, sont soumis aux enzymes intégrées à la membrane du RE pour former les acides gras de longueur de chaîne supérieure à C16⁵⁷. L'allongement des acides gras se produit en passant par un processus composé de quatre étapes (élongation de la chaîne acyle, réduction, déshydratation et réduction). Chaque étape nécessite différentes enzymes : étape 1: élongation des acides gras par les enzymes d'élongation (ELOVL), étape 2: réduction par une enzyme réductase (KAR: 3-keto acyl-CoA reductase), étape 3: déshydratation par une enzyme désaturase (HACD1-4, 3-hydroxy acyl-Coa desaturase1-4), étape 4: réduction par une enzyme réductase (TER: 2,3 trans enoyl-CoA reductase). À la dernière étape, l'acyl-CoA aura deux unités de chaîne de carbone de plus que l'acyl-CoA d'origine^{2, 57}. Figure (2-3).

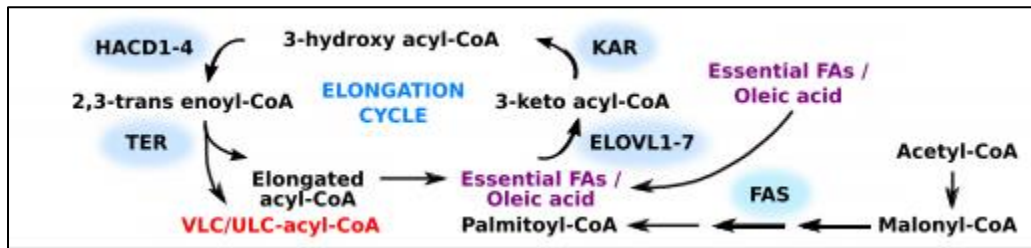


FIGURE 2-3 : Biosynthèse des VLC et ULC d'acides gras². Au niveau de l'RE, l'acide palmitique (C16 :0) est soumis aux enzymes permettant d'allonger ce FA et conduisent à la formation des VLC et ULC FAs qui sont par la suite impliqués dans la formation des Cers. FAS : acides gras synthase, enzyme impliquée pour former l'acide palmitique (C16:0).

De plus, à ce stade (après la formation des VLC et/ou ULC acide gras), certains acides gras peuvent être hydroxylés en position (α) ou (ω). Ces derniers seront impliqués plus tard dans la formation des sous-classes de céramides dont la partie « acide gras » est hydroxylée en position (α) ou (ω)².

- Génération des céramides épidermiques.

Au niveau du RE, l'acide aminé L-sérine est condensé avec le palmitoyl-CoA pour générer la 3-kétosphinganine, qui est ensuite réduite en sphinganine^{2, 46}.

À cette étape, les acides gras interviennent pour former les céramides. La génération d'une/des sous-classe(s) céramidique(s) dépend tout d'abord du type de l'acide gras (hydroxylé ou pas) qui va se condenser avec la sphinganine pour former les céramides. La figure 2-4, présente la biosynthèse des sous-classes des céramides dont la partie « acide gras » est Non hydroxylée (**N**). En effet, la condensation de l'acide acyl-CoA de très longue chaîne (VLC-FA-acyl-CoA) avec la sphinganine en présence des enzymes céramide-synthases (CerS) permet de former les dihydrocéramides (base sphingoïde **dS**) et donc la sous-classe de céramides (**NdS**). Par la suite, les dihydrocéramides vont être soumis aux différentes enzymes afin de générer les autres sous-classes. Ils seront désaturés (sous l'effet des enzymes dihydrocéramide désaturases) pour former la base (**S**) et donc la sous-classe céramides(**NS**). La sous-classe (**NP**) sera formée aussi à partir des dihydrocéramides mais sous l'effet d'une enzyme qui a une double fonctionnalité (désaturation +hydroxylation). Les enzymes impliquées dans l'hydroxylation pour générer la base (**H**) et/ou (**T**) restent encore non clairement identifiées^{2, 46}.

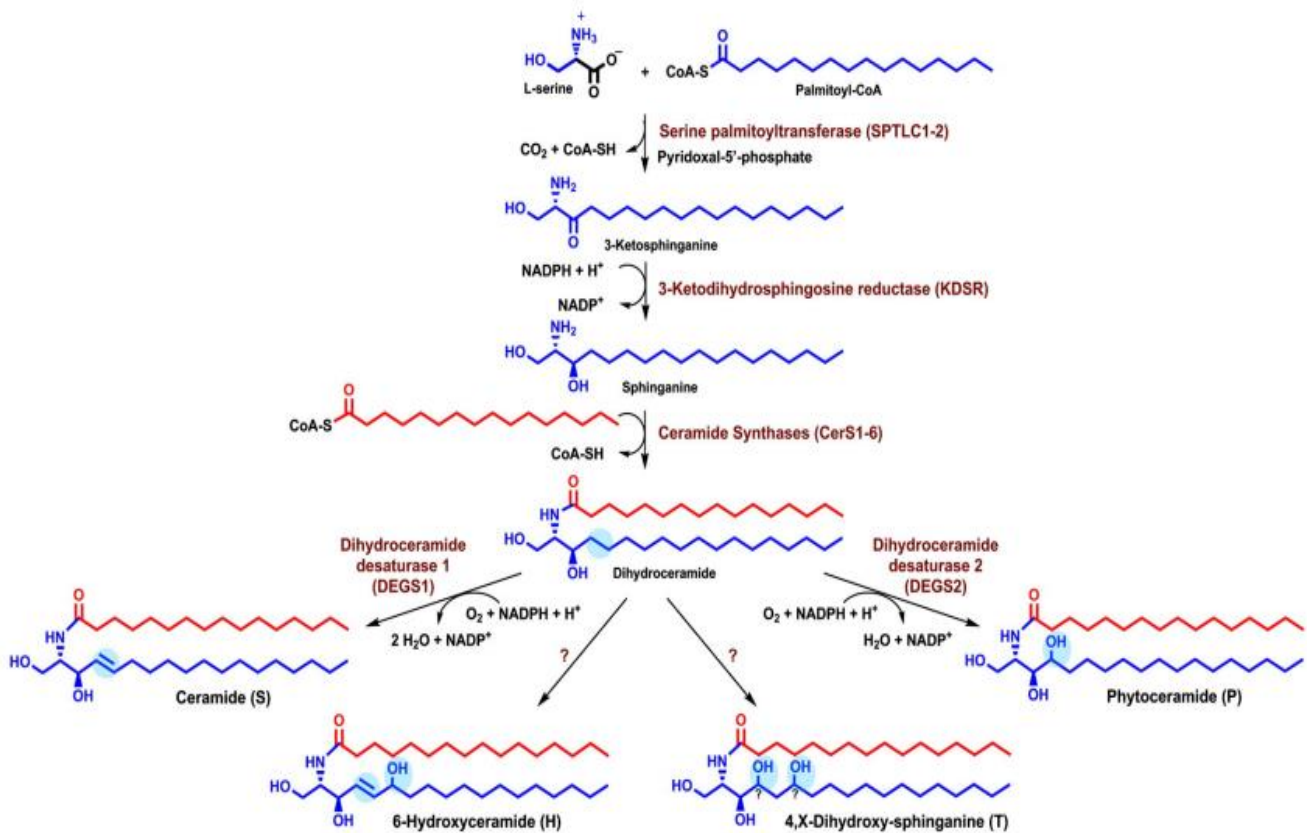


FIGURE 2-4 : Biosynthèse des bases sphingoides au niveau du RE.

Seulement la sphinganine (la base dS) sera directement formée par la serine palmitoyl transférase et la 3-ketodihydrosphingosine réductase. Par contre, les autres bases sphingoides seront générées à partir de la base dS et sous l'effet de différentes enzymes ².

- **Précurseurs des céramides cornés (glucosylcéramides et sphingomyélines) et génération des céramides cornés.**

Étant donné que la biosynthèse des céramides augmente tout au long de la différenciation des kératinocytes et probablement pour éviter leur niveau de cytotoxicité intracellulaire, les céramides sont soumis à des modifications dans l'appareil de Golgi au niveau du SG. Les céramides sont glycosylés pour donner les glucosylcéramides (GlcCers) et phosphorylés pour générer les sphingomyélines (Sms). (Figure 2-5).

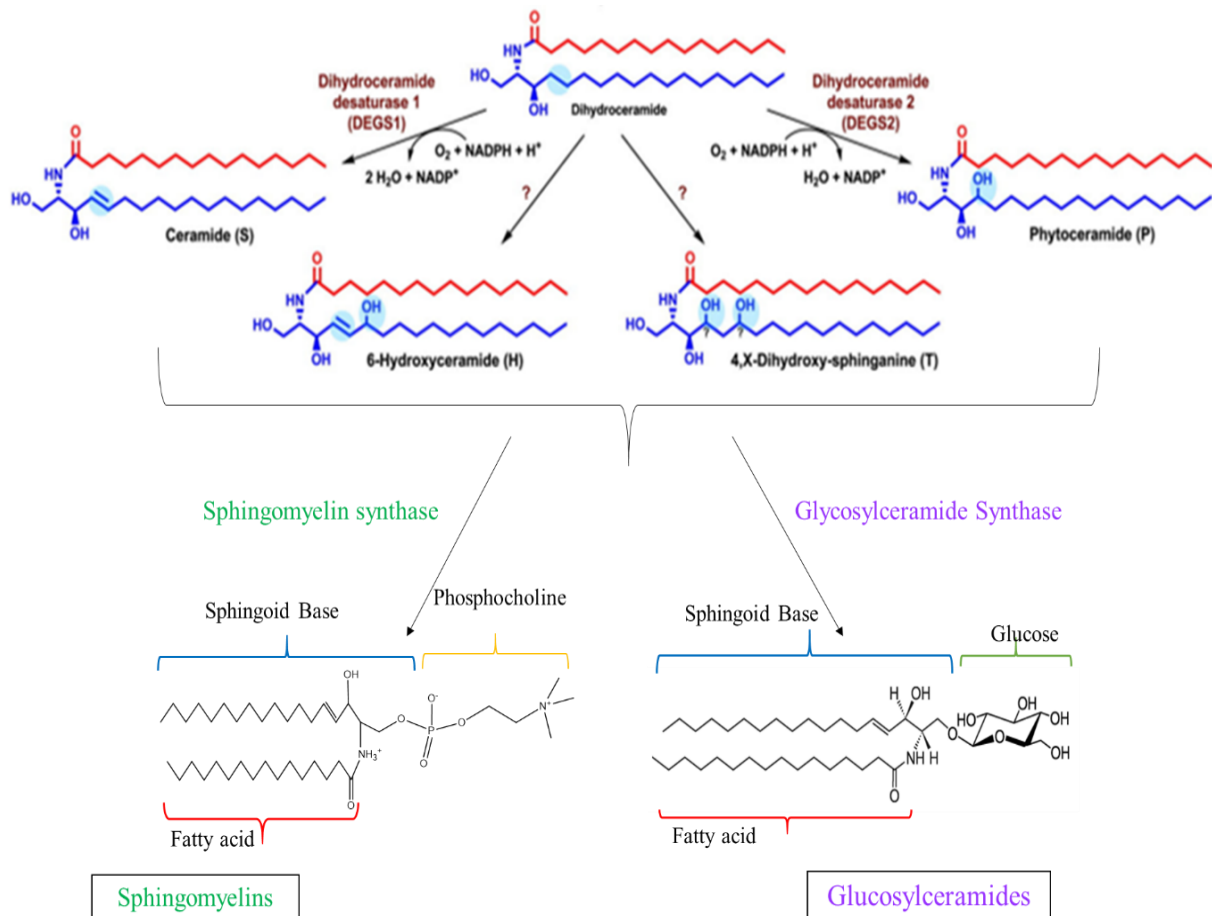


FIGURE 2-5 : Biosynthèse des glucosylcéramides et sphingomyélines au niveau de l'appareil de Golgi.

Les céramides formés précédemment dans l'RE sont soumis à des modifications au niveau de l'appareil de Golgi où ils sont glycosylés pour donner les glucosylcéramides (GlcCers) et phosphorylés pour générer les sphingomyélines (Sms).

Certaines structures et formules chimiques sont reprises à partir de l'article de Rabionet et al ² et modifiées.

Les GlcCers et les Sms sont ensuite stockés dans des corps lamellaires épidermiques (Lbs) où se trouvent aussi les phospholipides et le cholestérol ^{3,9}. Certains GlcCers sont estérifiés en position ω avec de l'acide linoléique dérivé des triacylglycérides (TAG) ^{2,15}. La localisation exacte de l' ω -estérification (RE ou Golgi) reste à ce jour non clarifiée². En réponse à un certain signal (éventuellement l'augmentation de la concentration en calcium), les corps lamellaires vont fusionner leur membrane avec la membrane plasmique des kératinocytes de SG afin de libérer leur teneur en lipides à l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée (phénomène d'exocytose). Les lipides libérés, les acylglucosylcéramides et les glucosylcéramides (GlcCers) sont soumis aux enzymes β -glucocérébrosidases et les sphingomyélines aux enzymes sphingomyélinases pour se reconvertir en leurs espèces de céramides y compris les céramides

estérifiés ^{5, 24}. Les GlcCers sont des précurseurs pour les plupart des céramides du SC par contre les Sms sont uniquement des précurseurs pour les céramides **AS** et **NS** ^{2, 46}. Puis les céramides ainsi que les cholestérols et les acides gras (générés à partir des phospholipides libérés par les corps lamellaires à l'interface SG et SC) ³ vont former le ciment intercornéocytaire responsable de la fonction de la barrière cutanée. Enfin, dans la partie supérieure du SC, les céramides sont métabolisés pour générer une grande quantité de bases sphingoides ². (Figure 2-6) et (Figure 2-7).

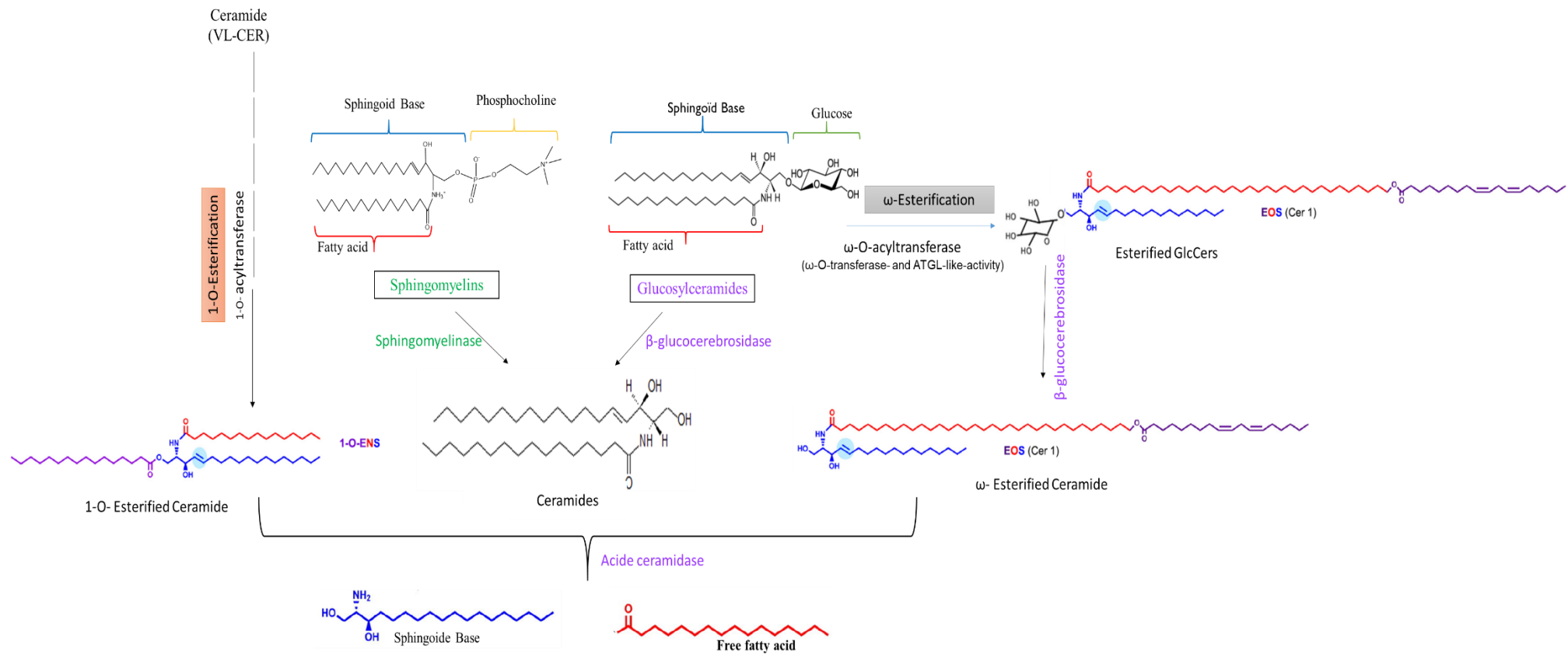


FIGURE 2-6 : Génération des céramides (cornés) à partir de leur précurseurs GlcCers et Sms.

À l'interface entre SG /SC ces précurseurs sont soumis à des enzymes permettant la formation des céramides du SC. L'estérification (ω) de certains GlcCers (ULC) intervient au niveau des corps lamellaires conduit à former des ULC-GlcCers (ω) estérifiés qui vont donner par la suite des ULC-Cers (ω) estérifiés. Les Cers estérifiés (1-O Acyl) sont également formés mais à partir des VLC-Cers. Dans la partie supérieure du SC les céramides sont métabolisés. Certaines structures et formules chimiques sont reprises à partir de l'article de Rabionet et al ² et modifiées.

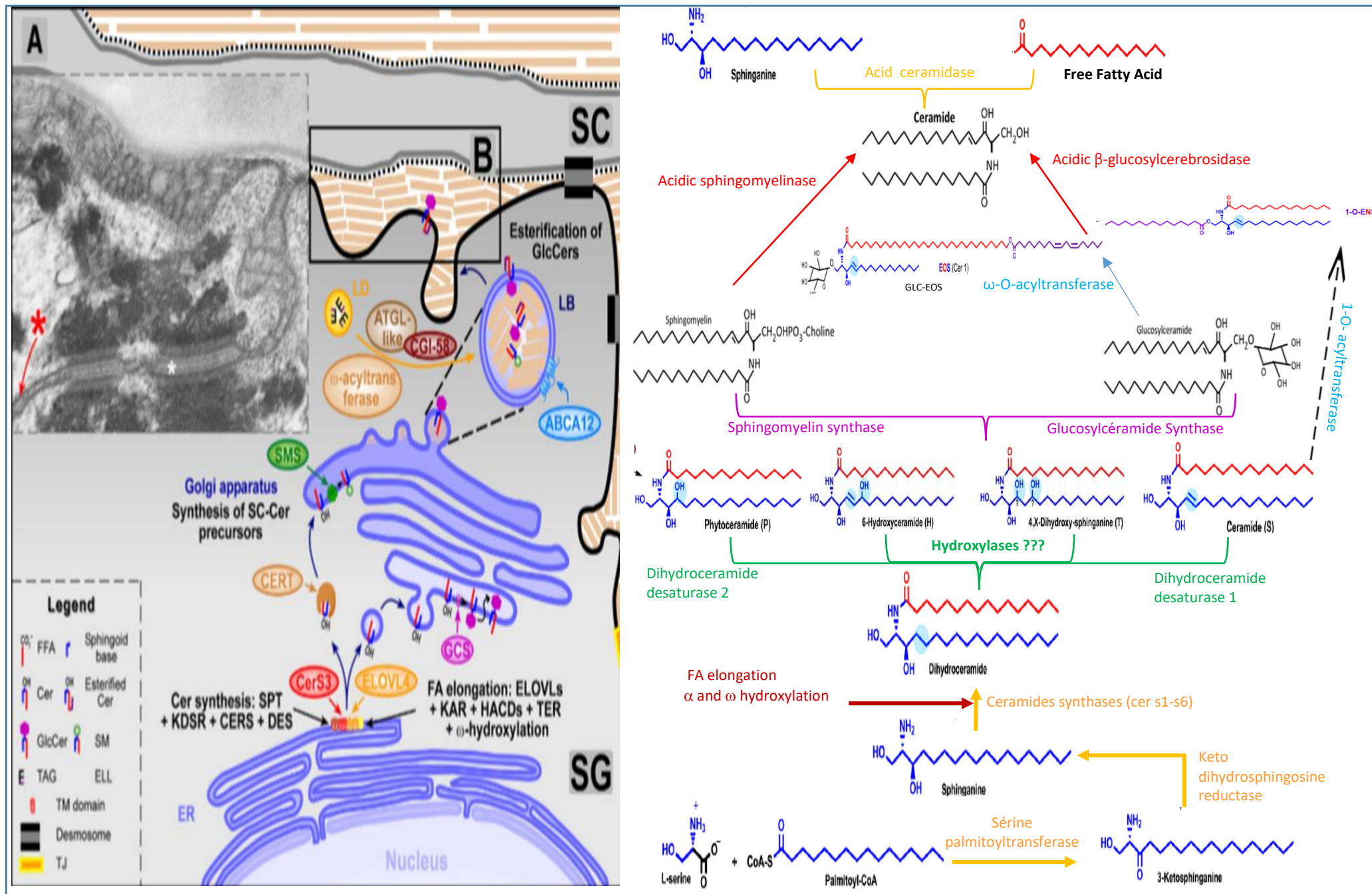


Figure 2-7 : Schéma résumé de l'évolution de la biosynthèse des céramides au cours de la différenciation kératinocytaire.

Dans le réticulum endoplasmique, les acides gras vont se conjuguer avec les bases sphingoides pour former les céramides. Au niveau de l'appareil de Golgi les céramides sont glycosylés pour donner les GlcCers ou phosphorylés pour former les Sms. Ces derniers sont recrutés dans les corps lamellaires (LB) pour les transporter puis les libérer à l'interface entre SG et SC. À ce lieu, certains GlcCers seront estérifiés. Les lipides libérés sont dégradés pour reformer les céramides. Finalement, dans la partie supérieure du SC, les céramides sont métabolisés et libèrent leurs bases (acides gras+sphingoides)². Le schéma de la biosynthèse et certaines formules chimiques sont repris à partir de l'article de Rabionet et al ² et modifiés.

CHAPITRE 3

Méthodes d'analyse des lipides épidermiques

L'étude de la biosynthèse des lipides au cours de la différenciation des kératinocytes nécessite d'utiliser des techniques analytiques permettant d'offrir des informations à l'échelle moléculaire. Les méthodes de séparation chromatographique ainsi que les méthodes spectroscopiques vibrationnelles sont des bons candidats pour suivre l'évolution des lipides épidermiques.

3.1-Séparation chromatographique des lipides épidermiques

L'analyse des lipides a attiré l'attention des chercheurs depuis de nombreuses années. Les lipides existent dans l'environnement biologique sous forme de mélanges complexes. Ils sont impliqués dans le signal cellulaire, le stockage de l'énergie, le métabolisme, la fonction de la membrane cellulaire, et l'activation des enzymes⁵⁸. Durant la dernière décennie, l'étude de la composition des lipides épidermiques a beaucoup évolué et en particulier les céramides. Plusieurs études rapportées démontrent que les changements dans la composition des céramides peuvent jouer un rôle dans une barrière cutanée altérée^{53, 59}.

Les classes lipidiques forment des mélanges très complexes dans l'environnement biologique et sont généralement présentes à des très faibles concentrations⁶⁰. Les céramides sont parmi les classes lipidiques les plus diverses et complexes. Ils diffèrent par la micro-hétérogénéité structurale due de la longueur de chaîne d'acide gras et de la base sphingoïde, du nombre d'hydroxylation, du degré d'insaturation et de l'isomérisation. Pour ces raisons, le suivi de l'évolution des lipides de l'épiderme et la caractérisation moléculaire représentent un véritable défi analytique et nécessitent une méthode d'analyse très efficace.

La chromatographie en couche mince (TLC) a été utilisée depuis longtemps pour séparer les classes de lipides et les sous-classes de céramides^{61, 62} mais cette technique ne permet pas de séparer tous ces lipides en tenant compte de leur micro-hétérogénéité en une seule analyse³. Ainsi, pour un échantillon inconnu, les informations obtenues par cette technique seule concernant la composition moléculaire et la structure fine des lipides restent faibles et incomplètes⁶³.

Les céramides sont rarement analysés en chromatographie en phase gazeuse (GC)³⁹. Ce sont des molécules non volatiles, ainsi leur analyse en chromatographie en phase gazeuse (GC) nécessite leur dérivation^{39, 60, 64}. De plus, la séparation des lipides en GC en utilisant une phase stationnaire apolaire (séparation selon les longueurs des chaînes) est incomplète dans le cas d'un mélange aussi complexe de lipides. Les phases stationnaires polaires permettent de séparer les lipides selon leur tête polaire. En GC, la phase stationnaire polaire est moins robuste et thermiquement plus fragile qu'une phase apolaire⁶⁵. Dans ce cas, certains lipides qui nécessitent une température très élevée pour être élués sont impossibles à analyser en phase stationnaire polaire⁶⁵. De plus, dans le cas du couplage GC/MS, certains analyseurs tels que le quadripôle

ou bien la trappe ionique ne permettent pas de détecter les ions présentant un rapport masse/charge (m/z) supérieur à 1000 g/mol ⁶⁵, ce qui est le cas d'une grande partie des lipides épidermiques.

Ces techniques ont été remplacées par la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) appliquée à l'analyse des lipides de la peau et aux céramides ⁶⁶. Cette méthode a été souvent considérée comme une technique de référence, utilisée pour démontrer les altérations des lipides totaux de la barrière cutanée ou même les perturbations des céramides dans le cas du vieillissement, de la sécheresse ou d'une maladie de la peau humaine ⁶³. Cependant, ces techniques analytiques prennent beaucoup de temps et une grande quantité d'échantillon est nécessaire, ce qui n'est pas toujours disponible ³.

Au cours de ces dernières années, le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse (LC-MS) a été développé. Ce couplage a donné un profil beaucoup plus détaillé de chaque sous-classe individuelle en utilisant uniquement de petites quantités d'échantillon ^{3, 39, 67}. De nombreux progrès analytiques ont été réalisés ⁶⁸, permettant la séparation et la caractérisation des lipides épidermiques mais souvent ils se limitent aux classes et/ou aux sous-classes de lipides. En plus de la grande différence de polarité entre les classes et le grand nombre de molécules, la micro-hétérogénéité structurale au sein de chaque classe ou sous-classe peut être considérée comme une source de complexité dans la caractérisation d'un tel mélange lipidique. Bien que plusieurs études aient établi une méthode analytique des lipides totaux ⁶⁹, ces techniques parfois ne sont pas spécifiques de l'analyse du lipidome de l'épiderme humain (acides gras libres, cholestérol, glycérides, céramides, glucosylcéramides, sphingomyélines et phospholipides.) La particularité de ce lipidome est que la majorité des classes lipidiques sont des céramides. Cette classe peut être composée de 16 sous-classes basées sur la polarité de la tête polaire. Contrairement aux céramides trouvés dans d'autres régions du corps, les céramides de la couche cornée présentent une très importante variété de structures ⁷⁰.

La notion de LC-MS recouvre un champ très vaste de techniques qui dépendent de plusieurs éléments. Concernant la partie LC, le choix de la phase stationnaire utilisée pour séparer les lipides dépend surtout du but de l'analyse.

La phase normale (NP-HPLC) permet de séparer les molécules en fonction de leur tête polaire et donc séparer les différentes classes de lipides (leur tête polaire peut définir leur classe). Cette phase a été largement utilisée pour séparer les différentes sous-classes de céramides qui diffèrent par leur polarité ^{39, 71}. En plus, les différentes sous-classes de phospholipides ont été également bien séparées en utilisant la phase normale ⁷². Par contre en phase inverse (RP-HPLC), la rétention des molécules lipidiques est principalement régie par l'étendue de l'interaction entre la partie hydrocarbonée de la molécule et de la chaîne alkyle de la phase stationnaire alors que la nature du groupement polaire (lorsqu'il existe) joue un rôle mineur ⁷³. Cela

signifie que les techniques en RP-HPLC constituent le meilleur choix pour séparer les molécules qui ont un degré de polarité identique ou très proche mais qui diffèrent par leur longueur de chaîne hydrocarbonée. La RP-HPLC a été utilisée surtout pour séparer les différentes espèces au sein d'une même sous-classe de céramides⁶³. De plus, elle est utile pour séparer les différents types d'acides gras selon la longueur de leur chaîne alkyle et leur degré d'insaturation³⁹.

La Chromatographie à Interaction Hydrophile (HILIC) est appropriée pour la séparation de composés hydrophiles et ionisables⁶⁹. Elle utilise une grande diversité des phases stationnaires y compris les phases polaires couramment utilisées en NP-HPLC associées à une phase mobile hydro-organique proche de celles utilisées en RP-HPLC^{111,112}. Le mode HILIC¹¹³ semble convenir également pour une séparation des lipides de polarité moyenne (tels que les céramides). Cependant, le pourcentage d'eau dans la phase mobile pendant la séparation HILIC peut varier (5 à 40%) et un minimum de 2% est essentiel pour maintenir une couche d'eau en surface dans laquelle les analytes peuvent se répartir¹¹⁴.

Ainsi, dans le cas d'un extrait lipidique total, le mode HILIC ne permet pas de tenir compte de la complexité et de la polarité globale de l'échantillon¹¹⁵. Les lipides les plus apolaires ne peuvent pas être retenus dans des conditions HILIC.

La Chromatographie Supercritique (SFC) offre à la fois efficacité et vitesse d'analyse. Le CO₂ supercritique a une polarité comprise entre celle de l'hexane et du dichlorométhane¹¹⁶ permettant l'élution des lipides apolaires comme les triglycérides ainsi que les lipides moyennement polaires. Utilisé pur, le CO₂ supercritique ne permet pas l'élution des composés les plus polaires comme les phospholipides; cependant sa force éluant peut être modulée par l'ajout de modificateur polaire comme le méthanol et ainsi permettre l'élution de ces derniers. Cependant la SFC nécessite un équipement spécifique.

Lorsque l'échantillon lipidique est extrêmement complexe, l'analyse unidimensionnelle devient insuffisante. La tendance est d'améliorer le pouvoir discriminant du système chromatographique en ajoutant une étape de séparation supplémentaire avant l'entrée du détecteur (spectromètre de masse). La chromatographie liquide bidimensionnelle (2D LC x LC) a été développée pour la séparation complète et simultanée des classes et des espèces de lipides¹¹⁷. Dans la plupart des cas, HILIC ou NP-LC est utilisé dans la première dimension pour fractionner différentes classes de lipides suivi par l'analyse des fractions collectées par RP-LC dans la seconde dimension. Cependant, cette approche est plus laborieuse et prend plus de temps, impliquant les étapes suivantes: collecte de chaque fraction, puis évaporation du solvant, remise en suspension des extraits secs dans le (s) solvant (s) compatible (s) avec la colonne LC de seconde dimension, et, enfin, analyse de chaque fraction à l'aide d'une deuxième méthode LC. Par ailleurs, la

résolution chromatographique dans la deuxième dimension dépend du temps d'échantillonnage effectué lors de la première dimension (typiquement par fraction de 1 min)¹¹⁸. Ainsi le temps global d'analyse peut augmenter de manière significative lors de l'utilisation de la 2D-LC hors ligne (de l'ordre de 2 h par analyse unique).

En considérant l'ensemble de ces caractéristiques spécifiques, nous avons décidé d'utiliser une chromatographie liquide à phase normale (NP-HPLC) qui semble être le meilleur choix après optimisation pour séparer l'ensemble des lipides épidermiques qui diffèrent tout d'abord par leur tête polaire, avec une élution commençant par les lipides les moins polaires (triglycérides) et jusqu'aux lipides les plus polaires (sphingomyélines).

Les mélanges lipidiques complexes conduisent à des chromatogrammes facilement interprétables au niveau des classes lipidiques. Même si les espèces moléculaires de la même classe sont co-éluées dans un seul pic chromatographique, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (MS) est le moyen habituel d'accéder à l'identification des espèces moléculaires⁷⁴.

Le couplage avec la spectrométrie de masse (MS), a permis d'identifier et caractériser les structures fines des molécules séparées. Par exemple, cette technique (LC-MS) a permis de découvrir de nouvelles sous-classes de céramides au niveau du SC, telle que la sous-classe de Cer estérifiés (EOdS) dont l'équipe de Smeden a pu confirmer la présence dans le SC humain³.

Concernant le couplage avec la MS, le choix de la source d'ionisation utilisée dans ce couplage (ESI, APCI, APPI), et l'analyseur jouent un rôle important dans la caractérisation moléculaire. Durant ces dernières années, plusieurs études ont été réalisées pour analyser et identifier les lipides en général et les sous-classes des céramides en particulier en utilisant surtout RP-HPLC/(ESI)MS^{75, 63}, RP-HPLC/(APCI)MS⁷⁶, NP-HPLC/(APCI)MS^{77, 71}, NP-HPLC/(ESI)MS^{67, 76, 72}, NP-HPLC/(APPI)MS⁷³.

3.1.1- Systèmes de détection couplés à l'analyse chromatographique

a) La spectrométrie de masse (MS)

Depuis plusieurs années, la spectrométrie de masse a été largement utilisée afin d'analyser et caractériser les lipides⁷⁸. C'est l'une des techniques permettant de déterminer les masses moléculaires des composés, les caractériser et les identifier⁷⁹. Cette technique est basée sur l'analyse des molécules sous forme d'ions, à ce titre il faut une source d'ionisation capable de générer les ions, puis un analyseur qui assure la séparation de ces derniers en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), et finalement un détecteur. La

spectrométrie de masse est souvent couplée avec des techniques séparatives telle que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide.

- **La source d'ionisation**

Le choix du mode d'ionisation utilisé en analyse LC-MS joue un rôle majeur dans le profil lipidomique qui sera obtenu. Plusieurs sources d'ionisation existent et le choix de chaque source dépend des propriétés physicochimiques de molécules à analyser. L'ionisation par impact électronique est la plus ancienne. Elle est adaptée pour les molécules stables à température élevée, de masse moléculaire faible et facilement volatilisables. Cette source génère un grand nombre d'ions ce qui peut compliquer le traitement de données et surtout dans le cas d'analyse de mélanges complexes. Il existe d'autres sources d'ionisation plus douces qui conduisent à générer peu de fragmentations, telle que les sources suivantes : l'ionisation par électrospray (électro-nébulisation) (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI)⁷⁹. Ces sources ont montré une efficacité très élevée dans la caractérisation des lipides^{67, 76, 71, 72}. L'APPI, a été développée afin d'étendre les domaines de l'application de l'APCI, et surtout pour analyser les molécules peu polaires, qui s'analysent mal en APCI ou en ESI^{80, 81}. Même pour les molécules polaires, cette source a montré une sensibilité élevée à ioniser la plupart de ces molécules⁸². L'APPI est adaptée au couplage d'une technique de séparation en phase liquide avec la spectrométrie de masse (LC-MS). Plusieurs études ont montré que l'APPI a une sensibilité comparable ou plus élevée par rapport à l'APCI⁸³. Elle a montré une meilleure sensibilité pour les lipides de concentration faible⁷⁴. Ainsi, les signaux générés par cette source sont les plus stables parmi les trois sources d'ionisation⁶⁰. De plus, la source APPI semble être une méthode intéressante pour recueillir autant d'informations que possible sur une large plage de polarité des lipides présents dans les échantillons⁷³. Au vu de ces avantages, le couplage LC-APPI(MS) semble être le meilleur choix pour analyser les lipides épidermique de large plage de polarité avec une capacité de générer peu de ions ce qui rend la caractérisation de ce mélange complexe des lipides est plus efficace. De plus, compte tenu de sa sensibilité élevée pour les lipides de faible concentration⁷⁴, cette source sera donc le meilleur choix pour les sous-classes de céramides estérifiés qui se trouvent biologiquement à de faibles concentrations mais qui jouent un rôle important dans la fonction de barrière cutanée⁶.

En se référant à la Figure 3-1, la source APPI est compatible avec toute la gamme de polarité et de masses moléculaires correspondant à l'ensemble des lipides d'intérêt pour nos travaux de recherche.

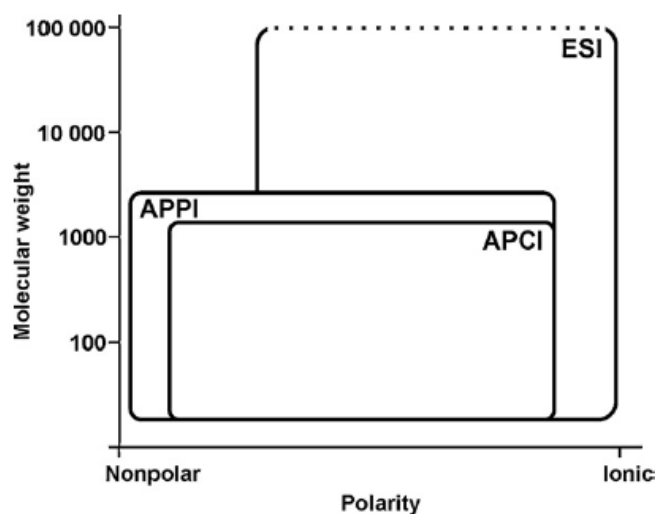


FIGURE 3-1 : Schéma général d'application des sources d'ionisation (APPI, APCI, ESI) pour l'analyse des petites molécules en fonction de leur polarité et leur masse moléculaire ¹¹⁹.

La source APPI est basée sur le principe d'interaction entre les molécules à analyser et les photons émis par la lampe UV à une énergie suffisante pour permettre d'ioniser les molécules souhaitées (photoionisation). Si les photons sont absorbés par des molécules dont l'énergie d'ionisation est inférieure à l'énergie des photons, l'ionisation des molécules peut se produire. Une autre voie de réaction peut avoir lieu, si un gaz vecteur comme l'azote est utilisé, qui absorbe fortement le rayonnement UV, dans ce cas-là le gaz ionisé transfère sa charge aux molécules à ioniser ⁸⁴. (Figure 3-2).

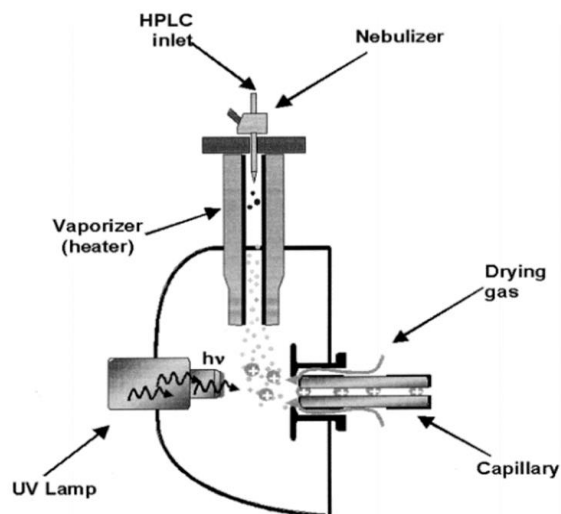


FIGURE 3-2 : Schéma simplifié d'une source APPI ⁸³

- **L'analyseur**

La séparation des ions est assurée par un/des analyseurs. Les analyseurs sont généralement comparés sur la base de quatre critères technologiques : la résolution, la vitesse nécessaire pour acquérir un spectre, la gamme de rapports masse/charge balayée et la transmission^{85, 65}. Ces critères doivent être soigneusement évalués par rapport à l'objectif final d'une étude⁸⁵. Il existe plusieurs types d'analyseurs comme : le filtre quadripolaire(Q), la trappe à ions, le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR), et l'Orbitrap. Chacun de ces analyseurs a son point fort, ce qui conduit à utiliser parfois des instruments hybrides. Parmi ceux-ci, le triple quadripôle, le quadripôle-TOF (Q-TOF), la trappe à ions-Orbitrap et le quadripôle-Orbitrap (Q-Orbitrap) qui sont les plus populaires⁸⁵.

La résolution est la capacité que présente un spectromètre de masse à distinguer des ions présentant des rapports m/z voisins mais différents. Elle traduit la précision sur la mesure des rapports m/z des ions, c'est-à-dire le nombre de chiffres accessibles après la virgule pour déterminer la masse chimique exacte et donc la formule d'une molécule donnée. Dans le but de la caractérisation structurale fine des classes et sous-classes des lipides, il faut absolument un analyseur qui offre une résolution très élevée avec une gamme large de m/z (de 150 de 2000 m/z). Les analyseurs quadripolaires assurent une vitesse d'analyse élevée mais avec une résolution faible⁶⁵ ainsi la gamme des ions est limitée à 1250 m/z⁸⁵. Les analyseurs de masse TOF offrent une résolution de masse inférieure à celle des analyseurs de masse à transformée de Fourier (FTICR et Orbitrap), mais ils présentent l'avantage de ne pratiquement pas avoir de limite de m/z et donc ils sont particulièrement utiles pour identifier les ions chargés individuellement de masse moléculaire très élevée⁸⁵. Les analyseurs FT-ICR constituent les premiers analyseurs de spectrométrie de masse à haute résolution. Le plus récent est l'Orbitrap qui est introduit depuis les années 2005⁸⁶. Ces deux détecteurs offrent une résolution très élevée car les fréquences de résonances des ions acheminés depuis la source d'ionisation peuvent être mesurées avec une grande précision. Il est alors possible de mesurer les masses exactes des ions analysés.

Pour augmenter encore la capacité de la spectrométrie de masse à obtenir des informations plus précises sur la structure des ions fragments, la spectrométrie de masse MSⁿ est donc utilisée. L'analyse en mode MS/MS nécessite d'utiliser au moins deux analyseurs, en général en MS/MS on peut sélectionner des ion(s) et les fragmenter encore afin de générer des ions fils ce qui permet d'une caractérisation plus précise⁸⁵.

Afin d'avoir une meilleure performance de la spectrométrie de masse, il faut combiner l'analyse MS/MS avec la détection des ions à haute résolution. Ce développement a impliqué le couplage d'un analyseur de masse à trappe ionique linéaire avec l'analyseur de masse Orbitrap⁸⁷. La haute résolution est assurée par l'Orbitrap, tandis que la trappe ionique permet une détection plus sensible des ions avec une capacité

d'isoler les ions et de les fragmenter ⁸⁶. Pour répondre à ces besoins, l'appareil (LTQ-Orbitrap Velos pro[®]) a été développé et sera présenté en détail dans le paragraphe suivant.

LTQ-Orbitrap Velos pro[®] (Thermo Fisher Scientific)

Cet appareil a été utilisé durant cette thèse afin de détecter et de caractériser les lipides épidermiques. C'est un spectromètre de masse hybride intégrant la trappe ionique linéaire LTQ Velos[™] et l'analyseur Orbitrap[™] ⁸⁶. Cet instrument est équipé de plusieurs analyseurs, les plus importants sont l'analyseur à trappe ionique linéaire qui sera ensuite couplé à l'Orbitrap qui est un analyseur plus performant. Cet appareil permet à la fois d'acquérir des spectres de masse en full scan et en MSⁿ. L'analyseur Orbitrap assure la haute résolution et précision de masse, par contre l'analyseur de trappe ionique linéaire assure la vitesse et la sensibilité les plus élevées (Figure 3-3).

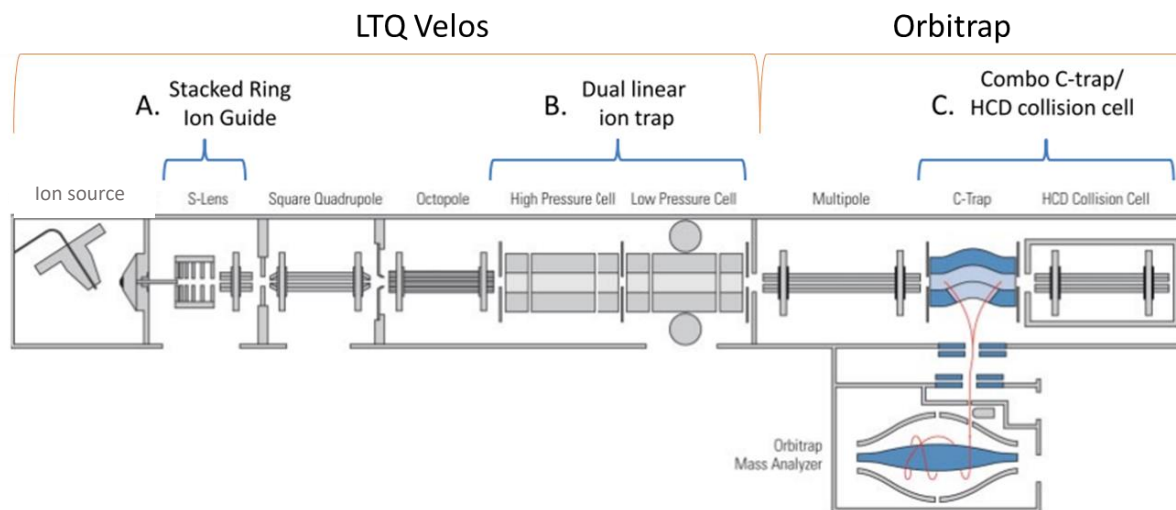


FIGURE 3-3 : Schéma de l'instrument LTQ-Velos Pro combiné avec l'Orbitrap ⁸⁸.

À la sortie de la chromatographie liquide, l'éluant qui contient les molécules à détecter va passer dans la chambre d'ionisation où se trouve la source d'ionisation APPI qui assure l'ionisation des molécules. Les ions générés ainsi sont ensuite transmis vers une lentille S qui capte, concentre et transmet les ions avec une sensibilité élevée vers l'analyseur. L'analyseur de trappe ionique linéaire est à double pression, composé de deux cellules : une cellule à haute pression optimisée pour capter le maximum des ions, et permet durant l'analyse MS/MS d'isoler et fragmenter les ions ciblés (mode Collision-Induced Dissociation CID). La deuxième cellule est à basse pression optimisée pour diminuer la collision des ions. La

combinaison de ces deux cellules a permis des taux d'acquisition plus rapides sans diminuer la qualité spectrale⁸⁸. Pour obtenir des informations structurales, des techniques de fragmentation supplémentaires ont été mises en œuvre et ont nécessité l'ajout d'un nouveau multipôle (HCD collision cell) qui assure la dissociation induite par collision en utilisant une énergie plus élevée (mode High energy Collision Dissociation HCD)⁸⁶. Les deux modes de fragmentation CID et HDC ont le même principe qui repose sur la collision avec un gaz inerte pour fragmenter les molécules. Le mode CID est une technique d'excitation en mode résonnant. Ainsi, pour atteindre une certaine énergie de collision, les ions doivent être accélérés relativement lentement de leur énergie cinétique de départ à l'énergie cinétique finale. Ils entrent donc plusieurs fois en collision avec le gaz inerte pendant le processus d'excitation. Chacune de ces collisions peut "chauffer" ou "refroidir" l'ion. En excitation résonante seuls les ions précurseurs sont accélérés et se fragmentent en ions fils. Les ions fragments sont quant à eux « thermalisés » lorsqu'ils entrent en collision avec le gaz. Cependant, le mode HCD est une technique de dissociation non résonnante. Le mode HCD est une variation du mode CID qui utilise une tension de radiofréquence plus élevée pour retenir les ions de fragments dans le piège C-trap. La cellule HCD est utilisée pour fragmenter les ions, après quoi ils sont accélérés, refroidis et stockés à l'intérieur du C-trap. Les ions fils produits restent excités et ne subissent pas suffisamment de collisions pour les « refroidir », ce qui signifie que s'ils entrent en collision avec des molécules de gaz, ils peuvent se fragmenter par la suite. La cellule HCD est combinée avec un dispositif de stockage externe le (C-trap) qui accumule les ions avant leur passage vers l'orbitrap⁸⁶ (Figure 3-3). Ce dernier est un analyseur composé de deux électrodes externes et d'une électrode centrale, qui lui permettent d'agir à la fois comme analyseur et détecteur. Les ions injectés dans l'Orbitrap sont piégés électrostatiquement en tournant et oscillant autour de l'électrode centrale. Les ions oscillants induisent des signaux sur les électrodes extérieures qui sont convertis en fréquences par Transformation de Fourier. Les fréquences, caractéristiques de chaque valeur ionique (m/z) sont enfin converties en spectre de masse. LTQ-Orbitrap est un instrument hybride combine la sensibilité et vitesse du LTQ avec la grande précision de masse et la haute résolution d'Orbitrap^{89, 86}.

b) Autres détecteurs : le détecteur d'aérosols chargés (Corona-CAD[®])

On a présenté précédemment le couplage (LC) avec la spectrométrie de masse (MS) qui a une capacité très élevée à détecter et caractériser les structures fines des molécules lipidiques après leur séparation en LC. Les paramètres opératoires de la MS doivent être adaptés afin que les molécules s'ionisent. Parfois, lors de l'analyse d'un échantillon complexe, un certain nombre de molécules du mélange ne pourrait pas être ionisées, ce qui conduit à un défaut d'information. Dans ce cas, l'analyse en HPLC couplée à deux détecteurs simultanément semble être très utile.

Les détecteurs autres que la MS couramment utilisés en couplage sont : le spectrophotomètre UV/Visible, le réfractomètre (RI), le détecteur de fluorescence, le détecteur à diffusion de lumière par évaporation (ELSD) et le détecteur d'aérosols chargés (Corona-CAD[®]). Chacun de ces détecteurs présente des limites pour détecter toutes les molécules présentes dans un échantillon complexe. Le détecteur UV-Visible nécessite la présence d'un chromophore ce qui n'est pas le cas pour la plupart des lipides. Le détecteur réfractomètre (RI) ne peut pas être utilisé avec une élution par gradient. Le détecteur de fluorescence nécessite que les molécules contiennent un fluorophore. Le détecteur (ELSD) a été introduit à la fin des années 1970 et la séparation des lipides en HPLC est devenue une pratique courante avec l'utilisation de ce détecteur ⁷³. Mais l'ELSD a montré une certaine variabilité de réponse inter-analytes. En 2004, le détecteur d'aérosols chargés (Corona-CAD[®]) a été introduit. C'est un détecteur universel, non optique, adapté à toutes les molécules, avec ou sans chromophore, non volatils et la plupart des analytes semi-volatils, à des niveaux inférieurs au nanogramme. La réponse obtenue est indépendante de la structure chimique des molécules analysées. Ainsi, ce détecteur est idéal pour les lipides séparés en HPLC permettant la quantification des molécules séparées. Il n'offre pas des informations structurales mais il est très utile pour observer le profil chromatographique obtenu simultanément avec les deux détecteurs MS et CAD surtout lors de l'analyse de mélanges complexes ⁷⁴.

À la sortie de la colonne LC, l'éluat est nébulisé avec du gaz vecteur N₂ pour former des gouttelettes au niveau du détecteur Corona-CAD[®]. Les grandes gouttelettes sont éliminées par le détecteur, par contre les micros gouttelettes sont transférées dans un tube de séchage afin d'éliminer la phase mobile et de former les particules analytes. Ces dernières vont entrer en collision avec le gaz N₂ chargé positivement (par un fil corona en platine) qui va transférer sa charge à ces analytes. Enfin, ces particules chargées sont transférées vers un collecteur et détectées à l'aide d'un électromètre très sensible ^{90, 91, 92} (Figure 3-4).

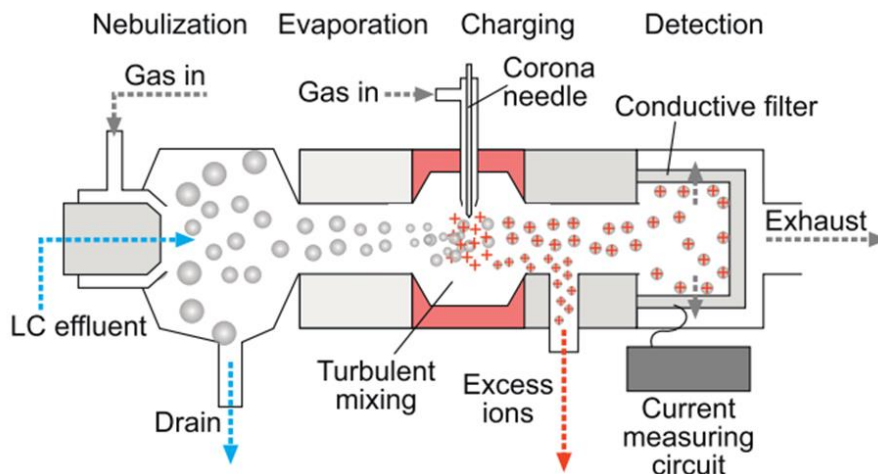


Figure 3-4 : Schéma du détecteur corona (CAD)[®] ⁹²

3.2- Analyse par spectroscopie vibrationnelle

La fonction de barrière cutanée située au niveau du SC est reliée à plusieurs paramètres : l'organisation tridimensionnelle des lipides, les structures secondaire et tertiaire des kératines, les facteurs naturels d'hydratation (NMF) et la situation des liaisons hydrogène de l'eau^{93,94}.

Au cours de ces dernières années, il y a eu une augmentation exponentielle de l'utilisation de méthodes spectroscopiques pour répondre à de nombreuses questions biologiques et biophysiques en science de la peau et en dermatologie.

La spectroscopie Raman est une technique analytique non destructive, largement utilisée afin de caractériser la fonction de barrière cutanée. Cette technique est fondée sur utilisation d'un laser qui détecte les vibrations moléculaires en créant une empreinte biomoléculaire de l'échantillon criblé⁹⁵. Chaque vibration chimique est affectée à une bande Raman spécifique (nombre d'onde en cm^{-1}), ainsi chaque échantillon biologique présente un motif spectral typique en raison de sa composition biomoléculaire inhérente^{96, 97}. Un seul spectre Raman d'une cellule peut fournir des informations détaillées sur les constituants moléculaires, y compris protéines (acides aminés et structures conformationnelles), acides nucléiques (ADN et ARN) et lipides (organisation et conformation). La microspectroscopie Raman est capable aussi de réaliser une image cartographique sur la totalité de la cellule en quelques minutes avec des centaines des spectres extraits de cette image⁹⁸.

La spectroscopie Raman, offre plusieurs avantages par rapport à la spectroscopie infrarouge (IR). Elle permet d'acquérir des spectres avec une résolution inférieure au $1\mu\text{m}$, le spectre Raman n'est pas masqué par le fort signal de la molécule d'eau ce qui n'est pas le cas en IR¹. Ces avantages confèrent à la spectroscopie Raman un potentiel très élevé en analyse des tissus biologiques comme la peau.

3.2.1- Effet Raman

Quand le rayon lumineux interagit avec une matière, plusieurs phénomènes optiques peuvent avoir lieu; parmi ces derniers, l'absorption, la transmission, et la diffusion. On peut distinguer trois types de diffusion : diffusion Rayleigh qui se produit lorsqu'il n'y a pas de changement d'énergie (diffusion élastique), cela signifie que les photons diffusés ont la même fréquence que celle des photons incidents. Par contre, la modification d'énergie entre les photons émis et celle de photons incidents est appelée la diffusion inélastique qui constitue l'effet Raman. Si l'énergie des photons diffusés est plus faible par rapport aux photons incidents, la diffusion Stokes se produit, et dans le cas contraire, la diffusion anti-Stokes peut avoir lieu¹. (Figure 3-5)

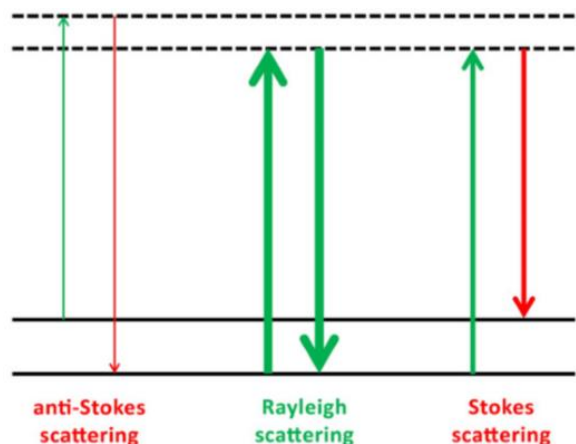


FIGURE 3-5: Trois types de diffusion du rayon incident. Rayleigh : pas de changement d'énergie. Stockes : énergie diffusée plus faible par rapport à l'énergie incidente, et anti-Stockes : énergie diffusée plus élevée par rapport à l'énergie incidente. La probabilité d'apparence de chaque type de diffusion est mentionnée par l'épaisseur de chaque flèche ¹.

3.2.2- Microspectroscopie Raman pour la caractérisation des lipides épidermiques

Au niveau du SC, les cornéocytes sont entourés par une matrice lipidique hautement organisée. L'organisation de ces lipides joue un rôle essentiel dans l'obtention d'une bonne fonction de la barrière cutanée. Les lipides de ce ciment intercornéocytaire (céramides, acides gras et cholestérols) sont organisés sous forme des lamelles. Au sein des lamelles lipidiques, les lipides ont une organisation latérale dense (orthorhombique), bien qu'une sous-population des lipides puisse être moins dense dans une organisation hexagonale ^{55, 99}.

- **Conformation et organisation des lipides**

La spectroscopie Raman a largement été utilisée afin d'obtenir des informations sur l'organisation et la conformation des lipides épidermiques ⁹⁴. À ce sujet plusieurs descripteurs sont utilisés :

- Le rapport d'intensité des bandes $\nu(\text{CH}_2)_{\text{asymétrique}} 2882 \text{ cm}^{-1} / \nu(\text{CH}_2)_{\text{symétrique}} 2852 \text{ cm}^{-1}$ peut servir comme un indicateur du degré d'organisation et des interactions latérales des chaînes alkyles des lipides. Des valeurs élevées indiquent un contenu trans élevé et une organisation compacte des lipides ^{94, 100, 101}. Une diminution de ce rapport a été observée dans la peau atopique ce qui traduit une altération de l'organisation de la matrice lipidique ¹⁰².

- La vibration δ (CH₂) à 1298 cm⁻¹ : la position de cette bande est très sensible aux désordres conformationnels des lipides. Une position vers un nombre d'onde plus élevé est associée à une augmentation de ces désordres et une augmentation de la conformation de type gauche ^{94, 100}.
- Les modes de vibration de type ν (C-C) entre 1040-1145 cm⁻¹, sont des indicateurs de la conformation trans/gauche. La conformation trans est représentée par les bandes à 1062 cm⁻¹ (asymétrique) et 1130 cm⁻¹ (symétrique), par contre la conformation gauche est représentée par les bandes 1083-1096 cm⁻¹. Le calcul du ratio d'intensité 1060+1130 cm⁻¹/ 1080 cm⁻¹ permet d'étudier la conformation trans/gauche. Une valeur élevée de ce rapport est liée à une organisation compacte des lipides ^{94, 100, 101, 103, 104}. En revanche une diminution de ce rapport (augmentation de conformation gauche) peut être un indice d'altération de la fonction barrière comme c'est le cas dans la peau atopique ¹⁰².
- Les vibrations de cisaillement δ CH₂ (1455–1480 cm⁻¹) sont liées à l'état de l'organisation latérale des lipides (ordre orthorhombique, ordre hexagonal, et désordonné) ¹⁰⁰. Cependant, le signal des protéines comme la kératine contribue dans cette zone spectrale ce qui rend difficile son exploitation pour décrire l'organisation des lipides ¹⁰⁵.

En plus de ces descripteurs de l'organisation et conformation des lipides, il existe d'autres descripteurs lipidiques qui sont également très utilisés dans le domaine cutané.

- Le rapport d'intensité de bandes caractéristiques des lipides (2800-2870cm⁻¹) sur les bandes caractéristiques des protéines (2900-2970 cm⁻¹) a été évalué au niveau du SC. Ce rapport a montré son utilité comme l'un des descripteurs de la peau atopique ¹⁰⁶. Une diminution de ce ratio (lipides/ protéines) a été remarquée dans la peau atopique, ce qui peut montrer la présence de modifications au niveau de la matrice lipidique et donc une altération de la fonction barrière ^{102, 106}.
- L'intensité de la bande à 2850 cm⁻¹ correspond au $\nu_{\text{symétrique}}$ (CH₂) des lipides ^{93, 94, 107}. Au stade terminal de la différenciation des kératinocytes, une augmentation très forte de l'intensité de ce pic a été observée ¹⁰⁸ révélant la formation de la matrice lipidique.
- L'évolution des lipides insaturés par rapport aux lipides saturés a également été évaluée. Des informations sur le degré d'insaturation des chaînes lipidiques peuvent être obtenues à partir du rapport de l'intensité des bandes autour de 1650-1665 cm⁻¹, qui correspond à l'élongation ν (C=C) et qui est proportionnelle à la quantité de liaisons C=C insaturées / l'intensité de la bande à 1440

cm^{-1} qui correspond aux vibrations de cisaillement δ (CH_2) et qui est proportionnelle à la quantité de liaisons C – C saturées ¹⁰¹. En plus, l'évolution de l'intensité de la bande à 3020 cm^{-1} liée à la vibration ($\nu =\text{C-H}$) peut fournir également des informations sur l'insaturation des chaînes lipidiques ¹⁰⁹.

3.2.3- Autres domaines d'utilisation de la spectroscopie Raman en lien avec la fonction barrière cutanée

- **La caractérisation des protéines épidermiques** : la structure secondaire de protéines peut être évaluée par le calcul du rapport d'intensité des bandes (hélices α autour de 1656 cm^{-1} + feuillets β autour de 1672 cm^{-1}) / amide I ($1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$) ¹⁰². Une augmentation de ce ratio a été observée dans la peau atopique par rapport à la peau saine, révélant une modification de la conformation des protéines dans la peau atopique ¹⁰².
- **L'hydratation de la peau** : la qualité de l'hydratation peut être évaluée par la mesure de l'intensité de la vibration νOH (total) de 3100 cm^{-1} à 3620 cm^{-1} et celle de νOH (lié) de 3245 cm^{-1} à 3420 cm^{-1} ¹⁰². Le ratio de l'intensité de la bande νOH total (de 3100 cm^{-1} à 3620 cm^{-1}) / l'intensité de la bande νCH de (2800 à 3000 cm^{-1}) est caractéristique de la quantité totale de l'eau. Une diminution de ce rapport a été observée dans la peau atopique ce qui montre la perte de l'eau.
- La quantité de l'eau liée est analysée par le rapport de la bande νOH (lié) de 3245 cm^{-1} à 3420 cm^{-1} / la bande νCH de 2800 à 3000 cm^{-1} . Une diminution significative de ce rapport dans la peau atopique a été observée révélant une diminution de l'eau fonctionnelle dans le SC ainsi qu'une altération de l'interaction des molécules d'eau avec les facteurs naturels d'hydratation et les protéines ¹⁰².
- **La mesure de l'épaisseur d'un échantillon donné** : l'épaisseur d'un échantillon donné peut être mesurée en utilisant la spectroscopie Raman. Les profils spectraux ont été obtenus à partir de l'aire sous la courbe (AUC pour « area under curve ») d'une bande bien déterminée par exemple (1004 cm^{-1} spécifique de la phénylalanine). Lorsque le point de collecte est en dehors de la surface de l'échantillon, le signal est proche de zéro. Lors de la mesure au niveau de la surface, les spectres collectés présentent des valeurs AUC plus élevées. Pour des mesures en profondeur, cette AUC diminue par perte de signal liée à la perte de photons focalisés et de photons rétrodiffusés. La focalisation au-delà de la face inférieure de l'échantillon se traduit par une chute de l'AUC. De

cette manière, les positions des surfaces externe et inférieure de cet échantillon sont considérées à mi-hauteur externe et interne du maximum. La distance mesurée entre les deux positions donne l'épaisseur de l'échantillon ¹¹⁰.

3.2.4- Microspectroscopie Raman pour suivre la différenciation des kératinocytes

Certains descripteurs cités au-dessus peuvent être appliqués sur les modèles cellulaires en 2D et 3D afin de suivre la différenciation des kératinocytes *in vitro*. Les modifications et les marqueurs biomoléculaires survenus lors de cette différenciation peuvent être suivis en microspectroscopie Raman.

- Les images spectrales (images en pseudo-couleurs) ont la capacité de fournir plusieurs informations au niveau cellulaire (particulièrement en culture 2D). Par exemple, en suivant le rapport lipides (2800-2870 cm^{-1}) / protéines (2900-2970 cm^{-1}) nous pouvons déterminer l'évolution de la localisation des lipides au sein de la cellule. À priori, la quantité de lipides (principalement les phospholipides) sera élevée au niveau de la membrane cellulaire pour les étapes précoces de la différenciation. Plus loin dans la différenciation, la biosynthèse des lipides (principalement les céramides) va évoluer au niveau du cytoplasme (Réticulum Endoplasmique). Au dernier stade, une valeur élevée de ce rapport traduit une quantité élevée de lipides liée à la formation de la matrice lipidique extracellulaire au niveau du SC.
- Les cellules cornéocytaires sont des cellules sans noyau. Le suivi de l'intensité des bandes spécifiques de l'ADN sera utile à évaluer. Une intensité faible indique une quantité faible d'acides nucléiques et donc un stade bien avancé dans la différenciation (SC). En plus les images spectrales du rapport ADN sur d'autres contenus cellulaires comme les lipides par exemple peut aussi nous permettre de déterminer une différenciation terminale sans utiliser des méthodes histologiques.
- Au niveau du SC, le taux de kératine est très élevé. L'utilisation de la microspectroscopie Raman va permettre de suivre l'évolution des bandes caractéristiques de la kératine tout au long de la différenciation. Une intensité élevée indique une quantité élevée de kératine et donc un stade bien avancé de la différenciation.
- Au sein des modèles cellulaires en 3D, le modèle cellulaire de l'épiderme reconstruit (RHE) est composé des différentes couches épidermiques (basale, épineuse, granuleuse et cornée). Grâce à la microspectroscopie Raman confocale, il est possible de mesurer l'épaisseur de ce modèle et de

suivre son évolution tout au long du processus de la différenciation, ce qui participe à une meilleure caractérisation de ce modèle cellulaire.

- La microspectroscopie Raman permet de superposer les spectres extraits à partir d'un échantillon à analyser avec des spectres de référence comme des spectres de céramides, kératine, ADN, Des méthodes de traitement du signal spectral relativement simples comme la régression linéaire classique par les moindres carrés (CLS fitting) permettent de produire des images en pseudo couleurs basées sur la variation du coefficient attribué à chaque spectre de référence. Ce type d'analyse permet de fournir des informations sur la quantité relative et la localisation des molécules utilisées en référence. De plus, en utilisant des spectres de référence du SC, SG... nous aurons la capacité d'observer la répartition des différentes couches au sein de l'épiderme. Cette démarche nous permet de mieux caractériser le modèle cellulaire et de mieux déterminer l'étape de la différenciation.

Références associées à la partie bibliographique

1. Franzen, L.; Windbergs, M., Applications of Raman spectroscopy in skin research--From skin physiology and diagnosis up to risk assessment and dermal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2015**, *89*, 91-104.
2. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 422-434.
3. Smeden, J. v. A Breached Barrier: Analysis of stratum corneum lipids and their role in eczematous patients. university of Leiden 2013.
4. Laplante, A. mécanismes de réépithélialisation des plaies cutanées : expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide de nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire. laval 2002.
5. Eckhart, L.; Lippens, S.; Tschachler, E.; Declercq, W., Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1833* (12), 3471-3480.
6. van Smeden, J.; Bouwstra, J. A., Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current problems in dermatology* **2016**, *49*, 8-26.
7. Meckfessel, M. H.; Brandt, S., The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2014**, *71* (1), 177-84.
8. Holleran, W. M.; Man, M. Q.; Gao, W. N.; Menon, G. K.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *The Journal of clinical investigation* **1991**, *88* (4), 1338-45.
9. Sahle, F. F.; Gebre-Mariam, T.; Dobner, B.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H., Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin pharmacology and physiology* **2015**, *28* (1), 42-55.
10. Micallef, L. Effets du calcium extracellulaire sur la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire. Etude comparative entre des kératinocytes normaux humains et la lignée cellulaire HaCaT. . 'UNIVERSITE DE LIMOGES 2009.
11. Alexandre Mélissopoulos, C. L., *la peau: structure et physiologie* 2012; p 272
12. Arda, O.; Goksugur, N.; Tuzun, Y., Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology* **2014**, *32* (1), 3-13.
13. Jamot, M. Les aquaporines dans l'épiderme humain : expression, localisation et modifications au cours de la différenciation. Biologie cellulaire. Université Paris Sud, 2011.
14. Kanitakis, J., Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD* **2002**, *12* (4), 390-9; quiz 400-1.
15. Breiden, B.; Sandhoff, K., The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1841* (3), 441-52.
16. Jobeili, L. Évolution de modèles tridimensionnels de peau reconstruite pour approfondir la connaissance des mécanismes du vieillissement cutané et validation de l'efficacité " anti-âge " du sélénium. Biotechnologie. . Université de Lyon, 2018.
17. Kypriotou, M.; Huber, M.; Hohl, D., The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol* **2012**, *21* (9), 643-9.
18. Gandarillas, A., Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Experimental gerontology* **2000**, *35* (1), 53-62.
19. Fukuyama, K.; Inoue, N.; Suzuki, H.; Epstein, W. L., Keratinization. *International journal of dermatology* **1976**, *15* (7), 473-89.
20. Deyrieux, A. F.; Wilson, V. G., In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* **2007**, *54* (2), 77-83.
21. Fuchs, E., Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Journal of cell science. Supplement* **1993**, *17*, 197-208.
22. Blanpain, C.; Fuchs, E., Epidermal stem cells of the skin. *Annual review of cell and developmental biology* **2006**, *22*, 339-73.
23. Fuchs, E., Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* **1990**, *111* (6 Pt 2), 2807-14.
24. Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Ponc, M., Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* **2003**, *42* (1), 1-36.
25. Lampe, M. A.; Williams, M. L.; Elias, P. M., Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J Lipid Res* **1983**, *24* (2), 131-40.

26. Pedrosa, T. D. N.; Catarino, C. M.; Pennacchi, P. C.; Assis, S. R.; Gimenes, F.; Consolaro, M. E. L.; Barros, S. B. M.; Maria-Engler, S. S., A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2017**, *42*, 31-37.
27. Green, H., Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* **1977**, *11* (2), 405-16.
28. Niehues, H.; Bouwstra, J. A.; El Ghalbzouri, A.; Brandner, J. M.; Zeeuwen, P.; van den Bogaard, E. H., 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Exp Dermatol* **2018**, *27* (5), 501-511.
29. Ponec, M.; Boelsma, E.; Weerheim, A., Covalently bound lipids in reconstructed human epithelia. *Acta Derm Venereol* **2000**, *80* (2), 89-93.
30. Weil, M.; Raff, M. C.; Braga, V. M., Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol* **1999**, *9* (7), 361-4.
31. OCDE, Test No. 439: *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*. 2020.
32. Schoop, V. M.; Mirancea, N.; Fusenig, N. E., Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **1999**, *112* (3), 343-53.
33. Maas-Szabowski, N.; Starker, A.; Fusenig, N. E., Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *Journal of cell science* **2003**, *116* (Pt 14), 2937-48.
34. Smits, J. P. H.; Niehues, H.; Rikken, G.; van Vlijmen-Willems, I.; van de Zande, G.; Zeeuwen, P.; Schalkwijk, J.; van den Bogaard, E. H., Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 11838.
35. Micallef, L.; Belaubre, F.; Pinon, A.; Jayat-Vignoles, C.; Delage, C.; Charveron, M.; Simon, A., Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* **2009**, *18* (2), 143-51.
36. Wilson, V. G., Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* **2013**, *1195*, 33-41.
37. Nathalie Alépée, M.-H. G., José Cotovio, Usefulness of the EpiSkin™ reconstructed human epidermis model within Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. *Toxicology in Vitro* **2018**
38. Mazzoleni, G.; Di Lorenzo, D.; Steimberg, N., Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research? *Genes & nutrition* **2009**, *4* (1), 13-22.
39. van Smeden, J.; Boiten, W. A.; Hankemeier, T.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Vreeken, R. J., Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1841* (1), 70-9.
40. Ansari, M. N.; Nicolaides, N.; Fu, H. C., Fatty acid composition of the living layer and stratum corneum lipids of human sole skin epidermis. *Lipids* **1970**, *5* (10), 838-45.
41. Peter M.Elias, K. R. F., *Skin Barrier*. London 2006; p 634.
42. Feingold, K. R.; Jiang, Y. J., The mechanisms by which lipids coordinately regulate the formation of the protein and lipid domains of the stratum corneum: Role of fatty acids, oxysterols, cholesterol sulfate and ceramides as signaling molecules. *Dermato-endocrinology* **2011**, *3* (2), 113-8.
43. Elias, P. M., Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* **2005**, *125* (2), 183-200.
44. Denning, M. F.; Kazanietz, M. G.; Blumberg, P. M.; Yuspa, S. H., Cholesterol sulfate activates multiple protein kinase C isoenzymes and induces granular cell differentiation in cultured murine keratinocytes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **1995**, *6* (12), 1619-26.
45. Borodzicz, S.; Rudnicka, L.; Mirowska-Guzel, D.; Cudnoch-Jedrzejewska, A., The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids in health and disease* **2016**, *15*, 13.
46. Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 784-90.
47. Choi, M. J.; Maibach, H. I., Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *American journal of clinical dermatology* **2005**, *6* (4), 215-23.
48. Uchida, Y.; Hara, M.; Nishio, H.; Sidransky, E.; Inoue, S.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Hamanaka, S., Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* **2000**, *41* (12), 2071-82.
49. Fluhr, J. W.; Kao, J.; Jain, M.; Ahn, S. K.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (1), 44-51.
50. Mao-Qiang, M.; Jain, M.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Secretory phospholipase A2 activity is required for permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* **1996**, *106* (1), 57-63.

51. Madison, K. C., Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* **2003**, *121* (2), 231-41.
52. Boiten, W.; Absalah, S.; Vreeken, R.; Bouwstra, J.; van Smeden, J., Quantitative analysis of ceramides using a novel lipidomics approach with three dimensional response modelling. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1861* (11), 1652-1661.
53. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1182* (2), 147-51.
54. Schmitt, T.; Neubert, R. H. H., State of the art in Stratum Corneum research: The biophysical properties of ceramides. *Chemistry and physics of lipids* **2018**, *216*, 91-103.
55. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Grone, H. J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R., 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res* **2013**, *54* (12), 3312-21.
56. Yardley, H. J.; Summerly, R., Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacology & therapeutics* **1981**, *13* (2), 357-83.
57. Kihara, A., Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *The Journal of Biochemistry* **2012**, *152* (5), 387-395.
58. van Meer, G., Cellular lipidomics. *The EMBO journal* **2005**, *24* (18), 3159-65.
59. Ishikawa, J.; Narita, H.; Kondo, N.; Hotta, M.; Takagi, Y.; Masukawa, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Koyano, S.; Yamazaki, S.; Hatamochi, A., Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* **2010**, *130* (10), 2511-4.
60. Cai, S. S.; Syage, J. A., Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for analysis of fatty acid and acylglycerol lipids. *Journal of chromatography. A* **2006**, *1110* (1-2), 15-26.
61. Wertz, P. W.; Miethke, M. C.; Long, S. A.; Strauss, J. S.; Downing, D. T., The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol* **1985**, *84* (5), 410-2.
62. Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* **1991**, *96* (4), 523-6.
63. Vietzke, J. P.; Brandt, O.; Abeck, D.; Rapp, C.; Strassner, M.; Schreiner, V.; Hintze, U., Comparative investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* **2001**, *36* (3), 299-304.
64. Bleton, J.; Gaudin, K.; Chaminade, P.; Goursaud, S.; Baillet, A.; Tchaplal, A.; Groupe de Chimie Analytique de, P.-S., Structural analysis of commercial ceramides by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **2001**, *917* (1-2), 251-60.
65. Ramos, R. G. Developpement d'outils analytiques pour l'etude du mecanisme d'action de la miltefosine (hexadecylphosphocholine) chez les leishmanies Paris Sud 2008.
66. Martini, M. C., [Biochemical analysis of epidermal lipids]. *Pathologie-biologie* **2003**, *51* (5), 267-70.
67. Masukawa, Y.; Narita, H.; Sato, H.; Naoe, A.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T., Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* **2009**, *50* (8), 1708-19.
68. Graeve, M.; Janssen, D., Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: application to exceptional marine lipids. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2009**, *877* (20-21), 1815-9.
69. Cajka, T.; Fiehn, O., Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in analytical chemistry : TRAC* **2014**, *61*, 192-206.
70. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Menon, G. K.; Legler, G.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *The Journal of clinical investigation* **1993**, *91* (4), 1656-64.
71. Farwanah, H.; Raith, K.; Neubert, R. H.; Wohlrab, J., Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Archives of dermatological research* **2005**, *296* (11), 514-21.
72. Imbert, L.; Ramos, R. G.; Libong, D.; Abreu, S.; Loiseau, P. M.; Chaminade, P., Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, *402* (3), 1169-82.
73. Imbert, L.; Gaudin, M.; Libong, D.; Touboul, D.; Abreu, S.; Loiseau, P. M.; Laprevote, O.; Chaminade, P., Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*. *Journal of chromatography. A* **2012**, *1242*, 75-83.

74. Abreu, S.; Solgadi, A.; Chaminade, P., Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *Journal of chromatography. A* **2017**, *1514*, 54-71.
75. J. -P. Vietzke, M. S. U. H., Separation and identification of ceramides in the human stratum corneum by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry and electrospray multiple-stage mass spectrometry profiling. **1999**.
76. Hinder, A.; Schmelzer, C. E.; Rawlings, A. V.; Neubert, R. H., Investigation of the molecular structure of the human stratum corneum ceramides [NP] and [EOS] by mass spectrometry. *Skin pharmacology and physiology* **2011**, *24* (3), 127-35.
77. van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res* **2011**, *52* (6), 1211-21.
78. Ryhage, R.; Stenhagen, E., Mass spectrometry in lipid research. *J Lipid Res* **1960**, *1*, 361-90.
79. Menet, M.-C., Principes de la spectrométrie de masse. *Mass spectrométrie*. **2011**.
80. Raffaelli, A.; Saba, A., Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **2003**, *22* (5), 318-31.
81. Arpino, P., Principe et applications de la source sous Photoionisation à Pression Atmosphérique (APPI) pour le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse (LC-APPI/MS). **2009**.
82. Tabrizchi, M.; Bahrami, H., Improved design for the atmospheric pressure photoionization source. *Analytical chemistry* **2011**, *83* (23), 9017-23.
83. Hanold, K. A.; Fischer, S. M.; Cormia, P. H.; Miller, C. E.; Syage, J. A., Atmospheric pressure photoionization. I. General properties for LC/MS. *Analytical chemistry* **2004**, *76* (10), 2842-51.
84. Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P., Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2000**, *72* (15), 3653-9.
85. Beccaria, M.; Cabooter, D., Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *The Analyst* **2020**, *145* (4), 1129-1157.
86. Eliuk, S.; Makarov, A., Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual review of analytical chemistry* **2015**, *8*, 61-80.
87. Schwartz, J. C.; Senko, M. W.; Syka, J. E., A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13* (6), 659-69.
88. Olsen, J. V.; Schwartz, J. C.; Griep-Raming, J.; Nielsen, M. L.; Damoc, E.; Denisov, E.; Lange, O.; Remes, P.; Taylor, D.; Splendore, M.; Wouters, E. R.; Senko, M.; Makarov, A.; Mann, M.; Horning, S., A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2009**, *8* (12), 2759-69.
89. Kalli, A.; Smith, G. T.; Sweredoski, M. J.; Hess, S., Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. *Journal of proteome research* **2013**, *12* (7), 3071-86.
90. Furota, S.; Ogawa, N. O.; Takano, Y.; Yoshimura, T.; Ohkouchi, N., Quantitative analysis of underivatized amino acids in the sub- to several-nanomolar range by ion-pair HPLC using a corona-charged aerosol detector (HPLC-CAD). *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2018**, *1095*, 191-197.
91. Dixon, R. W.; Peterson, D. S., Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging. *Analytical chemistry* **2002**, *74* (13), 2930-7.
92. Magnusson, L. E.; Risle, D. S.; Koropchak, J. A., Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *Journal of chromatography. A* **2015**, *1421*, 68-81.
93. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M. E., Human skin in vivo has a higher skin barrier function than porcine skin ex vivo-comprehensive Raman microscopic study of the stratum corneum. *Journal of biophotonics* **2018**, *11* (6), e201700355.
94. Vyumvuhore, R.; Tfyali, A.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A., Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis. *The Analyst* **2013**, *138* (14), 4103-11.
95. Pudlas, M.; Koch, S.; Bolwien, C.; Thude, S.; Jenne, N.; Hirth, T.; Walles, H.; Schenke-Layland, K., Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells. *Tissue engineering. Part C, Methods* **2011**, *17* (10), 1027-40.
96. Votteler, M.; Carvajal Berrío, D. A.; Pudlas, M.; Walles, H.; Schenke-Layland, K., Non-contact, label-free monitoring of cells and extracellular matrix using Raman spectroscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2012**, (63).

97. Chan, J. W.; Lieu, D. K., Label-free biochemical characterization of stem cells using vibrational spectroscopy. *Journal of biophotonics* **2009**, *2* (11), 656-68.
98. Ashton, L.; Hollywood, K. A.; Goodacre, R., Making colourful sense of Raman images of single cells. *The Analyst* **2015**, *140* (6), 1852-8.
99. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A., Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* **2012**, *53* (12), 2755-66.
100. Tfayli, A.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A., Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *397* (3), 1281-96.
101. Levchenko, S. M.; Qu, J., Biomolecular Component Analysis of Phospholipids Composition in Live HeLa Cells. *Biosensors* **2018**, *8* (4).
102. Verzeaux, L.; Vyumvuhore, R.; Boudier, D.; Le Guillou, M.; Bordes, S.; Essendoubi, M.; Manfait, M.; Closs, B., Atopic skin: In vivo Raman identification of global molecular signature, a comparative study with healthy skin. *Exp Dermatol* **2017**, *27* (4), 403-408.
103. Michael-Jubeli, R. Stratégies analytiques et comparaison chimométrique de mélanges lipidiques complexes : composition, caractérisation et évolutions physiologiques du film hydrolipidique cutané. Université Paris-Sud XI, 2011.
104. Quatela, A.; Miloudi, L.; Tfayli, A.; Baillet-Guffroy, A., In vivo Raman Microspectroscopy: Intra- and Intersubject Variability of Stratum Corneum Spectral Markers. *Skin pharmacology and physiology* **2016**, *29* (2), 102-9.
105. Gniadecka, M.; Faurskov Nielsen, O.; Christensen, D. H.; Wulf, H. C., Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *J Invest Dermatol* **1998**, *110* (4), 393-8.
106. Janssens, M.; van Smeden, J.; Puppels, G. J.; Lavrijsen, A. P.; Caspers, P. J.; Bouwstra, J. A., Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with atopic eczema. *The British journal of dermatology* **2014**, *170* (6), 1248-55.
107. Tfayli, S.; Al Assaad, A.; Fournier, N.; Allaoui, F.; Paul, J. L.; Chaminade, P.; Tfayli, A., Investigation of lipid modifications in J774 macrophages by vibrational spectroscopies after eicosapentaenoic acid membrane incorporation in unloaded and cholesterol-loaded cells. *Talanta* **2019**, *199*, 54-64.
108. Egawa, M.; Tokunaga, K.; Hosoi, J.; Iwanaga, S.; Ozeki, Y., In situ visualization of intracellular morphology of epidermal cells using stimulated Raman scattering microscopy. *Journal of biomedical optics* **2016**, *21* (8), 86017.
109. Wu, H.; Volponi, J. V.; Oliver, A. E.; Parikh, A. N.; Simmons, B. A.; Singh, S., In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (9), 3809-14.
110. Tfayli, A.; Piot, O.; Manfait, M., Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation. *Journal of biophotonics* **2008**, *1* (2), 140-53.
111. Libong, D.; Héron, S.; Tchaplá, A.; Chaminade, P., Lipid Analysis with the Corona CAD. In *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques*, 2017; pp 221-287.
112. Navas-Iglesias N, C.-P. A., Cuadros-Rodríguez L, From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. **2009**.
113. Cifkova, E.; Hajek, R.; Lisa, M.; Hollapek, M., Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of (lyso)phosphatidic acids, (lyso)phosphatidylserines and other lipid classes. *Journal of chromatography. A* **2016**, *1439*, 65-73.
114. Marchi, I.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L., Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review. *Talanta* **2009**, *78* (1), 1-18.
115. Holcapek, M.; Cifkova, E.; Cervena, B.; Lisa, M.; Vostalova, J.; Galuszka, J., Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **2015**, *1377*, 85-91.
116. Jardy, R. R. M. C. A., *Chromatographies en phase liquide et supercritique*. 1991.
117. Holcapek, M.; Ovcacikova, M.; Lisa, M.; Cifkova, E.; Hajek, T., Continuous comprehensive two-dimensional liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of complex lipidomic samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2015**, *407* (17), 5033-43.
118. Lisa, M.; Cifkova, E.; Holcapek, M., Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **2011**, *1218* (31), 5146-56.

119. Holcapek, M.; Jirasko, R.; Lisa, M., Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *Journal of chromatography. A* **2010**, *1217* (25), 3908-21.
120. Hubaux, R., C. Bastin, and M. Salmon, On the relevance of an in vitro reconstructed human epidermis model for drug screening in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, **2018**. 27(12): p. 1403-1407.

Travaux expérimentaux

Le but principal de cette thèse est d'étudier la biosynthèse des lipides au cours de la différenciation des kératinocytes. La réalisation de cet objectif nécessite d'utiliser et de développer des méthodes analytiques performantes capables de suivre les modifications lipidiques survenues lors de la différenciation kératinocytaire à l'échelle moléculaire. Deux méthodes analytiques ont été utilisées : la Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (HPLC/HR-MSⁿ) pour la caractérisation des espèces moléculaires ainsi que la spectroscopie Raman pour la caractérisation de l'ordonnement des lipides du SC et la localisation des lipides au niveau cellulaire.

Les modèles des cultures cellulaires en 3D représentent mieux que les modèles cellulaires en 2D, les micro-environnements tissulaires, les interactions entre les cellules et les processus biologiques qui se déroulent *in vivo*. Par contre, les modèles cellulaires en 3D présentent deux grands désavantages. Premièrement au plan économique, ces derniers sont beaucoup plus coûteux que les modèles en 2D notamment dans le cas du développement des méthodes analytiques qui nécessitent parfois un nombre important d'échantillons. Deuxièmement, les modèles cellulaires en 3D, comme le cas de l'épiderme reconstruit (RHE), sont composés de plusieurs couches de kératinocytes, ce qui ne permet pas le suivi des modifications moléculaires au niveau d'une cellule unique par la microspectroscopie Raman. Par ailleurs, les modèles RHE disponibles sur le marché ne peuvent être livrés que tardivement, à partir de j12 de la maturation des kératinocytes pour lequel le SC est déjà commencé à se former. Ceci empêche le suivi des modifications moléculaires lors de la biosynthèse des lipides dès les étapes précoces de la différenciation (couches épineuse et granuleuse). En revanche, en culture 2D, il est possible de suivre la différenciation kératinocytaire dès la couche basale.

Compte tenu de ces éléments, nous avons décidé tout d'abord d'utiliser les modèles cellulaires en 2D pour :

- Suivre la différenciation kératinocytaire dès la couche basale.
- Avoir des signatures moléculaires au niveau d'une cellule unique.
- Développer et mettre en place certains protocoles analytiques (notamment chromatographique) afin d'obtenir des résultats préliminaires avant le passage sur les modèles cellulaires en 3D.

Par la suite, à cette étape les modèles cellulaires en 3D (RHE) ont été utilisés pour :

- Suivre la différenciation dès la couche granuleuse, et jusqu'à la formation de la couche cornée stratifiée.
- Avoir des signatures moléculaires au niveau d'une couche épidermique.
- Caractériser les structures fines des lipides (micro-hétérogénéité) dans un environnement biologique mimant celui *in vivo*.
- Étudier l'impact d'une maladie cutanée (atopie) sur le profil lipidique épidermique et évaluer l'action d'une molécule candidate pour un traitement.

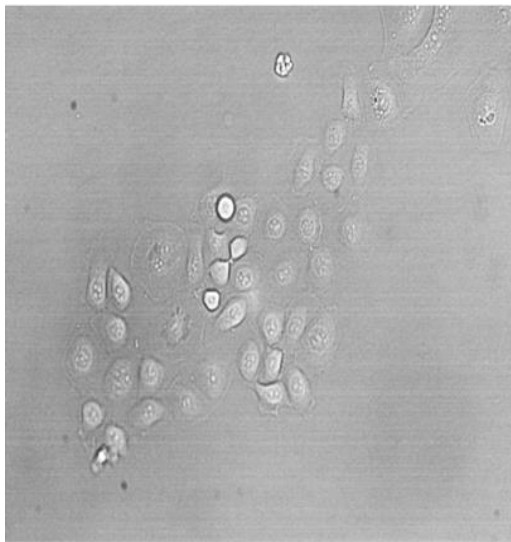
CHAPITRE 4

Développement de méthodes analytiques

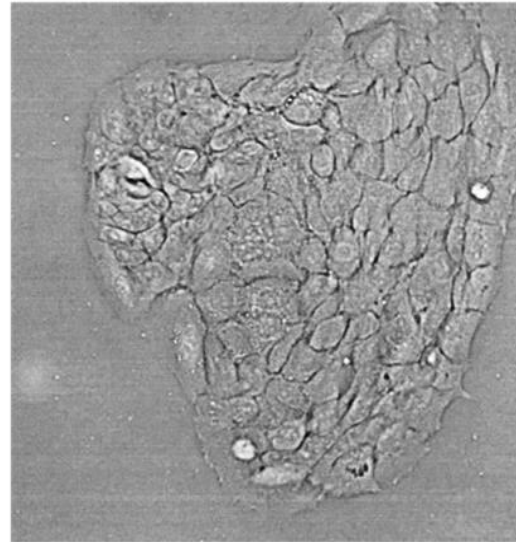
sur le modèle cellulaire en 2D :

Lignée cellulaire (HaCaT)

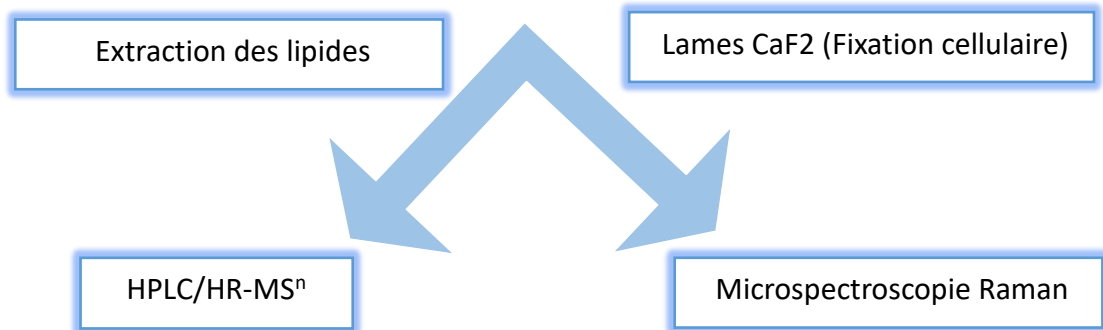
Ajout de calcium 2.8mM



A) HACAT non différenciés



B) HACAT différenciés à j8



Plusieurs développements et optimisations des protocoles analytiques sont prés-requis avant l'adoption d'un protocole final. L'étude de la biosynthèse des lipides et le suivi de la différenciation sur les modèles cellulaires en 2D a nécessité d'optimiser et/ou développer plusieurs éléments pour réaliser notre objectif :

- Optimisation des conditions de culture cellulaire :

- ✓ Induction de la différenciation des kératinocytes *in vitro* par l'ajout du calcium (Ca^{2+}) au milieu de culture cellulaire.
- ✓ Optimisation du taux d'ensemencement en fonction du nombre de jours de différenciation afin de déterminer la quantité de cellules permettant d'obtenir le maximum de contenu cellulaire sans dépasser 70% de confluence.

- Développement et optimisation de la méthode d'analyse des lipides en HPLC/HR-MSⁿ y compris le choix des phases mobiles, les gradients d'éluion, le volume d'injection, la source d'ionisation (APPI ou APCI), l'énergie de collision. Le but est de séparer la totalité des lipides extraits à partir d'un /des échantillon(s) donné(s) en une seule analyse et d'atteindre une caractérisation fine des structures moléculaires. Le développement de la méthode chromatographique a été réalisé tout d'abord sur les modèles cellulaires en 2D puis il a été appliqué sur les modèles 3D. Le protocole analytique final développé a été publié dans l'article 2 (sur les modèles 3D).

- Optimisation des paramètres d'acquisition par microspectroscopie Raman afin d'améliorer la qualité des spectres. Les cellules (kératinocytes) fixées en culture 2D ont une faible épaisseur d'environ 0,5 à 1 μm ce qui donne une signature spectrale faible et cela nécessite l'optimisation de certains paramètres tels que : le trou confocal, la fente, le temps d'acquisition, le nombre d'accumulation, le choix de l'objectif du microscope et le réseau dispersif.

4.1- Culture cellulaire en 2D et induction de la différenciation *in vitro*

HaCaT est une lignée cellulaire de kératinocytes immortels humains. Selon les recherches bibliographiques, ces cellules sont souvent utilisées comme modèle de kératinocytes *in vitro* : elles sont proches du phénotype normal, faciles à se multiplier, capables de proliférer et de se différencier, et présentant tous les marqueurs protéiques majeurs de la surface ^{1,2,3,4}. Transplantés chez la souris, elles reforment un tissu épidermique structuré et différencié de manière ordonnée ⁵. Cependant, *a contrario*, certains auteurs ont démontré qu'elles ont une capacité réduite à se différencier et atteindre un stade terminal de différenciation ⁶.

En revanche, les cellules primaires ont une capacité non controversée à se différencier *in vitro* mais elles ont une vitesse de croissance lente, et leur manipulation est compliquée, ce qui ne permet pas de suivre les signaux de différenciation à long terme ^{2, 3, 7}.

Au vu de ces considérations, il a été décidé dans cette étude d'utiliser les cellules HaCaT ce qui ouvre l'opportunité de suivre le processus de différenciation pendant une période importante afin d'étudier les modifications moléculaires survenues tout au long du processus de biosynthèse des lipides épidermiques.

Afin de stimuler la différenciation des kératinocytes HaCaT *in vitro* et de reproduire l'évolution du profil lipidique de l'épiderme, plusieurs modifications des conditions du milieu de culture ont été décrites ⁸. L'ion calcium Ca^{2+} est considéré comme un agent important pour contrôler la différenciation des kératinocytes *in vitro* et *in vivo*, il stimule la migration des corps lamellaires afin de libérer leur contenu lipidique ^{9, 10}. De plus, l'ion calcium Ca^{2+} entraîne un changement morphologique rapide des kératinocytes *in vitro* ^{2, 11}. Le milieu de culture dont la concentration en Ca^{2+} est supérieure à 0,1 mM conduit à la formation de desmosomes (développement d'un contact cellule-cellule) et à l'expression de marqueurs protéiques de la différenciation des kératinocytes. Ces modifications interviennent pour atteindre les caractéristiques morphologiques des couches supra-basales ^{12, 13, 14}. En revanche, les kératinocytes qui se cultivent dans un milieu de culture dont la concentration en Ca^{2+} est faible (0,03 mM), prolifèrent mais ne parviennent pas à réaliser le processus de différenciation jusqu'à la formation d'une enveloppe cornée¹⁵. Ainsi, les kératinocytes soumis à une faible concentration en calcium restent phénotypiquement similaires à la couche basale de l'épiderme¹⁴. En jouant sur la concentration en Ca^{2+} dans le milieu de culture cellulaire, nous avons pu induire et suivre la différenciation des cellules HaCaT pendant une période de temps important (2 semaines).

Les cellules HaCaT ensemencées à des concentrations élevées sont capables de se différencier même sans l'ajout de taux élevé de calcium ; pour cela il est recommandé de détacher ces cellules quand elles arrivent à 70% de confluence. Et donc, la densité de cellules à ensemencer joue un rôle important dans cette étude. En effet, il faut ensemencer les cellules à des concentrations qui leur permettent à la fois de produire une quantité importante de lipides (afin de pouvoir les étudier) mais aussi sans induire une différenciation automatique (liée à la densité de cellules).

4.2- Développement et optimisation de la méthode d'analyse des lipides en NP-HPLC/HR-MSⁿ

Notre objectif était d'atteindre le plus haut degré de séparation permettant la caractérisation du lipidome de l'épiderme. Ainsi, une méthode analytique a été développée en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase Normale (NP-HPLC) couplée simultanément au spectromètre de masse à haute

résolution (HR-MSⁿ) et au détecteur d'aérosols chargés (Corona-CAD[®]). Le développement de la méthode chromatographique a été réalisé premièrement sur un mélange composé de standards lipidiques représentant toutes les classes lipidiques de l'épiderme : tripalmitine (TG (16:0/16:0/16:0)), dipalmitine (DG (16:0/16:0)), cholestérol, acide palmitique (FA(16:0)) , monostearine (MG (18:0)), céramide 1 (EOS (d18:1/26:0/18:1)), céramide 2 (NS (18:0)/(18:0)), céramide 9 (EOP (t18:0/26:0/18:1)), céramide 3 (NP (t18:0/18:0)), céramide 3A (NP (t18:0/18:2)), céramide 3B (NP (t18:0/18:1)), céramide 6 (AP (t18:0/18:0)), glucosylcéramide (GlcCer (d18:2/16:0)), phospholipides (PL): phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) et sphingomyéline (Sm (d18:1/12:0)).

Par la suite, la méthode a été adaptée aux modèles cellulaires en 2D (Article 1) puis elle a été appliquée aux modèles 3D. Le protocole analytique développé a été publié en détail dans l'article 2 dans le cadre de l'étude effectuée sur les modèles de RHE EpiSkin[®].

4.2.1- Choix de la phase stationnaire polaire

Notre objectif analytique ainsi que la particularité du mélange lipidique étudié ont orienté notre choix de phase stationnaire vers la phase normale en particulièrement la PVA-Sil[®]. C'est une phase stationnaire uniforme d'alcool polyvinylique lié chimiquement à des particules de silice. La couche de polymère homogène liée à la surface de la silice permet une activité constante de la phase avec des solvants allant de l'hexane à l'eau. Cette caractéristique conduit à un temps de reconditionnement court et à l'absence d'adsorption irréversible. Compte tenu de l'expertise de notre équipe de recherche, nous avons fait le choix de cette phase stationnaire qui a été largement utilisée pour l'analyse des lipides par classe^{16, 17, 18} et des céramides¹⁹.

4.2.2- Composition de la phase mobile et optimisation du gradient d'élution

Le choix des solvants et l'évolution du gradient d'élution devaient répondre à l'objectif analytique ; réaliser une bonne séparation des classes lipidiques en balayant une large gamme de polarité (allant des triglycérides jusqu'aux phospholipides) tout en offrant une séparation des sous-classes de céramides qui présentent de plus faibles différences de polarité. En effet, la particularité de notre protocole analytique se base sur la possibilité d'étudier à la fois toutes les classes lipidiques de l'épiderme avec un intérêt particulier pour la classe des céramides. De plus, l'utilisation de la spectrométrie de masse comme détecteur nécessite la sélection des solvants compatibles avec l'interface APCI/APPI.

Le gradient d'élution est de polarité croissante pour augmenter la force d'élution. L'éluant initial n-heptane modifié avec 0,2% d'acétate d'éthyle (solvant A) a été choisi en raison de sa faible polarité. Après la période initiale de 3 min avec le solvant A seul, une augmentation lente du solvant B (acétone : acétate d'éthyle (2:1, v/v) + l'acide acétique (0,02% (v/v)) jusqu'à 6% pendant 7 min. Ce profil constitue une phase de conditionnement indispensable pour atteindre une sélectivité correcte entre 14 et 16 min (DG, CHOL, FFA) et entre 16 et 30 min (sous-classes de céramides). La pente du gradient en solvant B entre 15 et 30 min, diminuée de 2.8% /min à 1.33 % /min, avec une proportion finale de 50% de solvant B, s'est avérée optimale pour la séparation des sous-classes de céramides. Tous les lipides peu polaires et de polarité intermédiaire ont été entièrement élués avant 38 min. Après 30 minutes, avec des proportions croissantes d'éluant C (2-propanol : eau (85:15, v/v) + l'acide acétique 0,025% (v/v) + l'éthanolamine 0,025% (v/v)), les lipides les plus polaires ont été élués tels que les phospholipides et les sphingomyélines (Figure 4-1). Comme étape finale, un retour progressif aux conditions initiales a été obtenu, en utilisant le solvant B (5 min) suivi du solvant A (12 min) à 1 ml / min. La durée totale de l'analyse depuis l'injection et jusqu'à l'élution de toutes les classes de lipides est de 50 min (Figure 4-1).

Temps (min)	Phase A%	Phase B%	Phase C%	Pente du gradient
0	100	0	0	
3	100	0	0	
5	97	3	0	B: 1.5%/min
10	94	6	0	B: 0.6%/min
15	80	20	0	B: 2.8%/min
20	70	30	0	
25	60	40	0	B: 1.33%/min
30	50	50	0	
35	46	39	15	
40	40	30	30	C: 3%/min
50	40	0	60	
51	40	0	60	
56	0	100	0	
61	0	100	0	
62	100	0	0	
74	100	0	0	

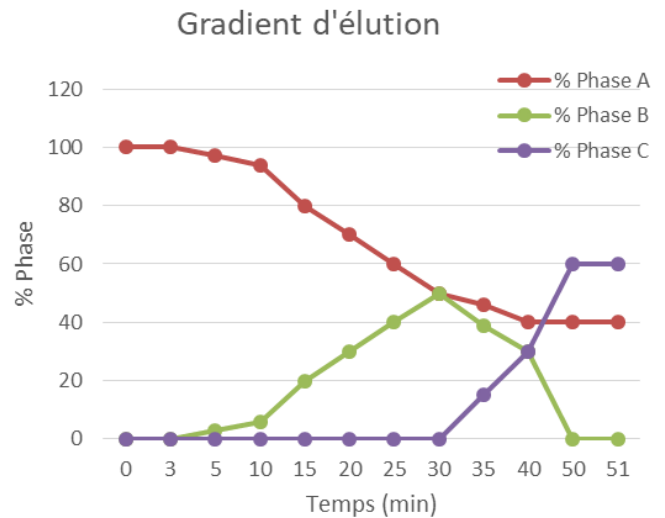


FIGURE 4-1 : Profil du gradient d'élution optimisé

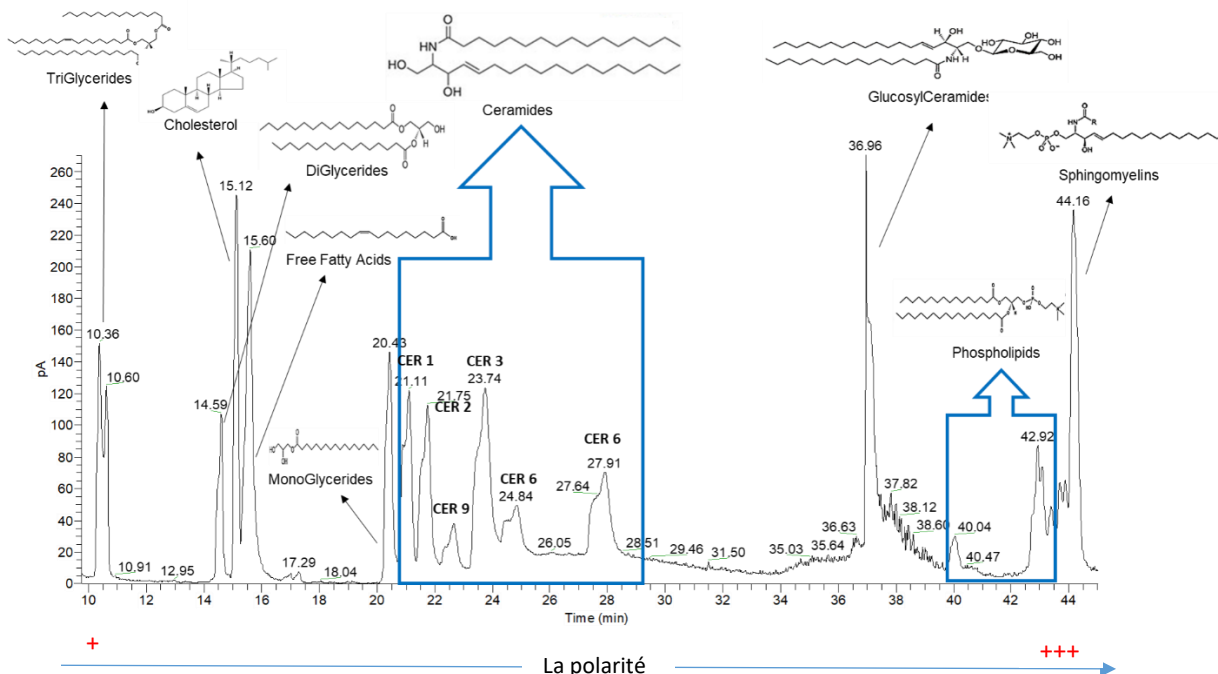


Figure 4-2 : Chromatogramme obtenu à partir de l'analyse de standards analytiques couvrant l'ensemble des classes lipidiques de différentes polarités. La séparation a été réalisée selon la polarité de chaque classe, en utilisant une chromatographie liquide en phase normale NP-HPLC couplée parallèlement avec un détecteur universel Corona-CAD® et avec un détecteur de spectrométrie de masse HR-MSⁿ (LTQ Velos Pro®).

Les conditions chromatographiques ainsi optimisées permettent une bonne séparation de la globalité des classes de lipides, avec une fenêtre d'élution idéale des sous-classes de céramides dans le domaine des lipides de polarité moyenne, pour des temps de rétention intermédiaires entre les monoglycérides (MG) et les glucosylcéramides (GlcCers). Les sous-classes de céramides sont éluées en fonction de la polarité de leur tête polaire c'est-à-dire du nombre de groupements hydroxyles. Les glucosylcéramides et les sphingomyélines sont élués en un seul pic chromatographique à 36,9 min et 43,1 minutes respectivement, car les polarités des groupements glucosyl et phosphocholine sont supérieures aux différences de polarité induites par leur micro-hétérogénéité structurale. Pour ces trois classes (Cers, GlcCers et Sms), la micro-hétérogénéité structurale n'est accessible que par le couplage de la chromatographie avec la spectrométrie de masse. De plus, ce profil de gradient offre la possibilité de séparer les sphingomyélines des autres phospholipides qui présentent une polarité voisine.

En résumé, cette technique permet en un seul run d'analyser tous les lipides de l'épiderme avec une bonne sélectivité, en particulier les 3 classes (et sous-classes) d'intérêt pour notre objectif biologique: Céramides, Glucosylcéramides et Sphingomyélines (Figure 4-2) et (Figure 4-3)

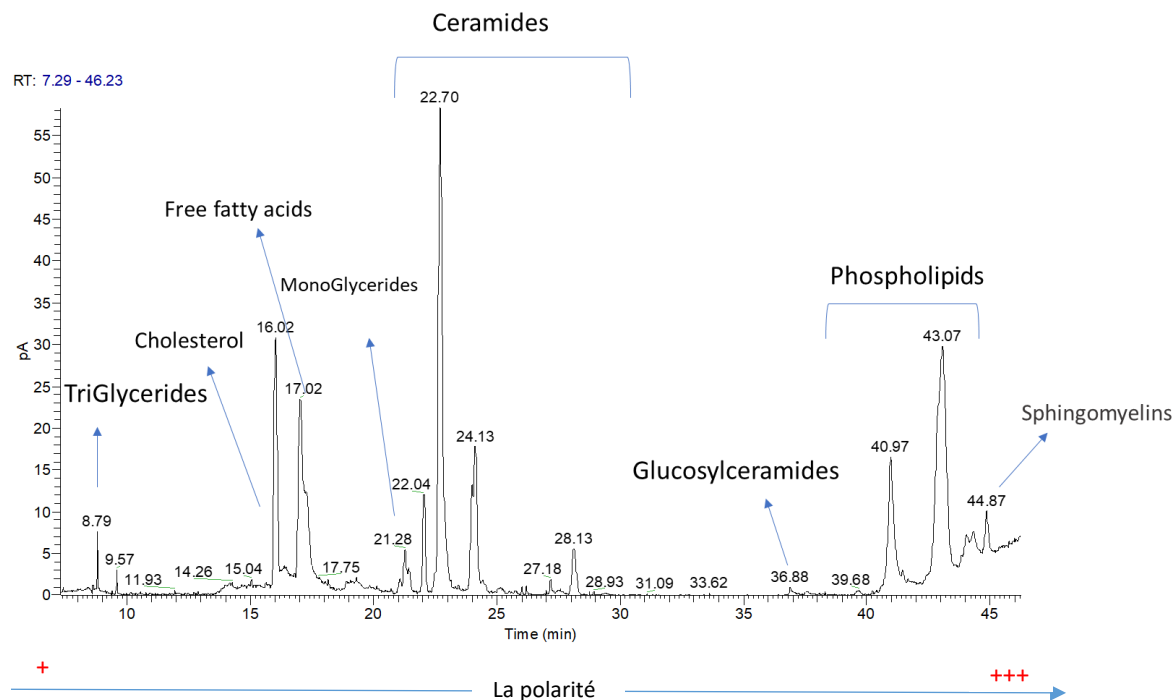


FIGURE 4-3 : Chromatogramme obtenu à partir de l'analyse des lipides extraits de la culture cellulaire des kératinocytes HaCaT en 2D. Cette analyse a été effectuée en utilisant une chromatographie liquide en phase normale NP-HPLC couplée parallèlement avec un détecteur universel Corona-CAD® et avec un détecteur de spectrométrie de masse HR-MSⁿ (LTQ Velos Pro®)

4.2.3- Ajustements chromatographiques complémentaires

- Choix du volume d'injection.

Trois volumes d'injection ont été testés : 5, 10 et 20 μ L. Les résultats obtenus ont montré que le volume d'injection de 10 μ L permet de garder la sélectivité chromatographique mais évidemment avec une intensité plus importante des signaux par rapport au volume 5 μ L.

- Choix du débit de la phase mobile:

Deux débits de phase mobile 400 μ L/min et 1000 μ L/min ont été testés afin d'obtenir le meilleur compromis entre la sélectivité et le temps d'analyse. La sélectivité n'est pas améliorée avec le débit 400 μ L/min. L'analyse est plus rapide avec le débit de 1000 μ L/min et préférable avec le couplage simultané de deux détecteurs : le Corona (CAD)® et le spectromètre de Masse (LTQ-Orbitrap Velos Pro).

4.2.4- Choix de la source d'ionisation (APPI ou APCI)

Le but de départ est de séparer et détecter l'ensemble des classes lipidiques en une seule analyse. Comme a été décrit précédemment dans l'introduction (page 52) la source d'ionisation joue un rôle clé dans la détection en spectrométrie de masse. Selon les recherches bibliographiques, la source APPI a une sensibilité plus élevée pour les lipides de concentrations faibles et surtout pour les lipides apolaires. Par contre la source APCI est mieux adaptée pour l'analyse des lipides polaires. Le choix de la source d'ionisation doit répondre à notre objectif : analyse et détection de l'ensemble de lipides de polarité différente en une seule analyse. Dans un échantillon biologique donné, les espèces moléculaires peuvent se trouver à des concentrations très diverses et parfois très faibles. En effet, certaines sous-classes de céramides, présentant de très faibles concentrations, peuvent se trouver co-éluées avec d'autres sous-classes de polarité comparable mais en concentration plus élevée. Ainsi, il est primordial de choisir une source optimale qui permette à la fois d'ioniser l'ensemble des classes (molécules) lipidiques même celles présentes à de faibles concentrations en évitant le phénomène de la suppression ionique au sien de la source d'ionisation. Bien que chacune des deux sources d'ionisation, l'APCI et l'APPI, soit favorable pour un domaine de polarité spécifique, toutes les deux pourraient être utilisées pour les lipides d'une polarité intermédiaire tels que les céramides. À ce sujet, un mélange de standards analytiques a été analysé en utilisant les deux sources d'ionisation et l'intensité du signal a été comparée pour les classes des trois marqueurs biologiques ciblés dans le cadre de cette thèse : céramides, glucosylcéramides et sphingomélines. Les résultats obtenus ont montré que les deux sources permettent d'ioniser l'ensemble des classes lipidiques mais l'intensité des signaux a été plus importante en utilisant la source d'ionisation APPI (Tableau 4-1). Au vu de ces résultats, la source APPI a été sélectionnée.

TABLEAU 4-1 : Intensité des signaux liés aux ions issus de la fragmentation moléculaire en fonction de la source d'ionisation. Pour chaque standard analytique mono-composé, les intensités obtenues par l'utilisation des deux sources d'ionisation APPI et APCI ont été comparées en mode d'ionisation positif en full scan. *: *Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)*. **: *Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)*.

Standard	Intensité relative en APCI	Intensité relative en APPI
Monoglycérides (Monostearin (C18 :0))*	2.62 x10 ⁷	7.70 x10 ⁶
Diglycérides (Dipalmitin (C16:0/C16:0))*	6.91 x10 ⁸	1.22 x10 ⁹
Cholestérol*	3.60 x10 ⁸	3.22 x10 ⁸
Céramide 2 ([NS] (d18:0/18:0))*	5.47 X10 ⁸	6.58 X10 ⁸
Céramide 3B ([NP] (t18:0/18:1))*	8.19 x 10 ⁷	1.95 x10 ⁸
Céramide 6 ([AP] (t18:0/18:0))*	7.99 x10 ⁷	2.68 x10 ⁸
Glucosylcéramides (18:2/16:0) **	5.08 x10 ⁸	1.91 x10 ⁹
Sphingomyélines (18:1/12:0) **	3.55 x10 ⁹	1.3510 ¹⁰

4.2.5- Choix du mode d'ionisation en APPI

L'étude de la fragmentation a été réalisée sur des standards analytiques représentant l'ensemble des classes lipidiques de l'épiderme.

La majorité des classes s'ionise dans les deux modes d'ionisation positif et négatif (Tableau 4-1) à l'exception des acides gras qui ne s'ionisent qu'en mode négatif et du cholestérol qui s'ionise seulement en mode positif. Les céramides s'ionisent dans les deux modes, avec des intensités variables selon les sous-classes mais comparables entre les deux modes. L'identification structurale est plus facile et informative en se basant sur l'ionisation et la fragmentation en mode positif. Ainsi, dans le cas des trois marqueurs biologiques de l'épiderme seul le mode positif a été retenu.

TABLEAU 4-2 : Ions majoritaires issus de l'ionisation des standards analytiques en modes APPI positif et négatif.

Classes lipidiques	APPI+		APPI-		
Acide gras libres			[M-H] ⁻	[FA-H] ⁻	
Triglycerides	[M + H-FA] ⁺		[M-H] ⁻	[FA-H] ⁻	
Cholesterol	[M + H-H ₂ O] ⁺				
Diglycérides	[M + H-H ₂ O] ⁺		[M-H+CH ₃ COOH] ⁻	[FA-H] ⁻	
Monoglycerides	[M + H-H ₂ O] ⁺		[M-H+CH ₃ COOH] ⁻	[FA-H] ⁻	
Ceramides	[M + H] ⁺	[M + H-nH ₂ O] ⁺	[M-H+CH ₃ COOH] ⁻	[M-H] ⁻	
Glucosylceramides	[M + Na] ⁺		[M-H] ⁻		
Sphingomyéline	[M + H] ⁺	[M+H-tête polaire] ⁺	[M ^o] ⁻		[M-CH ₃] ⁻
Phospholipides	[M+H] ⁺	[M+H- tête polaire] ⁺	[M ^o] ⁻	[FA-H] ⁻	[M-CH ₃] ⁻

4.2.6- Optimisation de paramètres de fragmentation MS² en spectrométrie de masse

L'acquisition en spectrométrie de masse a été effectuée en mode full scan en haute résolution afin d'obtenir la formule brute des molécules et en fragmentation MS² d'ions sélectionnés afin d'obtenir l'information structurale fine et de déterminer la classe, la sous-classe et l'espèce moléculaire. Ainsi, les paramètres de fragmentation de MS² ont été optimisés pour chaque classe lipidique en utilisant les standards analytiques. Deux modes de fragmentation ont été comparés: HCD (High energy Collision Dissociation) et CID (Collision-Induced Dissociation) avec des énergies de collision allant de 10 à 60 eV.

Ces deux méthodes reposent sur la collision des ions précurseurs sélectionnés, avec un gaz, de manière à apporter suffisamment d'énergie pour induire les fragmentations.

Le mode CID permet la production de l'espèce moléculaire intacte pour l'étude successive des fragments produits par collisions. Cependant, le mode HCD permet de fragmenter l'ion parent présélectionné ainsi que les ions des fragments générés.

Après l'interprétation des spectres de masse obtenus par les deux méthodes, le mode CID a été favorisé car l'identification structurale est plus facile en suivant la succession des fragmentations.

Quant à l'énergie de collision, la fragmentation idéale a été obtenue avec une énergie de collision de 35eV. Ainsi, dans un spectre de masse obtenu en mode MS² il est possible d'identifier l'ion parent et les ions fils liés avec des bonnes intensités.

En résumé, le développement et l'optimisation de certains paramètres méthodologiques ont permis d'atteindre notre objectif de séparer les classes et sous-classes lipidiques sur une phase stationnaire normale permettant leur séparation en fonction de leur polarité, en commençant par les moins polaires (les triglycérides) et jusqu'aux lipides plus polaires (les sphingomyélines). La séparation en phase normale associée avec un gradient d'élution adapté a permis de limiter le problème de co-élution interclasse qui peut se produire lors de l'utilisation de la chromatographie liquide en phase inverse (pour laquelle la séparation se fait en fonction de la longueur des chaînes alkyles). Les espèces moléculaires présentes dans les classes et sous-classes lipidiques sont identifiables grâce au couplage avec le spectromètre de masse MSⁿ (Chapitre 5, article 1).

Cette méthode analytique a été utilisée également afin d'analyser les extraits lipidiques issus soit de la culture cellulaire des HaCaT en 2D soit des cultures de kératinocytes humains (RHE) en 3D.

4.3- Optimisation des analyses spectrales en microspectroscopie Raman sur un modèle en 2D

Un certain nombre de paramètres ont été ajustés pour notre application d'imagerie spectrale des cellules kératinocytaires :

4.3.1- L'objectif du microscope

Le choix a été fait entre 2 objectifs de grossissement $\times 100$ donnant une résolution spatiale latérale d' $1 \times 1 \mu\text{m}^2$: l'objectif $\times 100$ CF (courte distance de travail) et l'objectif $\times 100$ LF (longue distance de travail). L'ouverture numérique du $\times 100$ CF étant de 1, elle permet d'avoir un spot de focalisation d'environ $0.5 \mu\text{m}$ en profondeur donc une meilleure résolution axiale. Pour l'analyse de cellules kératinocytes, ceci conduit à une perte rapide du signal si la surface n'est pas parfaitement plane. Ce problème peut être contourné en utilisant le système d'auto-focus. Cependant, ceci se traduit par une augmentation considérable du temps d'analyses. L'ouverture numérique du $\times 100$ LF offre une résolution axiale de $2 \mu\text{m}$ ce qui permet d'éviter la perte de signal et le recours à l'auto-focus. L'objectif $\times 100$ LF a été donc choisi pour les analyses en 2D.

4.3.2- Le temps d'acquisition (seconde)

La qualité du signal (rapport signal sur bruit) augmente avec le temps d'acquisition mais ce dernier présente des limites. En effet, pour réaliser une image spectrale, le facteur temps devient un facteur limitant. Plus la durée est longue, moins est contrôlée la variabilité des conditions expérimentales. De plus, l'exposition prolongée de l'échantillon au laser entraîne un réchauffement local qui pourrait avoir une influence sur les résultats attendus. Un compromis a été trouvé pour l'ensemble des mesures avec 5 secondes pour chaque acquisition.

4.3.3- Le nombre d'accumulations

Il s'agit du nombre de répétition de prise de signal afin d'éliminer statistiquement d'éventuels "spikes" (rayons cosmiques) et d'améliorer le rapport signal/ bruit. 2 répétitions ont été fixées pour les analyses de cultures cellulaires 2D.

4.3.4- Le trou confocal (μm)

Il permet de contrôler la profondeur du spot de focalisation et donc la résolution axiale. La fermeture du trou confocal limite cependant le nombre de photons arrivant au détecteur ce qui diminue par conséquence le rapport signal sur bruit. Pour les analyses de kératinocytes, le choix s'est porté sur une ouverture de $400 \mu\text{m}$ comme meilleur compromis entre intensité du signal et collection de photons provenant du plan focal (plan de la cellule).

4.3.5- La fente (μm)

L'ouverture de la fente participe à la résolution spectrale. Plus elle est petite, meilleure est la résolution spectrale. Mais cela réduit l'intensité du signal, ce qui amène à augmenter le temps d'acquisition pour compenser. Un compromis a été trouvé avec une ouverture à $300 \mu\text{m}$.

4.3.6- Réseau dispersif

C'est le réseau dispersif qui détermine la résolution spectrale. Plus le nombre de traits/mm est important, plus la résolution spectrale est fine. Le nombre de pixels du détecteur étant limité, l'augmentation de la résolution spectrale se traduit par l'arrivée à chaque pixel du détecteur d'un nombre plus faible de photons et l'occupation de l'ensemble de pixels avec une fenêtre spectrale plus fine. A titre d'exemple, pour une résolution moyenne de 1 cm^{-1} une fenêtre spectrale couvre 1064 cm^{-1} , tandis que pour une résolution moyenne de 0.1 cm^{-1} une fenêtre spectrale ne couvre que 106 cm^{-1} . Les contre parties d'une meilleure résolution sont donc une perte d'intensité (sensibilité) par accumulation et le besoin d'un nombre plus grand de fenêtres spectrales pour couvrir la gamme d'analyse. Pour nos mesures, nous avons utilisé le réseau dispersif à 300 traits/mm offrant une résolution spectrale moyenne de 4 cm^{-1} et permettant de couvrir la gamme spectrale d'analyse ($400\text{-}3800 \text{ cm}^{-1}$) avec deux fenêtres spectrales uniquement.

4.3.7- La gamme spectrale

La gamme spectrale choisie est $400\text{-}3800 \text{ cm}^{-1}$ afin de couvrir les hauts nombres d'ondes et d'obtenir des informations supplémentaires sur l'organisation des lipides.

TABLEAU 4-2 : Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses en microspectroscopie Raman sur le modèle cellulaire en 2D.

Cultures de kératinocytes en 2D		
Paramètres	Images spectrales	Spectres points
Objectif	$\times 100 \text{ LF}$	$\times 100 \text{ LF}$
Temps d'acquisition (s)	5	5
Accumulations	2	2
Trou confocale (μm)	400	400
Fente (μm)	300	300
Réseau dispersif (traits/mm)	300	300
Gamme spectrale (cm^{-1})	400-3800	400-3800

Ces paramètres, définis pour l'analyse en microspectroscopie Raman ont été utilisés afin de suivre la différenciation des HaCaT en 2D durant 2 semaines. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant (article 1).

Références associées au développement méthodologique et à la culture cellulaire en 2D (chapitre 4)

1. Wilson, V. G., Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* **2013**, *1195*, 33-41.
2. Deyrieux, A. F.; Wilson, V. G., In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* **2007**, *54* (2), 77-83.
3. Micallef, L.; Belaubre, F.; Pinon, A.; Jayat-Vignoles, C.; Delage, C.; Charveron, M.; Simon, A., Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* **2009**, *18* (2), 143-51.
4. Breitskreutz, D.; Schoop, V. M.; Mirancea, N.; Baur, M.; Stark, H. J.; Fusenig, N. E., Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol* **1998**, *75* (3), 273-86.
5. Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitskreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **1988**, *106* (3), 761-71.
6. Boelsma, E.; Verhoeven, M. C.; Ponc, M., Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *J Invest Dermatol* **1999**, *112* (4), 489-98.
7. Houghton, P. J.; Hylands, P. J.; Mensah, A. Y.; Hensel, A.; Deters, A. M., In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J Ethnopharmacol* **2005**, *100* (1-2), 100-7.
8. Bikle, D. D., Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem* **2004**, *92* (3), 436-44.
9. Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Ponc, M., Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* **2003**, *42* (1), 1-36.
10. Lee, S. E.; Lee, S. H., Skin Barrier and Calcium. *Ann Dermatol* **2018**, *30* (3), 265-275.
11. Breiden, B.; Gallala, H.; Doering, T.; Sandhoff, K., Optimization of submerged keratinocyte cultures for the synthesis of barrier ceramides. *Eur J Cell Biol* **2007**, *86* (11-12), 657-73.
12. Borowiec, A. S.; Delcourt, P.; Dewailly, E.; Bidaux, G., Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS One* **2013**, *8* (10), e77507.
13. Bikle, D. D.; Xie, Z.; Tu, C. L., Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* **2012**, *7* (4), 461-472.
14. Pillai, S.; Bikle, D. D.; Mancianti, M. L.; Cline, P.; Hincenbergs, M., Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* **1990**, *143* (2), 294-302.
15. Bikle, D. D.; Ng, D.; Tu, C. L.; Oda, Y.; Xie, Z., Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* **2001**, *177* (1-2), 161-71.
16. Christie, W. W.; Anne Urwin, R., Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. *Journal of High Resolution Chromatography* **1995**, *18* (2), 97-100.
17. Quinton, L.; Gaudin, K.; Baillet, A.; Chaminade, P., Microanalytical systems for separations of stratum corneum ceramides. *Journal of separation science* **2006**, *29* (3), 390-8.
18. Johan Nordbäck, E. L., William W Christie, Separation of lipid classes from marine particulate material by HPLC on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase using dual-channel evaporative light-scattering detection, *Marine Chemistry* **1998**, *60* (3-4).
19. van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res* **2011**, *52* (6), 1211-21.

Biomolecular Modifications During the Keratinocytes Differentiation: Raman spectroscopy and Chromatographic techniques.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Sana Tfaily *, Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli

Paru dans « *Analyst* » DOI: [10.1039/d1an00231g](https://doi.org/10.1039/d1an00231g)

Contexte : L'épiderme est composé de plusieurs couches : basale, épineuse, granuleuse et la couche cornée qui est la couche la plus externe de notre peau. Durant le processus de différenciation, les kératinocytes ont subi des modifications au niveau de la morphologie cellulaire pour former à la dernière étape, les cellules corneocytes qui ont une forme plutôt allongée et qui sont connues comme des cellules mortes, sans noyau et sans organelles cytoplasmiques. Ces marqueurs morphologiques sont associés avec des marqueurs protéiques et lipidiques qui permettent de distinguer une couche cutanée d'une autre. Depuis plusieurs années et jusqu'à présent, les techniques comme l'histologie et l'immunofluorescence sont utilisées afin de détecter les changements dans la morphologie cellulaire, les expressions des gènes et les protéines reconnues comme des marqueurs de la différenciation. Ces techniques sont des techniques qui nécessitent l'utilisation d'anticorps et de colorations. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à suivre les modifications survenues au cours de la différenciation en utilisant la microspectroscopie Raman comme une méthode puissante, et qui offre des informations à l'échelle moléculaire. En plus les images spectrales (en pseudo-couleurs) acquises par cette technique sont capables de fournir des informations pertinentes au niveau moléculaire sans utilisation de colorations. L'utilisation de la méthode de chromatographie liquide (NP-HPLC/Corona et NP-HPLC/HR-MS) offre des informations complémentaires sur les marqueurs lipidiques de la différenciation.

Méthode : Les cellules HaCaT sont incubées durant 3 semaines dans un milieu de culture dont la concentration en calcium est faible (0.03mM) afin de permettre à ces cellules de se différencier vers des cellules basales. Pour induire la différenciation, le milieu de culture à taux de calcium faible a été remplacé par un milieu dont la concentration en calcium est élevée (2.8 mM). Le processus de différenciation a été suivi durant 13 jours pendant lesquels les modifications morphologiques cellulaires et l'évolution moléculaire des lipides ont été suivies par microspectroscopie Raman et par NP-HPLC/HR-MS.

Résultats : Nos résultats ont montré que les cellules HaCaT incubées dans un milieu dont la concentration en calcium est élevée ont subi des modifications morphologiques. L'apparition de couches partiellement stratifiées a été remarquée à partir du 9^{ème} jour. La microspectroscopie Raman a montré des modifications

de signaux spectraux et particulièrement entre le passage du 9^{ème} vers le 13^{ème} jour. Parmi ces modifications : une forte augmentation de lipides, une augmentation de kératines, une diminution d'ADN. De plus, l'analyse des biomarqueurs lipidiques en NP-HPLC/Corona et NP-HPLC/HR-MS montre une diminution des ratios glucosylcéramides/céramides et sphingomyélines/céramides après le 9^{ème} jour.

Conclusion : Les cellules HaCaT sont capables de se différencier *in vitro* sous l'effet de taux de calcium élevé mais sans former des couches complètement stratifiées. Les résultats complémentaires obtenus à partir des deux méthodes analytiques citées au-dessus peuvent indiquer qu'entre les 9^{ème} et 13^{ème} jours, les cellules HaCaT commencent à évoluer d'une couche granuleuse (9^{ème} jour) vers une couche cornée (13^{ème} jour). La microspectroscopie Raman se révèle être une méthode de diagnostic très puissante avec une grande capacité de suivre les modifications moléculaires qui surviennent lors de la différenciation des kératinocytes.

Biomolecular modifications during the keratinocytes differentiation: Raman spectroscopy and chromatographic techniques.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Sana Tfaili *, Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli
Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France.

Author(s):

- 1- Joudi Bakar : joudi.bakar@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 2- Rime Michael-Jubeli : **This author accepts correspondance and proofs**, rime.michael-jubeli@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France. Orcid ID : 0000-0002-2944-5295.
- 3- Sana Tfaili : **This author accepts correspondance and proofs**, sana.tfaili@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France. Orcid ID : [0000-0002-6256-6777](https://orcid.org/0000-0002-6256-6777)
- 4- Ali Assi: ali.assi@u-psud.fr Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 5- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 6- Ali Tfayli : ali.tfayli@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.

***Corresponding authors:** Sana Tfaili, 5 rue Jean-Baptiste Clément - 92290 Châtenay-Malabry – France, Tel: +33146835904, fax: +33 Fax: +33149835458, sana.tfaili@u-psud.fr. Rime Michael-Jubeli, 5 rue Jean-Baptiste Clément - 92290 Châtenay-Malabry – France, Tel: +33146835904, fax: +33146835458, rime.michael-jubeli@u-psud.fr

Abstract

From basal layer until *stratum corneum*, lipid and protein biomarkers associated to morphological changes denote keratinocytes differentiation and characterize each epidermis layer. Herein, we followed keratinocytes differentiation in early stages on HaCaT cells over a period of two weeks by two complementary analytical techniques: Raman microspectroscopy and High-Performance Liquid Chromatography coupled to High resolution Mass Spectrometry. High concentration of calcium in the medium induced HaCaT differentiation *in vitro*. Results from both techniques underlined keratinocytes passage from granular layer (Day 9) to *stratum corneum* layer (Day 13). After 13 days of differentiation, we observed a strong increase in lipids content, decrease in proteins, decrease in DNA, and a decrease in glucosylceramides/ceramide and sphingomyelins /ceramides ratios.

Keywords: Keratinocytes differentiation, Raman microspectroscopy, HPLC/HR-MS, lipid biomarkers.

Abbreviation

APPI: Atmospheric Pressure PhotoIonization

CER: Ceramide

D: Differentiation Day

FFA: Free Fatty Acids

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HR-MS: High-Resolution Mass Spectrometry

NPLC: Normal-Phase Liquid Chromatography

SC: *Stratum Corneum*

SG: *Stratum Granulosum*

Introduction:

Epidermis – the outermost layer of the skin – consists of several stratified layers of keratinocytes: basal, spinous, granular and cornified layers¹. These layers differ by their thickness, their cells morphology, the proliferative activity and the expression of different differentiation markers². The basal layer (*stratum basale*) consists of large and columnar cells – epidermal stem cells –attached to the basement membrane by hemidesmosomes³. Stem cells have a proliferative activity and give rise to cells that can migrate and differentiate through the three other layers⁴. The spinous layer (*stratum spinosum*) is a suprabasal layer. Cells of this layer are attached together by desmosomes⁵. In the granular layer (*stratum granulosum*), keratohyalin granules and lamellar bodies appear, the latter are rich in lipids and catabolic enzymes. Lamellar bodies fuse with plasma membrane and release their lipid content at the interface between the granular and cornified layers. The secreted lipids are rearranged and assembled into lamellar structure. These structures fill the intercellular region of *stratum corneum* (SC) and surround the corneocytes to form a compact intercorneocytes matrix which plays a key role in skin barrier function^{3,6}. When the keratinocytes reach the uppermost layer of the skin (SC), they lose their capacity for cell division, lose their nucleus and acquire a flatter shape to become corneocytes. Corneocytes are packed with keratin filaments and embedded in a lipid matrix organized in lamellae consisting mainly of long-chain ceramides (CER), free fatty acids (FFA), and cholesterol^{6,7}.

Keratinocytes differentiation stages go together with morphological changes. These changes are generally confirmed biochemically by immunoblotting and immunofluorescence of proteins and genes known as differentiation markers in the epidermis such as keratin 1 involucrin, and filaggrin⁸. In parallel with protein modifications and morphological changes, lipids composition and concentrations evolve along differentiation. In fact, epidermal lipid biosynthesis is initiated at early stage of keratinocytes differentiation. Ceramides are generated in the endoplasmic reticulum of *Stratum Granulosum* (SG) cells, they consist of fatty acid chains linked to sphingoid bases via amide bonds⁹⁻¹¹.

Ceramide biosynthesis increases along keratinocytes differentiation, ceramides are subjected to changes – probably to avoid their intracellular cytotoxicity level – in the Golgi apparatus; *i.e.*/ glycosylation to give the glucosylceramides and phosphorylation to generate Sphingomyelins¹¹. The glucosylceramides and Sphingomyelins are then packaged into epidermal lamellar bodies (LB).

At the interface between the SG and SC, lamellar bodies release their lipid content of glucosylceramides and sphingomyelins. β -glucocerebrosidase and sphingomyelinase convert back respectively glucosylceramides and sphingomyelins to their ceramides species^{3,6}. Therefore, ceramides are identified as SC markers, and glucosylceramides and sphingomyelins are identified as SG markers in keratinocytes differentiation stages.

Spontaneously immortalized Human cell line HaCaT – often used as a keratinocytes model – are near to normal phenotype, possess the capacity of proliferating and differentiating, and exhibit all major differentiation surface markers^{8, 12}. Primary human keratinocytes are perfect to study differentiation; but some drawbacks such as slow growth rate complicate cell culture and prevent long-term investigation of differentiation signals¹²⁻¹⁴. HaCaT cells have the advantage to permit following differentiation process during a long period (two weeks).

Several modifications of culture medium conditions are described to stimulate keratinocytes differentiation *in vitro*¹⁵. Ionic calcium has been shown to be a major agent in controlling keratinocytes differentiation *in vitro* and *in vivo*, it stimulates lamellar bodies migration which secret their lipid content at interface between the SG and SC^{6, 16}.

In this work, HaCaT cells were first cultured in a low calcium medium to induce dedifferentiation then they were subjected to a high calcium concentration (2.8 mM) medium to induce their differentiation during a period of 13 days *in vitro*. The differentiation process was followed using Raman spectroscopy which enables a direct molecular characterization with no labeling¹⁷. Raman spectroscopy enables following cells differentiation at single cell level. In addition to the advantage of Raman as a free label diagnostic technique,

it provides a phenotype-specific biomolecular fingerprint for the different molecular components in the sample. Complementary information was obtained using High-performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (HPLC/HR-MS) and (HPLC/Corona) permitted to follow lipid biomarkers evolution classes (ceramide, glucosylceramides and sphingomyelins). These two analytical methods are complementary and constitute an efficient methodology to study differentiation biomolecular changes and to determine keratinocytes differentiation stages.

Materials and methods

1- Cell culture

HaCaT cells were cultured in DMEM High Glucose, calcium and serum free media (Life Technologies), and supplemented with 10% fetal bovine serum (sigma) treated with Chelex 100 to remove endogenous calcium, 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 2% glutamine solution 200mM (Sigma) and 1% of calcium chloride solution 3mM (Sigma) to obtain a final concentration of 0.03mM. HaCaT cells were maintained for at least 3 weeks in low calcium media to dedifferentiate to the basal phenotype¹⁸. High calcium concentration induces a rapid morphological change of keratinocytes *in vitro*^{1, 12}. To induce the differentiation, the low-calcium medium (0.03mM) was replaced by a high-calcium medium (2.8 mM as final concentration). Cultures were maintained at 37C° in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Since the HaCaT cells are very sensitive to cell density, cells in low calcium medium should be detached using trypsin-EDTA when they reach 70% confluence, otherwise they may start to differentiate at higher density⁸.

1.1- Cell culture preparation for Raman microspectroscopy analyses

The differentiation process of HaCaT keratinocytes was followed over 13 days. For Raman analysis, CaF₂ windows were introduced in well plates during cell culture. To reach the required cell density at each differentiation day, basal HaCaT cells were seeded in a 24 well plate on sterile CaF₂ windows. Cells were deposited in a descending order: reducing number of cells compensates continuing cell proliferation occurring during differentiation process and permits to harvest cells subsequently.

HaCaT were first cultured for 24 h under a low calcium medium to allow cells adhesion. After 24 h, the low-calcium medium was replaced with high-calcium medium to initiate the differentiation process. The medium was changed every three days. At each collection step 2 hours, 3, 6, 9 and 13 days, HaCaT cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and then fixed with formalin (4%, 15 min). Cells fixed on CaF₂ window were then washed again with PBS and water.

1.2- Cell culture preparation for HPLLC/HR-MS, HPLC/corona analyses

A decreased density of cells was seeded directly – without CaF₂ windows – into 75-cm² flasks in presence of low calcium medium and incubated for 24h in 5% CO₂, 37C°. Decreased cells density permits to not exceed 60-70% of confluence at each collection step. To follow the changes in lipid composition during keratinocytes differentiation process, the low calcium medium was replaced after 24h by the high one and maintained for 13 days.

2- Raman microspectroscopy

2.1- Instrumentation Raman spectrometer

Raman spectral acquisition and spectral imaging were collected using a Labram HR microspectrometer (Horiba scientific, Palaiseau, France). A 633 nm He:Ne laser (Toptica Photonics, Munich, Germany) giving a 10 mW power on the sample was used. The laser beam was focused using a 100X long focal microscope objective (Olympus, Tokyo, Japan). The collected light was filtered with a Edge filter and dispersed with a 4 cm⁻¹ spectral resolution using a 300 μm slit and 300 grooves/mm holographic grating. The Raman Stokes signal was recorded with a Synapse Charge-Coupled Device detector: CCD camera (Andor Technology, Belfast, UK) containing 1024x256 pixels. Spectral acquisition was performed using Labspec 6 software (Horiba Scientific, Lille, France). Raman measurements were performed on HaCaT cells in the 400–3800 cm⁻¹ spectral range. For each spectrum the acquisition time was 2 x 5 seconds.

2.2- Raman spectral processing

Acquisition and pre-processing of all spectra were performed using a Labspec 6 software (Horiba Scientific, Palaiseau, France). All spectra were subjected to the same pre-processing protocol. All spectra were smoothed using Savitzky-Golay algorithm (4th order, 9 points), normalized by applying unit vector method and baseline corrected using an automatic polynomial function. To follow the significant variations in cells spectra, Kruskal-wallis (a non-parametric test) was applied using in house developed software with Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA).

For spectral imaging, single cells were scanned with 1 μm step (X and Y) with an acquisition time of 2x5 seconds for each point.

3- Lipid extraction

Cells were dispersed using trypsin-EDTA, then cell pellets were dissolved in 600 μL of distilled water, mixed with a magnetic stirrer for 10 minutes at room temperature. Total lipids were extracted by the modified method of Bligh and Dyer¹⁹. Briefly, 1.5 mL of methanol was added and vortexed for 2 minutes. Then, 3 mL of chloroform containing 1-Eicosanol as an internal standard (0.3 mg/mL on chloroform) was also added, the mixture was incubated for 1 hour at room temperature in the dark. The organic phase was collected and evaporated under a stream of nitrogen, then lipid residues were resuspended with 100 μL of chloroform^{20, 21}.

4- Instrumentation and analytical method (HPLC/corona and HPLC/HR-MS) for biomarkers analysis

The analysis of the extracted lipid was conducted by HPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). Separation of lipid occurred in NPLC using (PVA)-Sil column (PVA-bonded column; 5 μm particle size, 150 \times 4.6 mm) purchased from YMC (Kyoto, Japan). A solvent gradient of Heptane/ethyl acetate (99.8: 0.2 v/v) (Solvent A), acetone and ethyl acetate (2: 1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v) (Solvent B) and 2-propanol/ water (85:15v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at

0.025% v/v) (solvent C) were used. Flow rate was set to 1 mL/min and injected volume was 10 μ L. Detection was performed using two detectors simultaneously: a Corona CAD® and a hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) source. APPI positive ion mode was used to analyze the extracted lipid. The mass scan range was 220-1800 atomic mass units (amu). A full scan detection mode and fragmentation was performed by the orbital trap at a resolution of 100 000. The analytical conditions are detailed in a previous work²¹.

Results:

1- Morphological evolution

The first step of the study consisted of the dedifferentiation of the HaCaT cells by incubating them in a low calcium concentration medium (0.03) mM for 3 weeks. Non differentiated keratinocytes (ND) had a morphology closer to the spindle shape. They are less compacted and with no contact between cells as shown in figure 1(A). In order to induce HaCaT cells differentiation process, medium was replaced by a high calcium concentration medium (2.8 mM). As shown in figure 1 (B), morphological changes were observed following the keratinocytes differentiation. After 2H of exposure, cells began to exhibit a more cuboidal shape with close packing. Fusiform cells were detected at D9 and D13 days (orange arrows in figure 1 (B)). Stratified layers appeared from D9 and became thicker at D13. Cells overlapped at D13 and made impossible to determine the limit at individual cell level (Day 13 in figure 1 (B) and figure 3).

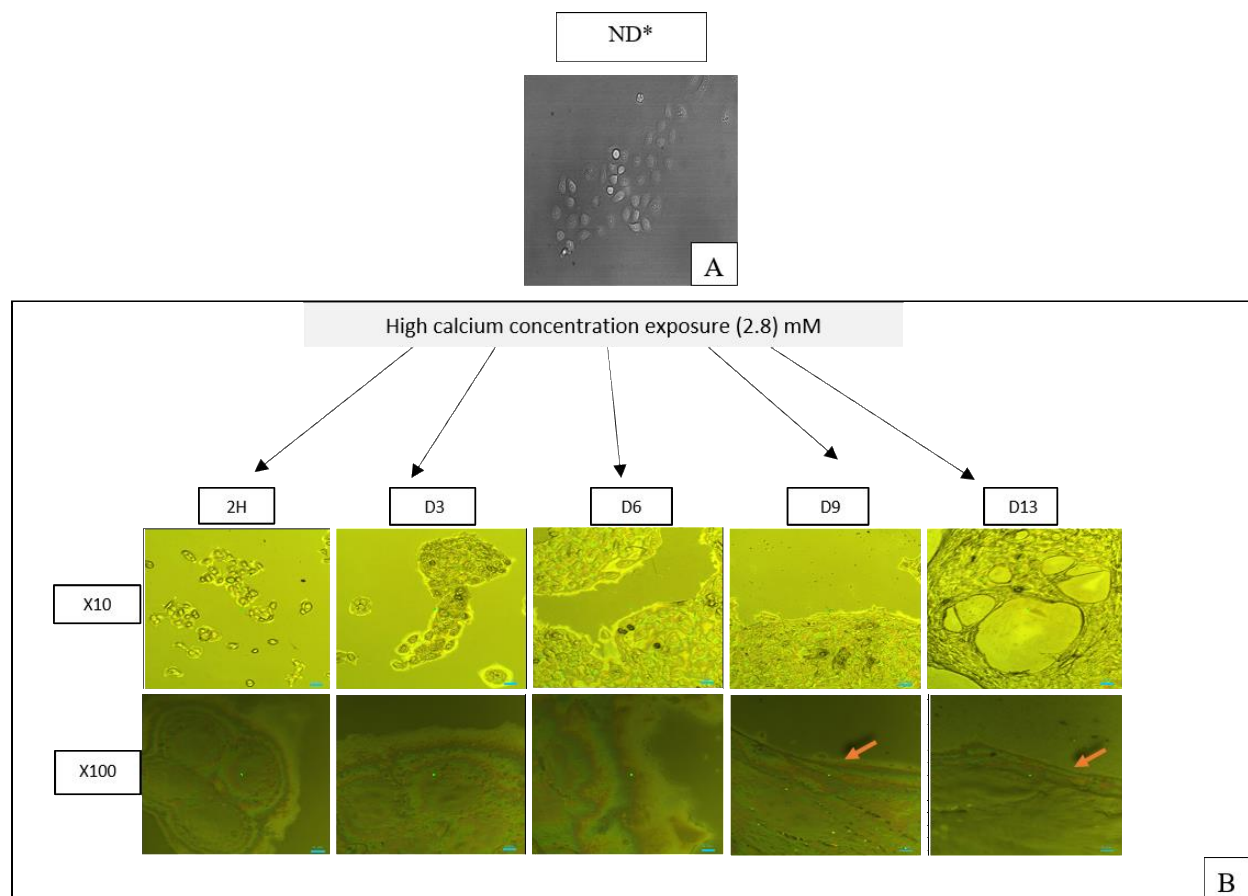


Figure 1: Morphological evolution of HaCaT cells during the differentiation process. A) Microscopic image after 3 weeks of incubation in low calcium concentration medium (0.03 mM). B) White light images (x10, and x100) during different period (2H, 3, 6, 9, and 13 days) of incubation in high calcium concentration medium (2.8 mM). Morphological modification in the cellular shape was observed. The orange arrows point the formation of fusiform cells and the stratified layers which appeared at D9 and became thicker at D13. ND*: undifferentiated HaCaT, h: hours, D: days.

1- Raman spectroscopy: Spectral features of HaCaT cells

The spectral signatures of HaCaT cells at each differentiation day were achieved using Raman microspectroscopy. In order to focus on the evolution of lipids along differentiation, spectra from cytoplasm were collected. Figure 2 illustrates mean cytoplasm spectra at each differentiation day. The presence of a band at 960 (953-978) cm^{-1} can visually be observed on the spectra. The 960 cm^{-1} band appeared after 6 days of differentiation and clearly increased after 13 days. Spectra collected at D13 on stratified layers showed the highest integrated intensities of this band compared to other regions. The 960 cm^{-1} band could be assigned to an increase in saturated ceramides amounts, as it was mentioned in a comparative study

between unsaturated and saturated ceramides²². Another possible assignment could be an increase in the keratin level based on the band attribution in²³ table 1.

In order to highlight significant spectral modifications, Kruskal-Wallis was applied between spectra issued from cells at different differentiation days. P-value was fixed to 0.05 and the spectral regions showing significant variations were identified and listed in table 1.

A decrease in the bands related to phospholipids at D3 (598 cm⁻¹, 831 cm⁻¹ (v_{asym} O-P-O)), followed by a slight increase at D6. While no changes in phospholipids were observed between D6 and D9, a marked decrease was shown at D13 (598 cm⁻¹, 831 cm⁻¹ (v_{asym} O-P-O)) (table 1). The decrease in the phospholipids relative content between D0 and D3 can also be observed by following alkyl chain related vibrations: vCC (1086 cm⁻¹), δ CH₂ twisting (1305 cm⁻¹) and δ CH scissoring (1448 cm⁻¹).

The observation of cholesterol and cholesterol esters related bands showed no modification at D3 while higher intensity appeared at D6 (700 cm⁻¹) and the increase continued for D9 (607 cm⁻¹). Cholesterol and cholesterol esters are known to markedly increase in the SG.

The most marked evolution was observed in the spectral features related to lipid chains between D9 and D13 by mainly a high marked increase in the CH₂ stretching bands (2851 and 2882 cm⁻¹). This increase was also observed for CC stretching (1086 cm⁻¹) and δ CH₂ twisting (1305 cm⁻¹). Lipid increase may be related to an advanced stage in the differentiation *i.e.* the transition between SG and SC. The decrease in the δ CH scissoring (1448 cm⁻¹) was more related to conformational modifications in other molecular components (proteins) than lipids²⁴.

The 3059 cm⁻¹ band (=CH stretching) showed a continuous decrease in unsaturated moieties from D6 till D13.

In addition to the modifications observed in the lipid related spectral features, changes were observed for other molecular features. For instance, between D9 and D13, a marked decrease was automatically identified by Kruskal-Wallis in the spectral region (705-736 cm⁻¹) assigned to nucleic acids (table 1). DNA

variation accords with the observations obtained from lipid related bands suggesting the end of SG phase (figure 3).

An interesting observation was also shown for amino-acids and protein related features. From D0 to D3, significant decreases were observed for amino-acids related bands, *i.e.* cytosine (ν_{CS} at 669 cm^{-1}), tryptophan (ring breathing at 760 cm^{-1}), tyrosine (855 cm^{-1} (ring breathing), 1044 cm^{-1}) and proline (855 cm^{-1}). The decrease in the proteins spectral signature contributes in the decrease in the CH scissoring band at 1448 cm^{-1} .

From D3 to D6, the significant changes in proteins are mostly structure related. For instance, the increase in the 960 cm^{-1} band was explained by an increase in the β -sheets in keratin (table 1). In parallel, a shift to higher wavenumbers of the symmetric CH_3 stretching band can be associated with unfolding of proteins. The modifications in the secondary structure of proteins was also observed from D6 to D9 with an increase in the α helix related sub-band in the Amide I band (table1). An increase in the CH scissoring occurred also. Finally, at D13, a decrease in the relative intensities of CH_3 stretching bands mainly associated to proteins is observed. This was described previously^{25, 26} and is associated to skin barrier function.

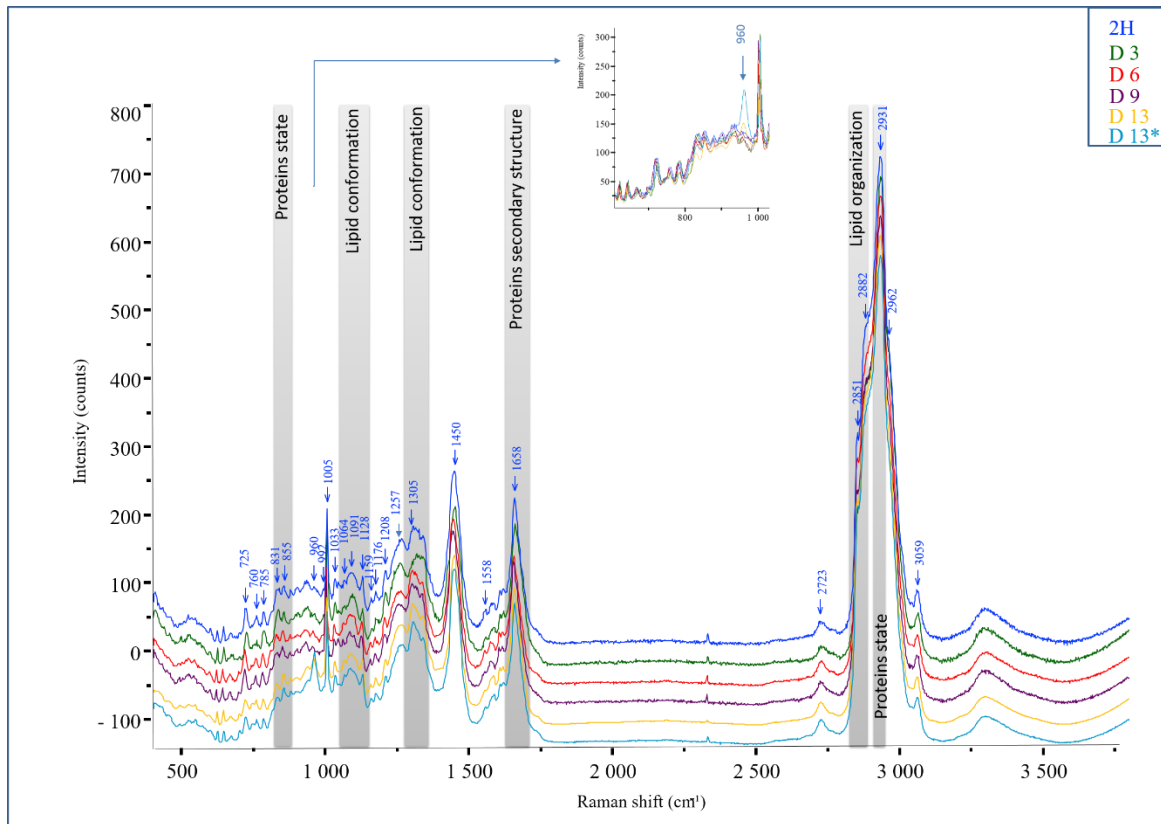


Figure 2: At each differentiation day, the mean cytoplasmic spectrum of several cells was calculated ($n=12$). The mean spectra of HaCaT obtained after high calcium concentration exposure at (2H, 3, 6, 9, and 13 days) were compared. Several modifications were observed between the differentiation days. A clear increase in the peak intensity at 960 cm^{-1} was detected at D13 (yellow spectrum) and particularly on the stratification layers (light blue spectrum). * mean spectrum of HaCaT at D13, taken from the stratified layers.

Table1: Assignment of spectral bands in a Raman spectrum of HaCaT cells during the differentiation process. ν elongation or stretching, δ deformation.

Wavenumber (cm^{-1})	2H vs D3	D3 vs D6	D6 vs D9	D9 vs D13	Assignment
598 (592-605)	↘	↗	-	↘	Phospholipids ²⁷
607 (605-614)	-	-	↗	-	Cholesterol ²⁸ /Glycerol ²⁹
669 (661-676)	↘	-	-	-	ν (C-S) of cytosine ³⁰
700 (693-705)	-	↗	-	-	Cholesterol, cholesterol ester ²³
725 (705-736)	-	-	-	↘	Ring breathing mode of DNA /RNA bases ^{27, 30}
760 (746-768)	↘	↗	-	-	Ring breathing tryptophan ^{30, 31}
831 (823- 844)	↘	-	-	↘	ν_{asym} (O-P-O) ³⁰ /Out-of-plane ring breathing, tyrosine ³¹
855 (846-871)	↘	-	-	-	Ring breathing mode of tyrosine & ν (C-C) of proline ring ³¹
960 (953-978)	-	↗	-	↗↗	ν (C-C) β -sheet keratin conformation ²³ . ν C-N ²²
1044 (1040-1053)	↘	-	-	-	Tyrosine ³²
1086 (1073-1100)	-	-	-	↗	ν C-C, lipid chains ^{30, 31}
1128 (1116-1140)	↘	-	-	-	ν C-C, lipid chains ^{28, 33}
1305 (1284-1320)	↘	-	-	↗	δCH_2 twisting (lipid) ^{30, 34}

1448 (1406-1494)	↘	-	↗	↘	δC-H scissoring (proteins and lipid) ^{30, 34}
1558 (1538-1564)	-	-	-	↗	Tryptophan ³⁵
1658 (1630-1744)	-	-	↗↗	-	v (C=O) amide I, α helix of keratin ²³ . Little contribution for v(C=C) lipid ^{34, 36}
2723 (2697-2755)	-	-	-	↘	v (CH) aliphatic ³³
2851 (2833-2856)	-	-	-	↗↗	Lipid, v _{sym} (CH ₂) ³⁶⁻³⁸
2882 (2856-2895)	-	-	-	↗↗	Lipid, v _{asym} (CH ₂) ^{27, 37}
2931 (2902-2953)	-	2934	-	↘	v _{sym} (CH ₃) ³³
2962 (2953-3000)	-	-	-	↘↘	v _{asym} (CH ₃) ^{30, 33}
3059 (3047-3080)	-	↘	↘	↘	v(=CH) of lipid ^{36, 39}

2- Raman microspectroscopy: Spectral images of HaCaT cells

In parallel with spectral analyses, spectral imaging was performed in order to monitor possible sub-cellular changes along with the differentiation days and false-colored images were obtained (figure 3).

In the first column of figure 3, the evolution of DNA to lipid content can be monitored by following the (773-790 cm⁻¹) / (2820-2890 cm⁻¹) ratio.

At D0, after 2 hours of exposure to high calcium concentration medium, nucleus can be clearly identified in green (light blue). Based on the color bar, the pixels presented in green (light blue) are indicative to higher ratio values than dark blue ones. A decrease in the ratio values was observed starting at D6 where the nucleus remained clearly identified. At D9, the decrease of DNA is clearly observed, and the identification of nucleus is much difficult. Finally, at D13, nucleic acids disappeared (figure 3, first column).

The second column of figure 3 illustrates the lipid to protein ratio (2820-2890 cm⁻¹) / (2900-2970 cm⁻¹). After 2H of high calcium exposure, lipid / protein ratio seems to record the highest intensity (red color) at the cell membrane area, indicating the localization of the lipid at a high level at the cell membrane zone. After 3 days of differentiation, the red color begins to disperse throughout the cell except the nucleus zone. In addition, at this differentiation day a very high intensity zone was detected which may reflect the localization of a very high amount of lipid content. Egawa *et al.*, also observed strong signal intensities of lipid surrounding the nucleus (2850 cm⁻¹) and related it to endoplasmic reticulum synthesis of lipid⁴⁰. At D6 and D9, we can clearly see a decrease in the intensity of this ratio in the cytoplasm. In contrast, higher

values started to be observed in the nucleus at D6 and continued to increase at D9. At D13, the lipid/protein distribution is more homogenous all over the images with high values. This is in concordance with results obtained from spectral analyses (table 1) and with Egawa *et al.* observation at the final stage of Keratinocytes differentiation. At this stage, Keratinocytes with digested nuclei form layered structures and present a flattened shape with strong signal intensity of lipids (2850 cm^{-1})⁴⁰.

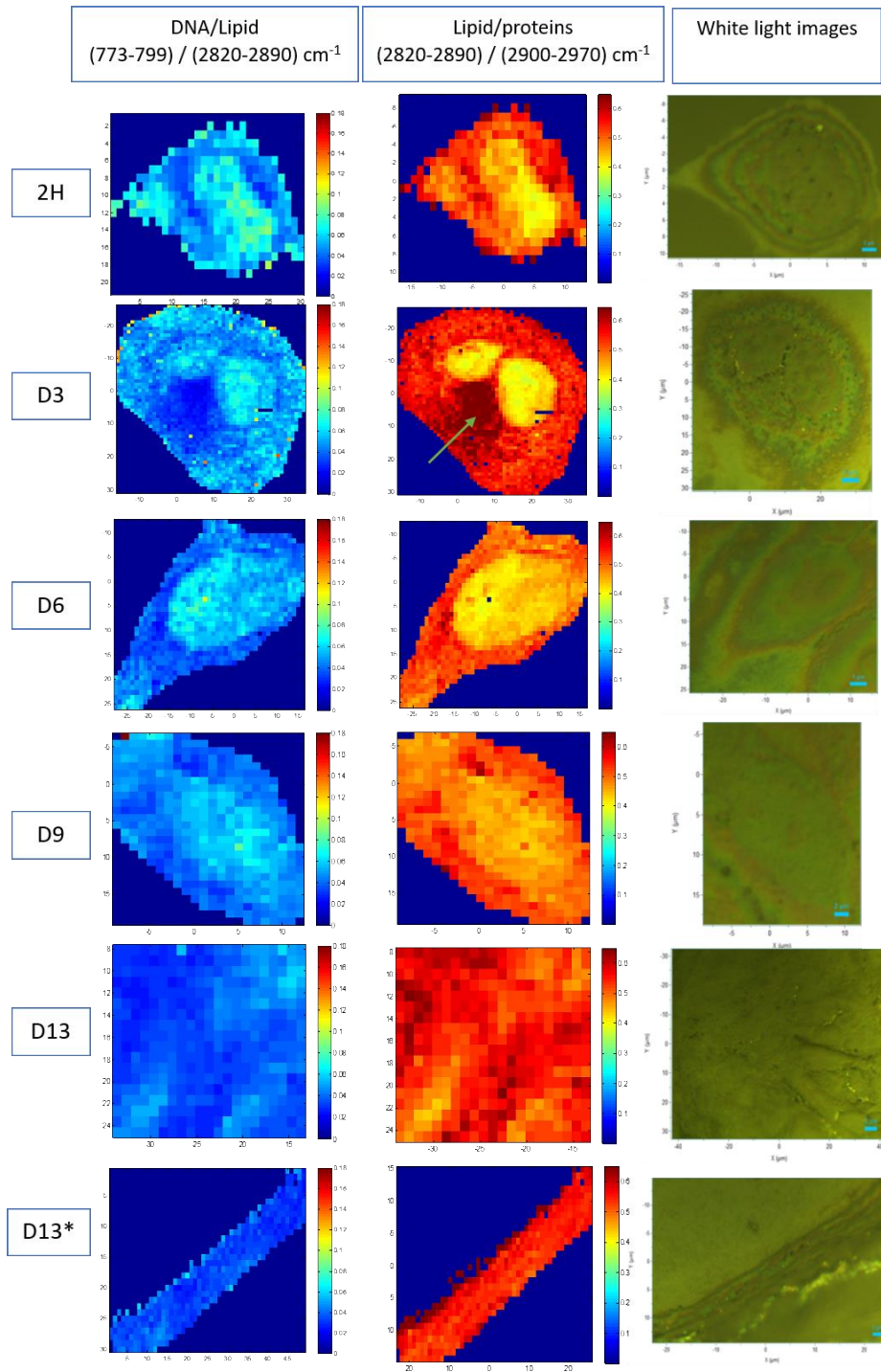


Figure 3: False-colored Raman images of HaCaT during different period after high calcium exposure. The evolution of DNA/lipid ratio (733-799/2820-2890) cm^{-1} and lipid /protein ratio (2820-2890/2900-2970) cm^{-1} was followed during the differentiation. The green arrow indicates the localization of a high lipid content. *: stratified layers.

3- Lipid biomarkers evolution by HPLC/Corona & HPLC/HR-MS

Ceramides, glucosylceramides and sphingomyelins classes are considered as lipid biomarkers of differentiation stages. The analytical method used in this study was previously developed by our group²¹ and enables to separate epidermis lipid classes in one single run (data not shown). Using this method, we have followed epidermal lipid biomarkers evolution during keratinocytes differentiation. As shown in figure 4, the ratios of chromatographic peak area of glucosylceramides/ceramides and sphingomyelins/ceramides increased throughout the differentiation until reaching a maximal value at D9. A marked decrease of these ratios can be observed at D13.

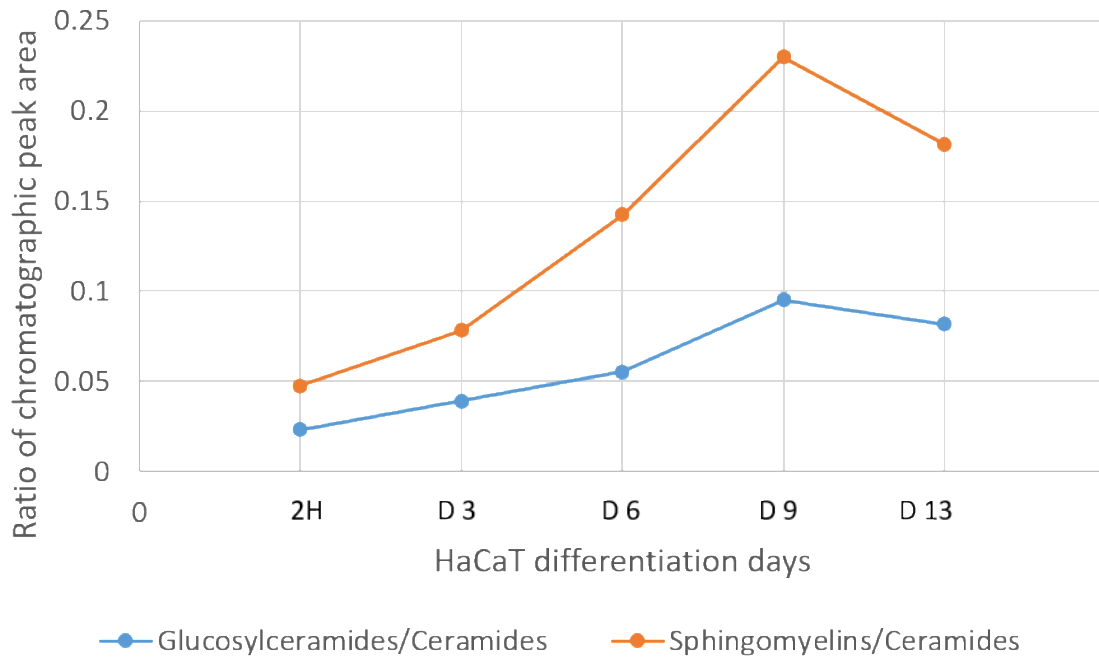


Figure 4: HaCaT lipid were extracted and analyzed using HPLC/HR-MS and HPLC/Corona. The evolution of lipid biomarkers during keratinocytes differentiation was studied. Ratios of chromatographic peak area of glucosylceramides/ceramides and of sphingomyelins /ceramides calculated at different cells collection step.

Discussion and conclusion

In this study, we induced keratinocytes cell differentiation and followed the process over two weeks using HaCaT cells grown *in vitro* as a 2D cell culture model. Both Raman microspectroscopy and HPLC/HR-MS enabled the detection of several modifications in cell morphology. We also observed spectral signal and biomolecular changes during differentiation and underlined some lipid biomarkers (glucosylceramides and sphingomyelins). Morphological, spectral and biomolecular changes contributed altogether to determine of the differentiation stage. Results demonstrated the ability of HaCaT cells to differentiate *in vitro* (2D) till observing stratified layers, but we did not observe the formation of fully stratified layers, the latter can be obtained when using a 3D culture model.

Our data demonstrated clear biomolecular changes between D9 and D13, which may indicate the passage from the SG to the SC layer. In fact, literature indicates that after 3 weeks of incubation in a low-calcium concentration medium (0.03 mM), HaCaT cells proliferate, take a spindle shape but fail to stratify and to develop intracellular contact. This observation confirm the ability of HaCaT cells to revert back to a basal-like state – under a low-calcium concentration – as previously reported^{12, 18}. In contrast, to induce the differentiation process, HaCaT cells should be subjected to a high-concentration of calcium (2.8 mM). Two hours later, they start to take a more cuboidal shape with cell-cell contact¹⁵. These modifications occur to achieve the morphological characteristics of suprabasal layers^{15, 18}. In addition, the stratification layers and the flatter shape of several cells, which were observed at D9 and D13, may indicate the achievement of suprabasal layers but do not enable to determine morphologically the exact stage of keratinocyte differentiation. Wilson *et al.*, reported that the morphological modification should be confirmed biochemically by immunoblotting and immunofluorescence of protein and genes which are known as differentiation markers such as keratin-1 and involucrin⁸.

In this work, we are interested in demonstrating the morphological changes by following biomolecular modifications involving lipid, protein, and DNA using Raman microspectroscopy. Raman is a very suitable free label technique to follow cell differentiation at single cell level. The comparison of the mean Raman

spectra of each differentiation day demonstrated several modifications in the cells' spectra as shown in figure 2 and table 1. A high increase of the 960 cm^{-1} peak was detected after 13 days and particularly at the stratified layers. This peak has previously been assigned to the C-N vibration of saturated ceramides (such as ceramide III)²². In fact, in the outermost epidermal layer, ceramides are the dominant lipid class by weight (over 50%) of total lipids species besides free fatty acids (FFA) and cholesterol⁹. High ceramide content is considered as a marker of the SC layer. Ceramide class consists of fatty acid chains linked to a sphingoid base. Since in the human SC, the FFA are predominantly saturated⁴¹⁻⁴³, this may explain the high increase in saturated ceramides at the late stage of differentiation. This observation was also confirmed as shown in table (1), by the 3059 cm^{-1} peak at corresponding to the =C-H stretching, this peak decreased during differentiation and may indicate a decrease in the unsaturation chain, related to unsaturated ceramides. In addition, the high increase of the Raman peak at (960 cm^{-1}) is also related to an increase in the $\nu(\text{C-C})$ β -sheet keratin conformation²³. The SC layers (corneocytes) are rich in keratin filament, and a strong increase of the keratin component is a marker of SC layers²³.

When the keratinocytes reach the SC layer, they lose their nucleus and acquire a flatter shape to become corneocytes^{7, 44, 45}. Raman spectral images of HaCaT during differentiation permitted to follow the DNA/lipid ratio ($773\text{-}790\text{ cm}^{-1} / 2820\text{-}2890\text{ cm}^{-1}$) as shown in figure 3. Our results confirm the decrease of this ratio during the differentiation until it reaches its lowest value at D13. This observation is also confirmed by the characteristic band of nucleic acids at 725 cm^{-1} which decreased significantly at the last day (table 1). The decrease in the nucleic acids levels may confirm the achievement of a later stage of differentiation (SC).

Lipids are mainly found in the cell membrane zone. During keratinocytes differentiation, lipid biosynthesis evolves at early stages and forms at advanced stages the inter-corneocytes matrix of the *stratum corneum*.

In this study, the evolution of the lipid/protein ($2820\text{-}2890 / (2900\text{-}2970)\text{ cm}^{-1}$) ratio is an important marker to determine the keratinocytes differentiation stage. As shown in figure 3, after 3 days of high-calcium exposure, this ratio recorded a high increase throughout the cell (except the nucleus zone) indicating a high

lipid content compared to that of the proteins. In contrast, the decrease in the intensity at D6 and D9 could be due to an increase in the protein content such as keratin at this stage of differentiation. As shown in table (1), the Raman peak at 1658 cm^{-1} , which is related to the amide I of protein (α helix of keratin), significantly increased at D9. The highest and most homogeneous lipid / protein ratio was observed at D13 (figure 3). This increase reveals the formation of the inter-corneocytes lipid matrix (at the SC) which consists in particular of ceramides, cholesterol and free fatty acids. Literature links this increase to the decrease in the protein content subjected to the proteases of the SC – such as caspase 14 which contributes to the metabolization of filaggrin (involved in the terminal differentiation of keratinocytes and the formation of the cornified envelope in the *stratum corneum*) – leading to less (intact) protein in the outermost layers of the SC^{25, 46}.

We also followed the evolution of lipid biomarkers during differentiation as shown in figure 4 by HPLC/corona & HPLC/HR-MS. Sphingomyelins and glucosylceramides are recognized as markers of the SG layer¹¹. An increase in the glucosylceramides/ceramides and sphingomyelins/ceramides ratio was observed during differentiation. These ratios reached their maximum value at D9, and then started to decrease. This observation indicates the passage of keratinocytes from the SG (high glucosylceramides and sphingomyelins content at D9) to the SC layer (D 13).

To conclude, HaCaT cells subjected to a high-calcium concentration medium differentiated *in vitro* but did not show fully stratified layers. We detected, according to our 2D cell culture model, several modifications occurring at single cell level during differentiation. Our results demonstrate that Raman microspectroscopy is an efficient methodology that allows a free staining observation of epidermal cells. It is a powerful techniques to follow the biomolecular changes including lipid, protein, and DNA evolution with a high ability to determine their location throughout the cells. The complementary information obtained from both Raman microspectroscopy and (HPLC/corona & HPLC/HR-MS) clearly demonstrated molecular modifications between D9 and D13. Indeed, HaCaT cells presented a high increase in lipid and keratin contents, a decrease in DNA and proteins, and a decrease in the ratio of glucosylceramides/ceramides and

sphingomyelins/ceramides between D9 and D13. All these observations characterize the differentiation of HaCaT cells and their passage from SG to SC between these two days.

Acknowledgements

The authors would like to thank the SILAB - Jean PAUFIQUE Corporate Foundation of the financial support for this work.

Compliance with ethical standards Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

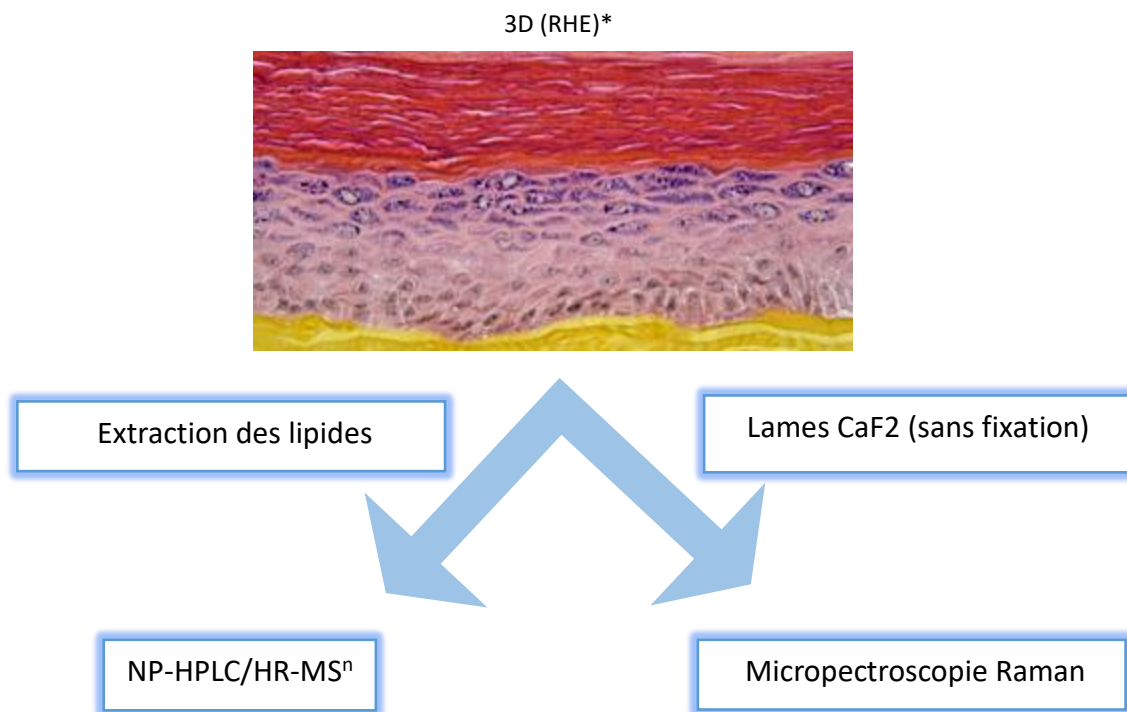
References

1. B. Breiden, H. Gallala, T. Doering and K. Sandhoff, *Eur J Cell Biol*, 2007, **86**, 657-673.
2. D. D. Bikle, Z. Xie and C. L. Tu, *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2012, **7**, 461-472.
3. L. Eckhart, S. Lippens, E. Tschachler and W. Declercq, *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1833**, 3471-3480.
4. A. Seo, N. Kitagawa, T. Matsuura, H. Sato and T. Inai, *Histochem Cell Biol*, 2016, **146**, 585-597.
5. M. Kyriotou, M. Huber and D. Hohl, *Exp Dermatol*, 2012, **21**, 643-649.
6. J. A. Bouwstra, P. L. Honeywell-Nguyen, G. S. Gooris and M. Ponec, *Prog Lipid Res*, 2003, **42**, 1-36.
7. M. Weil, M. C. Raff and V. M. Braga, *Curr Biol*, 1999, **9**, 361-364.
8. V. G. Wilson, *Methods Mol Biol*, 2013, **1195**, 33-41.
9. Y. Mizutani, S. Mitsutake, K. Tsuji, A. Kihara and Y. Igarashi, *Biochimie*, 2009, **91**, 784-790.
10. A. Kihara, *The Journal of Biochemistry*, 2012, **152**, 387-395.
11. M. Rabionet, K. Gorgas and R. Sandhoff, *Bba-Mol Cell Biol L*, 2014, **1841**, 422-434.
12. A. F. Deyrieux and V. G. Wilson, *Cytotechnology*, 2007, **54**, 77-83.
13. L. Micallef, 'UNIVERSITE DE LIMOGES 2009.
14. P. J. Houghton, P. J. Hylands, A. Y. Mensah, A. Hensel and A. M. Deters, *J Ethnopharmacol*, 2005, **100**, 100-107.
15. D. D. Bikle, *J Cell Biochem*, 2004, **92**, 436-444.
16. S. E. Lee and S. H. Lee, *Ann Dermatol*, 2018, **30**, 265-275.
17. L. Verzeaux, R. Vyumvuhore, D. Boudier, M. Le Guillou, S. Bordes, M. Essendoubi, M. Manfait and B. Closs, *Exp Dermatol*, 2017, DOI: 10.1111/exd.13388.
18. S. Pillai, D. D. Bikle, M. L. Mancianti, P. Cline and M. Hincenbergs, *J Cell Physiol*, 1990, **143**, 294-302.
19. E. G. Bligh and W. J. Dyer, *Can J Biochem Physiol*, 1959, **37**, 911-917.
20. A. Mieremet, M. Rietveld, S. Absalah, J. van Smeden, J. A. Bouwstra and A. El Ghalbzouri, *PLoS One*, 2017, **12**, e0174478.
21. A. Assi, J. Bakar, D. Libong, E. Sarkees, A. Solgadi, A. Baillet-Guffroy, R. Michael-Jubeli and A. Tfayli, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019, DOI: 10.1007/s00216-019-02301-3.
22. A. Tfayli, E. Guillard, M. Manfait and A. Baillet-Guffroy, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, **397**, 1281-1296.
23. C. Choe, J. Schleusener, J. Lademann and M. E. Darvin, *Sci Rep*, 2017, **7**, 15900.
24. M. Gniadecka, O. Faurkov Nielsen, D. H. Christensen and H. C. Wulf, *J Invest Dermatol*, 1998, **110**, 393-398.
25. M. Janssens, J. van Smeden, G. J. Puppels, A. P. Lavrijsen, P. J. Caspers and J. A. Bouwstra, *The British journal of dermatology*, 2014, **170**, 1248-1255.
26. L. Verzeaux, R. Vyumvuhore, D. Boudier, M. Le Guillou, S. Bordes, M. Essendoubi, M. Manfait and B. Closs, *Exp Dermatol*, 2017, **27**, 403-408.
27. S. Tfaili, C. Gobinet, G. Josse, J. F. Angiboust, M. Manfait and O. Piot, *The Analyst*, 2012, **137**, 3673-3682.
28. G. Zhang, D. J. Moore, C. R. Flach and R. Mendelsohn, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007, **387**, 1591-1599.
29. N. Garcia, O. Doucet, M. Bayer, D. Fouchard, L. Zastrow and J. P. Marty, *International journal of cosmetic science*, 2002, **24**, 25-34.
30. Z. Movasaghi, S. Rehman and I. U. Rehman, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, **42**, 493-541.
31. N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow and H. Barr, *Faraday discussions*, 2004, **126**, 141-157; discussion 169-183.

32. A. D. Meade, O. Howe, V. Unterreiner, G. D. Sockalingum, H. J. Byrne and F. M. Lyng, *Faraday discussions*, 2016, **187**, 213-234.
33. L. Franzen and M. Windbergs, *Advanced drug delivery reviews*, 2015, **89**, 91-104.
34. S. Tfaili, C. Gobinet, G. Josse, J. F. Angiboust, A. Baillet, M. Manfait and O. Piot, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2013, **405**, 1325-1332.
35. H. Wang, T. H. Tsai, J. Zhao, A. M. Lee, B. K. Lo, M. Yu, H. Lui, D. I. McLean and H. Zeng, *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2012, **28**, 147-152.
36. S. Tfaili, A. Al Assaad, N. Fournier, F. Allaoui, J. L. Paul, P. Chaminade and A. Tfayli, *Talanta*, 2019, **199**, 54-64.
37. R. Vyumvuhore, A. Tfayli, H. Duplan, A. Delalleau, M. Manfait and A. Baillet-Guffroy, *The Analyst*, 2013, **138**, 4103-4111.
38. C. Choe, J. Schleusener, J. Lademann and M. E. Darvin, *Journal of biophotonics*, 2018, **11**, e201700355.
39. K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor and M. Baranska, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015, **46**, 4-20.
40. M. Egawa, K. Tokunaga, J. Hosoi, S. Iwanaga and Y. Ozeki, *Journal of biomedical optics*, 2016, **21**, 86017.
41. M. N. Ansari, N. Nicolaidis and H. C. Fu, *Lipids*, 1970, **5**, 838-845.
42. L. Norlen, I. Nicander, A. Lundsjo, T. Cronholm and B. Forslind, *Archives of dermatological research*, 1998, **290**, 508-516.
43. J. van Smeden and J. A. Bouwstra, *Current problems in dermatology*, 2016, **49**, 8-26.
44. O. Lopez, M. Cocera, P. W. Wertz, C. Lopez-Iglesias and A. de la Maza, *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**, 521-529.
45. D. T. Downing, *J Lipid Res*, 1992, **33**, 301-313.
46. C. Capallere, C. Plaza, C. Meyrignac, M. Arcioni, M. Brulas, V. Busuttil, I. Garcia, E. Bauza and J. M. Botto, *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 2018, **53**, 45-56.

CHAPITRE 5

Développement de méthodes analytiques sur un modèle cellulaire en 3D: Épiderme Reconstitué Humain (RHE)



RHE* : modèle de l'épiderme reconstitué humain « sain » (Episkin)[®]. <https://www.episkin.com/Episkin>

Les modèles cellulaires en 3D miment l'environnement biologique *in vivo* mieux que les modèles en 2D.

Durant ces dernières années, plusieurs modèles de peau humaine reconstruite ont été développés, et certains d'entre eux sont commercialement disponibles. Dans ce travail nous avons utilisé le modèle d'Epiderme Reconstituit Humain (Episkin®). Ce modèle est obtenu en cultivant des kératinocytes humains adultes non transformés sur un substrat de collagène dans des conditions qui permettent leur différenciation terminale et pour former un modèle multicouche hautement différencié de l'épiderme. Il se compose des couches basale, épineuse et granuleuse organisées et d'une couche cornée contenant des lipides lamellaires intercellulaires représentant les classes principales de lipides comparables à celles trouvées *in vivo*^{1, 2}. L'utilité de tout modèle dépend de sa caractérisation vis-à-vis du système réel qu'elle vise à imiter. Dans notre cas, le système à imiter est l'épiderme qui est en fait une organisation complexe de cellules et structures responsables de plusieurs fonctions essentielles de l'homéostasie corporelle. Une des conditions préalables des modèles de peau reconstruite *in vitro* est que leur fonction de barrière, qui réside dans la couche supérieure de l'épiderme (couche SC), imite la peau native. À cet effet, différentes techniques ont été mises en œuvre pour caractériser les modèles RHE et leur fonction de barrière cutanée afin d'évaluer la possibilité de les utiliser pour des méthodes alternatives aux tests sur les animaux^{3, 4}.

Dans ce chapitre, seront décrites les 3 études réalisées sur les modèles RHE Episkin® :

Etude 1 : Nous nous sommes intéressés dans cette première étude à approfondir l'identification des structures fines des lipides et plus particulièrement des biomarqueurs lipidiques de la différenciation des kératinocytes (Céramides, Glucosylcéramides et Sphingomyélines). Nous avons choisi de travailler sur un jour de maturation bien avancé (jour 22) afin de détecter une quantité importante de lipides. En se basant sur l'analyse MS/MSⁿ, il a été possible de développer les schémas de fragmentation permettant d'identifier la micro-hétérogénéité structurale de ces biomarqueurs au sein des sous-classes de céramides. Grâce à cette méthode de caractérisation nous avons mis en évidence une nouvelle sous-classe de céramides: il s'agit de céramides doublement estérifiés (1-O-E (EO) Cer). Au vu de la structure chimique très hydrophobe de cette nouvelle sous-classe, nous supposons qu'elle peut jouer un rôle important dans la fonction de la barrière cutanée. Cette étude est présentée dans l'article 2.

Etude 2 : L'objectif principal de cette étude a été de vérifier dans le SC humain la présence ou non de la nouvelle sous-classe des céramides (1-O-E (EO) Cer) préalablement découverte dans le RHE (étude 1). En utilisant la méthode de caractérisation développée précédemment et en réalisant une analyse MS/MSⁿ ciblée, nous avons pu confirmer la présence de cette sous-classe dans le SC humain. De plus cette investigation approfondie dans le SC humain et également dans le RHE a permis de mettre en évidence une autre nouvelle sous-classe de céramides faiblement représentée: il s'agit de céramides doublement estérifiés

mais dans lesquels l'acide gras lié à la base sphingoïde en position 1-O via une liaison ester est hydroxylé en position α (A-1-O-E (EO) Cer). Cette étude est présentée dans l'article 3.

Étude 3 : Dans cette dernière étude sur les modèles RHE Episkin®, le but principal a été de mieux caractériser ces modèles au plan moléculaire afin de faire le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC. À ce sujet, une approche multimodale qui offre des informations complémentaires et essentielles vis-à-vis de la fonction barrière a été utilisée. Dans cette étude, l'évolution temporelle du contenu lipidique a été suivie tout au long de la différenciation (de j12 à j24) et non pas à un seul jour de maturation. L'approche multimodale a permis de faire un lien entre cette évolution dans la composition des lipides avec d'autres éléments importants comme : la cinétique de pénétration percutanée de la caféine, l'évolution dans l'organisation lipidique et l'évolution de l'épaisseur des couches cutanées par microspectroscopie Raman. La combinaison de ces techniques (approche multimodale), a permis de déterminer la période de maturation à partir de laquelle est installée une barrière cutanée fonctionnelle. Cette étude est présentée dans l'article 4.

Au plan méthodologique,

Pour ces trois études, la méthode chromatographique développée sur les modèles en 2D a été appliquée directement sur les modèles en 3D. Le protocole d'extraction des lipides a été adapté au modèle 3D.

Afin d'approfondir la caractérisation des lipides et surtout d'identifier les structures fines de biomarqueurs lipidiques de la différenciation, nous avons établi des schémas de fragmentation par classe en MSⁿ.

Dans la 3^{ème} étude, certains paramètres d'acquisition en microspectroscopie Raman ont été adaptés pour l'analyse des échantillons en 3D. Pour les analyses des modèles RHE en 3D, les images spectrales ont été réalisées par sections optiques (XZ) grâce à la confocalité du système. L'optimisation des paramètres doit prendre en compte la perte du signal et la détérioration de la résolution pour les analyses en profondeur.

L'objectif du microscope utilisé est le même que celui pour les mesures des cultures cellulaires en 2D ($\times 100$ LF). Bien que la résolution axiale à la surface soit meilleure avec le $\times 100$ CF (Ouverture Numérique (O.N.) =1) comparée à celle obtenue avec le $\times 100$ LF (O.N.=0.75), celle-ci se détériore en analysant en profondeur avec une plus grande détérioration en travaillant avec une O.N.=1. L'objectif $\times 100$ LF qui a été choisi pour l'analyse en 2D a donc été également choisi pour les analyses en 3D.

Les deux paramètres optimisés pour les analyses en 3D sont le trou confocal et le nombre d'accumulations

Pour les images XZ réalisées sur les modèles 3D, le choix s'est porté sur une ouverture du trou confocal de 200 μm qui permet d'améliorer la résolution axiale. L'augmentation du nombre d'accumulations (5) compense la perte d'intensité du signal (Tableau 5-1).

TABLEAU 5-1 : Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses en microspectroscopie Raman sur le modèle cellulaire en 3D. Les paramètres modifiés par rapport aux analyses de culture en 2D sont indiqués en rouge.

	Modèle cellulaire en 3D
Paramètres	Images spectrales
Objectif	$\times 100$ LF
Temps d'acquisition (s)	5
Accumulations	5
Trou confocal (μm)	200
Fente (μm)	300
Réseau dispersif (traits/mm)	300
Gamme spectrale (cm^{-1})	400-3800

Références associées au texte introductif concernant les études sur EpiSkin®

1. Alepee, N.; Grandidier, M. H.; Cotovio, J., Usefulness of the EpiSkin reconstructed human epidermis model within Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2019**, *54*, 147-167.
2. Netzlaff, F.; Lehr, C. M.; Wertz, P. W.; Schaefer, U. F., The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2005**, *60* (2), 167-78.
3. Ponec, M.; Boelsma, E.; Gibbs, S.; Mommaas, M., Characterization of reconstructed skin models. *Skin pharmacology and applied skin physiology* **2002**, *15 Suppl 1*, 4-17.
4. Ponec, M.; Gibbs, S.; Pilgram, G.; Boelsma, E.; Koerten, H.; Bouwstra, J.; Mommaas, M., Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. *Skin pharmacology and applied skin physiology* **2001**, *14 Suppl 1*, 63-71.

Article 2:

Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MS n: 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass.

Ali Assi, **Joudi Bakar****, Danielle Libong, Elie Sarkees, Audrey Solgadi, Arlette Baillet-Guffroy, Rime Michael-Jubeli*, Ali Tfayli

Paru dans « Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC) » [10.1007/s00216-019-02301-3](https://doi.org/10.1007/s00216-019-02301-3)

Contexte : Les lipides du SC jouent un rôle clé dans la fonction de la barrière cutanée. Dans cette étude, nous avons appliqué la méthode d'analyse développée dans un premier temps sur les modèles cellulaires en 2D et qui permet de séparer les différentes classes de lipides en une seule analyse en utilisant la Chromatographie Liquide en Phase Normale (NP-HPLC). En plus, dans cette étude nous avons affiné notre méthodologie d'identification de la micro-hétérogénéité structurale des lipides. Les informations obtenues grâce au couplage avec la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution **HR-MSⁿ**, nous ont permis de mettre en place une méthodologie de caractérisation des structures fines des biomarqueurs lipidiques (Céramides, Glucosylcéramides et Sphingomyélines) très approfondie. Cette caractérisation est en effet délicate en raison du nombre très élevé des entités structurales et de leur isomérisation.

Méthodes : Dans cette étude, les lipides de RHE ont été extraits puis analysés par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution HPLC/HR-MSⁿ. L'identification et la caractérisation des structures fines des lipides ont été réalisées en se basant sur les données de fragmentation MS²/MS³.

Résultats : Le protocole de séparation des lipides appliqué sur le modèle cellulaire en 3D confirme sa capacité à séparer l'ensemble des lipides de RHE en une seule analyse. La méthodologie de caractérisation des structures fines des lipides développée au sein de cette étude nous a permis d'identifier les glucosylcéramides et les sphingomyélines ainsi que les différentes sous-classes de céramides: **NS** (C41–C48), **AS** (C34 – C56), **OS** (C52 – C56), **EOS** (C64 – C72), **NdS** (C41-C48), **Ads** (C34-C56), **NP** (C34 – C56), **AP** (C42 – C52), **EAP** (C58–60), **NH** (C33 – C48), **AH** (C44 – C54), **OH** (C50–57), **ENH** (C61–66), **EAH** (C58–C64), **EOH** (C64-C70); et **NT** (C44 – C54), **OT** (C50–56), **ENT** (C57–60). De plus, cette méthode a permis de détecter une nouvelle sous-classe de céramides : il s'agit de céramides doublement estérifiés (1-O-E (EO) Cer) sur la position 1-O de la base sphingoïde avec une longue à très longue chaîne d'acyle (1-O-E) et sur la position ω de l'acide gras avec l'acide linoléique (EO).

** : ASSI et BAKAR ont contribué à parts égales à ces travaux

Conclusion : Cette étude prouve la capacité de la méthode d'analyse développée à séparer l'ensemble des lipides et caractériser leur structure fine et plus particulièrement identifier la micro-hétérogénéité structurale des biomarqueurs lipidiques (Céramides, Glucosylcéramides et Sphingomyélines). La découverte d'une nouvelle sous-classe de céramides peut être une piste très intéressante pour les chercheurs : au vu de leur formule chimique et leur hydrophobicité, nous supposons que ces molécules peuvent jouer un rôle important dans la fonction de la barrière cutanée.



Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MSⁿ: 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass

Ali Assi¹ · Joudi Bakar¹ · Danielle Libong¹ · Elie Sarkees¹ · Audrey Solgadi² · Arlette Baillet-Guffroy¹ · Rime Michael-Jubeli¹ · Ali Tfayli¹

Received: 25 September 2019 / Revised: 5 November 2019 / Accepted: 22 November 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Stratum corneum lipids are responsible for the skin's barrier function. They are the final product of epidermis lipid biosynthesis. During this process, lipids evolve from simple to complex structures in three main levels respectively (*stratum basal level*, *stratum granulosum level*, and *stratum corneum level*). Our aim was to simultaneously analyze and characterize the structure of total epidermis lipids. A powerful analytical method (normal-phase liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (NPLC/HR-MSⁿ)) was developed in order to separate, in a single run, lipid classes with a wide polarity range. Chromatographic conditions were particularly designed to analyze lipids of intermediate polarity such as ceramides. Rich information was obtained about the molecular structure of keratinocyte differentiation biomarkers such as ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins and the microstructures of reconstructed human epidermis lipids using HR-MSⁿ. A new subclass of ceramides, 1-O-Acyl Omega-linoleoyloxy ceramides [1-O-E (EO) Cer] has been highlighted. This class is double esterified on the 1-O-position of sphingoid base with long to very long chain acyl residues (1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linolenic acid (EO). Considering its chemical structure and hydrophobicity, this subclass can contribute to the skin barrier. In addition, we detected a new epidermis sphingomyelins. Our lipidomic approach offers a direct access to epidermis biomarkers.

Keywords 1-O-E (EO) Cer · Ceramides · Glucosylceramides · Sphingomyelins · Reconstructed human epidermis · NPLC/HR-MSⁿ

Abbreviations

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
APPI	Atmospheric pressure photoionization
CER	Ceramide
ESI	Electrospray ionization
FFA	Free fatty acid
GlcCER	Glucosylceramide

HPLC	High-performance liquid chromatography
HR-MS	High-resolution mass spectrometry
LA	Linoleic acid
NPLC	Normal-phase liquid chromatography
RHE	Reconstructed human epidermis
RP-LC	Reversed-phase liquid chromatography
SC	<i>Stratum corneum</i>
SM	Sphingomyelin
Sph	Sphingoid base moiety
ULC	Ultra-long chain

Ali Assi and Joudi Bakar contributed equally to this work.

✉ Rime Michael-Jubeli
rime.michael-jubeli@u-psud.fr

- ¹ Lip(Sys)2, Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France
- ² SAMM, UMS IPSIT, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

Introduction

The epidermis is the upper layer of the three main skin layers: hypodermis, dermis, and epidermis [1]. It acts as a protective barrier against water loss and eliminates foreign substances and micro-organisms [2]. The barrier function strongly relies

on the outermost layer of the epidermis, the *stratum corneum* (SC) [3]. The SC is composed of three major components: corneocytes, corneodesmosomes, and an intercellular lipid matrix [4] which is responsible for the formation and maintenance of the skin barrier [5–7]. The major lipid classes in human's SC are cholesterol, free fatty acids, and ceramides (CERs). Ceramides are essential to maintain the integrity of the skin barrier and the epidermis hydration [8].

Since various ceramide species and metabolites have well-recognized roles in signaling different cellular outcomes, such as proliferation, differentiation, and/or apoptosis, therefore, it is increasingly important to understand how the production and the function of ceramides are controlled in the epidermis. Reduced levels of epidermal ceramides have been linked to water loss and barrier dysfunction [9]. Conversely, inappropriate accumulation of some ceramides leads to keratinocyte's death and alteration of barrier function [10, 11]. These observations indicate that the balance of ceramide metabolism plays a major role in the state of the skin barrier. Ceramides are synthesized from keratinocytes by de novo pathway. At the level of germinative cells, newly synthesized CERs are immediately converted to glucosylceramides (GlcCERs) and sphingomyelins (SM). These molecules are then packaged in single secretory lamellar bodies (LB), which their quantities increase in the later stages of keratinocyte differentiation. GlcCERs and SMs are transported and secreted at the interface of *stratum granulosum* and *stratum corneum*, where they are respectively hydrolyzed by beta-glucocerebrosidase and sphingomyelinase and then converted to CERs [9]. These elements are mostly known at the level of lipid classes but remain unclear at their structural microheterogeneity. However, the variations in compactness of intercorneocyte lipids observed during ageing and in several skin diseases are correlated with the structural microheterogeneity of ceramides [12–14].

Our aim is to develop an analytical method to separate the epidermis lipid classes in a single run and to characterize three main lipid classes: ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins at a molecular level, in order to follow—in further studies—the evolution of these lipids during the keratinocyte differentiation through all epidermis layers. In fact, these three classes are considered to be the biomarkers of the principal steps of the epidermis lipid biosynthesis.

Numerous analytical advances [15–17] have been made in the past few years allowing the separation and the characterization of these epidermal lipids but often they are limited to lipid classes and subclasses, which differed by the number and/or position of the hydroxylation, the length and/or number of fatty acid chain, and the number and position of the unsaturation. In addition to the large difference in the polarity between the classes and the large number of molecules, the structural microheterogeneity within each class or subclass can be considered a source of complexity in the characterization of such a lipid mixture.

Although several studies have established an analytical method of total lipids [18], our analytical method is specific to the epidermis lipidome: free fatty acids, cholesterol, glycerides, ceramides, glucosylceramides, sphingomyelins, and phospholipids. The particularity of this lipidome is that the majority of the lipid classes are ceramides. This class can be composed by fifteen subclasses based on the polarity of the polar head. In contrast of ceramides found in other body regions, ceramides in the *stratum corneum* have a wide variety of structures [19, 20]. A ceramide is composed of a sphingoid base and a fatty acid [21, 22]. In human SC, the CERs differ from each other in the architecture of the polar head group, the length of the acyl chain, and their unsaturations. They can be subdivided into five groups based on sphingoid base: dihydrosphingosine (DS), sphingosine (S), phytosphingosine (P), 6-hydroxysphingosine (H), or the dihydroxy-dihydro sphingosine (T) [23, 24]. Regarding the part of fatty acids, the acyl chain is a non-hydroxy (N), α -hydroxy (A), or ω -hydroxy (O) [25]. The latter class, esterified ULC-ceramides, represents a distinctive class of skin ceramides, and derived from esterification (E) of the ω -hydroxyl group of the ULC fatty acid moiety (O) [21, 26–28]. These ceramides could be ester bound either to another FA (predominantly linoleic acid (C18:2)) (EO) or to glutamate residues of the proteins (mostly involucrin) at the surface of a corneocyte (PO). The letter E precedes for ceramide esterified with another FA, and P for ceramides bound to proteins. In addition, Rabionet et al. [29] have identified the class of 1-O-acylceramides (1-O-AcylCers) with three hydrophobic chains, the third chain ester-linked to the primary hydroxyl in position 1 of the sphingoid base (1-O-E), as 1-O-ENS and 1-O-EAS ceramides. Noteworthy, this complexity can be encountered also in ceramide precursors: glucosylceramides and sphingomyelins classes, contributing to complex molecular heterogeneity of epidermal lipids.

Lipid epidermis profiling and molecular characterization represents a real analytical challenge and requires the use of a highly efficient chromatographic separation coupled to mass spectrometric detection.

In RP-LC, the retention of lipid molecular species is mainly governed by the extent of interaction between the hydrocarbonaceous moiety of the molecule and the stationary phase where the nature of the polar group is playing a minor role [30]. NPLC remains interesting to the analysis of a total lipid extract and the objective to a complete separation of lipid classes [15, 31–35]. The mobile phases are usually made of solvent mixtures to ensure miscibility and to encompass a wide range of polarity. The main advantage of NPLC is the elution of lipids according to their polar moieties or “head group” which also defines their family or “lipid class.” In complex lipid mixtures analysis, NPLC produces easily interpreted chromatograms in which molecular species of the same class co-elute within a single peak. Mass spectrometry is

normally used to access the molecular species identification and relative distribution [32].

In this configuration, the selection of the most appropriate interface with the mass spectrometry represents an important element in the development of the analytical method, because the ionization mode could have a significant impact on the detection of molecules. According to the literature, ESI does not allow the detection of the whole lipid classes especially the non-polar lipids [30, 32, 36]. In addition, important ceramides with a ω -ester linkage, such as Cer [EOS], Cer [EOP], and Cer [EOH], were not accessible [13]. Coupled with APCI, provided satisfactory results, but APPI is generally more sensitive and does not require any dopant make-up in NPLC chromatographic conditions [32].

In this publication, we suggest an analytical method for the structural identification and the overall evaluation of all molecules in epidermis lipid classes and subclasses (cited above). The developed approach has been used to characterize the lipids of reconstructed human epidermis especially the biomarkers of the keratinocyte differentiation. In addition, we describe a new class of epidermal ceramides. These ceramides contain an ultra-long chain esterified with a linoleic acid in the N- position and a long to very long acyl chains in the 1-O- position of the sphingoid base. We suggest naming these compounds 1-O-E (EO) Cer. Considering their chemical structure and hydrophobicity, we expect that this new identified subclass contributes to the skin barrier. Moreover, up until now, sphingomyelins were considered precursors exclusively for sphingosine-containing NS- and AS-ceramides. In this work, we characterized several sphingomyelin subclasses which could be precursors of other ceramide subclasses such as NdS, NP, NH, NT, AH, AdS, AP, EOS, and EOH. This new chemical information leads to biological interpretations that could be very interesting in understanding the barrier function.

Material and method

Chemicals

All analytical standards (tripalmitin (TG (16:0/16:0/16:0)), dipalmitin (DG (16:0/16:0)), monostearin (MG (18:0)), cholesterol (Chol), palmitic acid (FFA (16:0)), ceramide 1 (EOS (d18:1/26:0/18:1)), ceramide 9 (EOP (t18:0/26:0/18:1)), ceramide 3 (NP (t18:0/18:0)), ceramide 3A (NP (t18:0/18:2)), ceramide 3B (NP (t18:0/18:1)), and ceramide 6 (AP (t18:0/18:0)); glucosylceramides (GlcCER); phospholipids (PL) (phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE)); and sphingomyelins (SM)) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Glucosylceramides (GlcCER (d18:2/16:0)) and sphingomyelins (SM (d18:1/12:0)) mono-compounds were

purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA) for fragmentation investigative.

Solvents for extraction and for NPLC/APPI-HR-MSⁿ were of HPLC grade and were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Lipid mixture

Test mixture is composed by 14 lipids standards: tripalmitin (TG), dipalmitine (DG), cholesterol (Chol), palmitic acid (FFA), monostearin (MG), ceramide 1 EOS, ceramide 9 EOP, ceramide 3 NP, ceramide 6 AP, glucosylceramides (GlcCER), phospholipids (PL) (phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE)) and sphingomyelins (SM), at an individual concentration of 0.5 g/L in chloroform.

Instrumentation and analytical method NPLC/APPI-MS

Samples were analyzed in HPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). The separation of the lipids was carried out in normal-phase liquid chromatography using a polyvinyl alcohol (PVA)-Sil column (PVA-bonded column; 5 μ m particle size, 150 \times 4.6 mm) purchased from YMC (Kyoto, Japan). NPLC was performed using a solvent gradient of heptane/ethyl acetate (99.8:0.2 v/v) (Solvent A), acetone and ethyl acetate (2:1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v) (solvent B), and 2-propanol/water (85:15, v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v) (solvent C). The mobile phases and the solvent program are presented in Table 1. The flow rate was set at 1 mL min⁻¹. The injected volume was 10 μ L.

The outgoing LC flow rate was split in post-column into two detectors: a Corona CAD[®] and an hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an atmospheric pressure photoionization (APPI). A negative APPI was used for analysis of free fatty acids and a positive APPI for the identification of the other lipid classes. The APPI heater was set to 400 °C and the heated capillary to 350 °C. Sheath gas and auxiliary gas flow rates were set at 40 and 5 L/min respectively. The mass scan range was 220–1800 atomic mass units (amu). A full scan detection mode and fragmentation was performed by the orbital trap at a resolution of 100,000. The MS²/MS³ spectra were obtained simultaneously in data-dependent acquisition (DDA) mode. Fragmentation was performed in CID (collision-induced dissociation) at 35 eV of collision energy in positive ionization mode in the double linear trap with high resolution. For MS², CID was performed on the 5 most abundant precursor ions with a signal threshold 10⁺³. For MS³, CID was performed on the 3 most abundant ions with a signal threshold 10⁺³. Dynamic exclusion parameters were

Table 1 Composition of the ternary gradient of the mobile phase in NPLC/HR-MSⁿ. Phase A: heptane/ethyl acetate (99.8:0.2, v/v), B: acetone/ethyl acetate (2:1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v), and C: 2-propanol/water (85:15, v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v)

Temps (min)	Phase A (%)	Phase B (%)	Phase C (%)
0	100	0	0
3	100	0	0
5	97	3	0
10	94	6	0
15	80	20	0
20	70	30	0
25	60	40	0
30	50	50	0
35	46	39	15
40	40	30	30
50	40	0	60
51	40	0	60
56	0	100	0
61	0	100	0
62	100	0	0
74	100	0	0

as follows: repeat count, 3 of each parent ion; repeat duration, 30 s; exclusion duration, 15 s; and exclusion mass, 1.5 *uma*. Analyses were performed using Thermo Fisher Xcalibur software. Data were searched at ± 10 ppm between theoretical mass experimental values.

Artificial skin

Episkin® (Episkin, France) is a reconstructed human epidermis (RHE) model obtained from the culture of normal human-derived epidermal keratinocytes (NHEK) on polycarbonate filters in the interface air-liquid. Culture diameter is 0.5 cm² for each sample. Over 11 days of culture, RHE represents a multilayered model of the human epidermis. Samples were received at age of 11 days, then transferred into the medium supplied by the provider and incubated until D22 in CO₂ at 37 °C.

Extraction procedure

Total lipids of cell cultures were extracted by the modified methods of Folch [37, 38] and Bligh and Dyer [39]. The epidermis was separated from the polycarbonate filters using pliers, placed into 1.5 mL of methanol, then vortexed for 2 min. Three milliliters of chloroform was added and the agitation of the whole volume was done at room temperature during 1 h in the dark. For the separation phase, 1.5 mL of water was added and mixed using a magnetic agitator for

10 min at room temperature. Centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 20 °C was done. Recovery for the organic phase was achieved. Two milliliters of chloroform was added on the aqueous phase (H₂O + methanol + skin) as a washing phase and the whole mixture was vortexed and centrifuged for 10 min at 3000 rpm and at 20 °C. The organic phase was collected and evaporated under a stream of nitrogen until dryness. The lipid residue was taken up with 20 μ L of chloroform.

Results

Chromatographic separation

Our objective was to achieve the highest degree of separation allowing the characterization of epidermis lipidome. For this purpose, a developed analytical method was tested on a mixture composed of 14 lipid standards representing all lipid classes in the epidermis. Separation of lipids was based on the NPLC method developed by Graeve et al. [15]. The elution gradient was the increasing polarity to increase eluting force. The initial eluent n-heptane modified with 0.2% ethyl acetate (solvent A) was selected because of its low polarity to separate non-polar lipids. Separation of triglycerides, diglycerides, and monoglycerides was achieved with a slow increase of solvent B from 3 to 6% during 5.0 min after the initial period of 5 min of the gradient program. The final proportion of 50% solvent B was found to be optimal for the separation of the remaining neutral lipids such as free fatty acids and especially ceramide subclasses. All neutral lipids were fully eluted before 38 min. With increasing proportions of eluent C, the polar lipids were eluted such as phospholipids and sphingomyelins (Table 2). As a final step, a progressive return to initial conditions was achieved, using first solvent B (5 min) followed by solvent A

Table 2 Retention time of analytical standards lipids in NPLC/HR-MSⁿ

Analytical standards	Retention time (min)
Tripalmitin (TG)	10.36
Dipalmitin (DG)	14.59
Cholesterol (Chol)	15.12
Palmitic acid (FFA)	15.6
Monostearin (MG)	20.43
Ceramide 1 EOS	21.11
Ceramide 9 EOP	21.75
Ceramide 3 NP	23.74
Ceramide 6 AP	24.84 and 27.91
Glucosylceramides (GlcCER)	36.96
Phospholipids (PL: PI, PC, PE)	40–43
Sphingomyelins (SM)	44.16

(12 min) at 1 mL/min. The total run time between injections and elution of all lipid classes was 51 min.

Therefore, we optimized new analytical conditions allowing a good separation of the overall lipid classes. Moreover, an ideal elution window of the ceramide subclasses in the area of medium polarity lipids with retention times intermediate between monoglycerides (MG) and glucosylceramides (GlcCER) was obtained. In addition, this gradient profile offers the possibility to separate sphingomyelins from the other phospholipids which represent a close degree of polarity. In summary, we were able in a single run to analyze all epidermis lipids with a good resolution, and especially, to separate the 3 classes (and subclasses) of interest for our biological objective: ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins (Fig. 1).

Identification of MS fragments

The study of fragmentation was carried out on analytical standards representing the overall epidermis lipid classes. In full scan mass spectra, one or two major ions of each lipid have

been identified: $[M-H]$ for free fatty acid, $[M+H-FA]^+$ for triglycerides, $[M+H-H_2O]^+$ for monoglycerides, diglycerides, and cholesterol. Regarding phospholipids class, we observed systematically $[M+H-polar\ head]^+$ while $[M+H]^+$ or $[M+Na]^+$ were detected depending on phospholipids type (PI, PC, or PE).

For non-esterified ceramides (such as NP, AP), two groups of interest were obtained in full scan and MS²: on the first hand, the molecular peak and the losses of several water molecules corresponding to the total number of hydroxyl groups on the ceramide polar head, on the other hand, the fragments of the sphingoid base part and the fatty acid part.

However, for esterified ceramides (such as EOS, EOP), a third additional group is obtained which gives information on the acid part combined to the ester moiety or the acid part combined to the base without the ester moiety (Fig. 2).

Regarding glucosylceramide and sphingomyelin, they were fragmented in the ionization source. Thus, we collected all information from the full scan mass spectra.

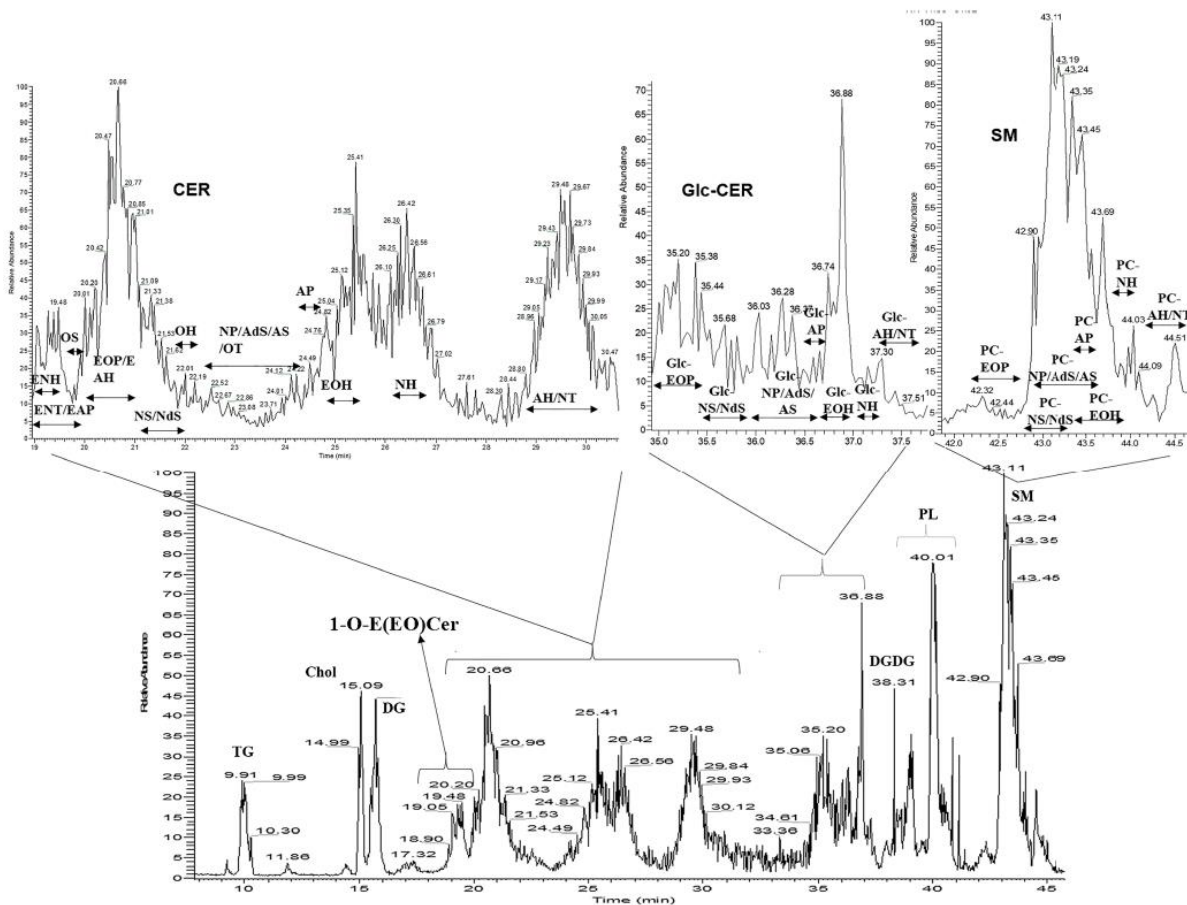


Fig. 1 NPLC/Corona® chromatographic profile of lipid classes and subclasses obtained for the RHE culture at D22

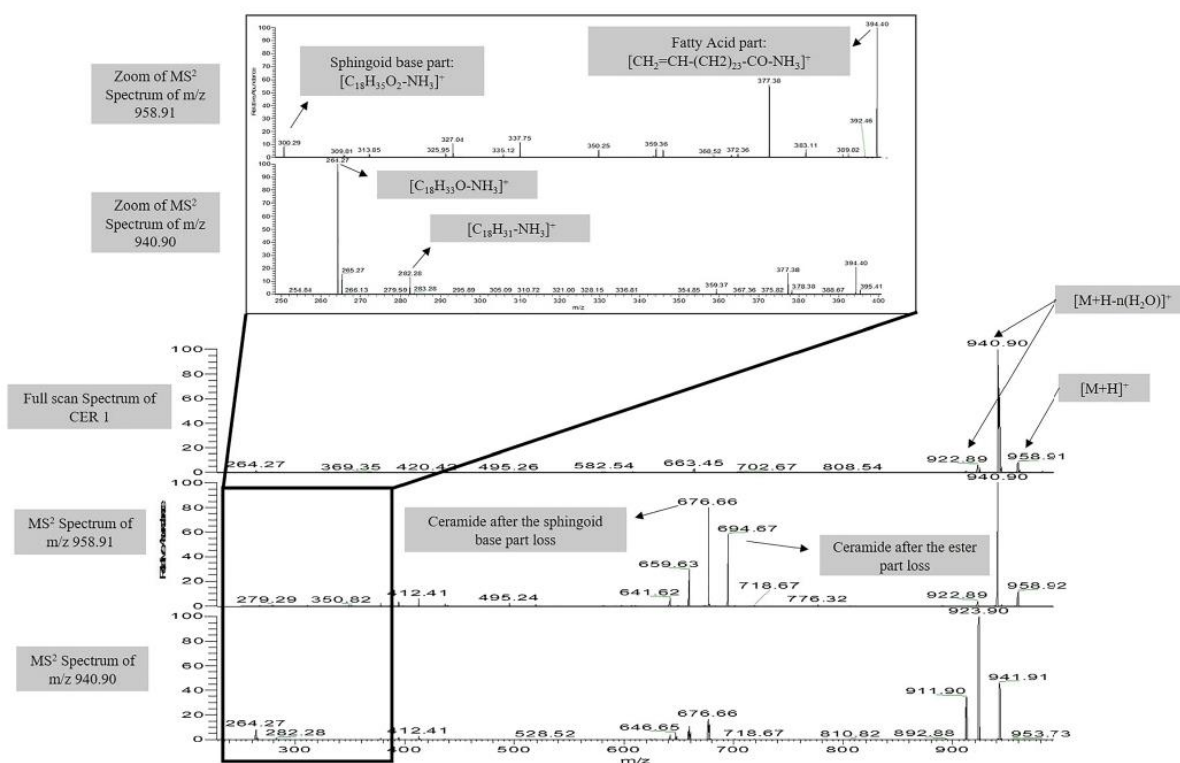


Fig. 2 Mass spectra obtained in full scan and MS² of esterified ceramide: ceramide 1 (EOS, C₆₂H₁₁₉NO₅ (d18:1/26:0/18:1))

Non-esterified ceramides

Ceramides 3 (NP, C₃₆H₇₃NO₄, t18:0/18:0), 3A (NP, C₃₆H₆₉NO₄, t18:0/18:2), and 3B (NP, C₃₆H₇₁NO₄, t18:0/18:1) The ceramide 3 carries 3 hydroxyls on its base moiety. In full scan mass spectrum, we detected the molecular peak [M+H]⁺ at *m/z* 584.56 and the losses of three water molecules corresponding to *m/z* 566.55, 548.54, and 530.53.

Fragmentation was achieved for the two most intense peaks of *m/z* 584.56 and 566.55.

Fragments exposed below could be obtained from the fragmentation of *m/z* 584.56 and/or *m/z* 566.55 using MS² mode.

Thus, we observed the peak of the sphingoid base part [CH₃-(CH₂)₁₃-(CH(OH))₂-CH(CH₂OH)-NH₃]⁺ at *m/z* 318.29 [C₁₈H₄₀NO₃]⁺ and fragments corresponding to three water losses at *m/z* 300.29 [C₁₈H₃₈NO₂]⁺, 282.28 [C₁₈H₃₆NO]⁺, and 264.27 [C₁₈H₃₄N]⁺.

In addition, the fragment [CH₃-(CH₂)₁₆-CO-NH₃]⁺ *m/z* 300.29 [C₁₈H₃₈NO]⁺ corresponds to the fatty acid part [FA+NH₃]⁺.

For ceramides 3A and 3B, the fragmentation is the same as ceramide 3 but with one unsaturation on the fatty acid part of CER 3B and two unsaturations on the fatty acid part of CER 3A. Then, in MS² spectra, the fatty acid

part of CER 3B and CER 3A was observed at *m/z* 280.26 [C₁₈H₃₄NO]⁺ and *m/z* 282.28 [C₁₈H₃₆NO]⁺ respectively (Fig. 3c).

Thus, in the case of CER 3A, [C₁₈H₃₆NO]⁺ is obtained from two fragmentation ways, one from the sphingoid base part and the second from the fatty acid part.

The characteristic fragments of the acid part as well as the base part are very useful in the determination of the carbon chain length and especially the number of unsaturation and hydroxyl groups that could be carried by each chain. This information reinforces the hypothesis on the corresponding ceramide subclass.

Ceramide 6 (AP, C₃₆H₇₃NO₅, (t18:0/18:0)) This ceramide contains 4 hydroxyl groups on its polar head of which one is on the fatty acid part. Similarly, in full scan spectrum, we observed the molecular peak [M+H]⁺ at *m/z* 600.55 with the losses of four water molecules at *m/z* 582.54, 564.53, 546.52, and 528.51.

Fragments exposed below could be obtained from the fragmentation of *m/z* 600.55 and/or *m/z* 582.54 using MS² mode.

Thus, we observed the peak of the sphingoid base part [CH₃-(CH₂)₁₃-(CH(OH))₂-CH(CH₂OH)-NH₃]⁺ at *m/z* 318.29 [C₁₈H₄₀NO₃]⁺ and fragments corresponding to three

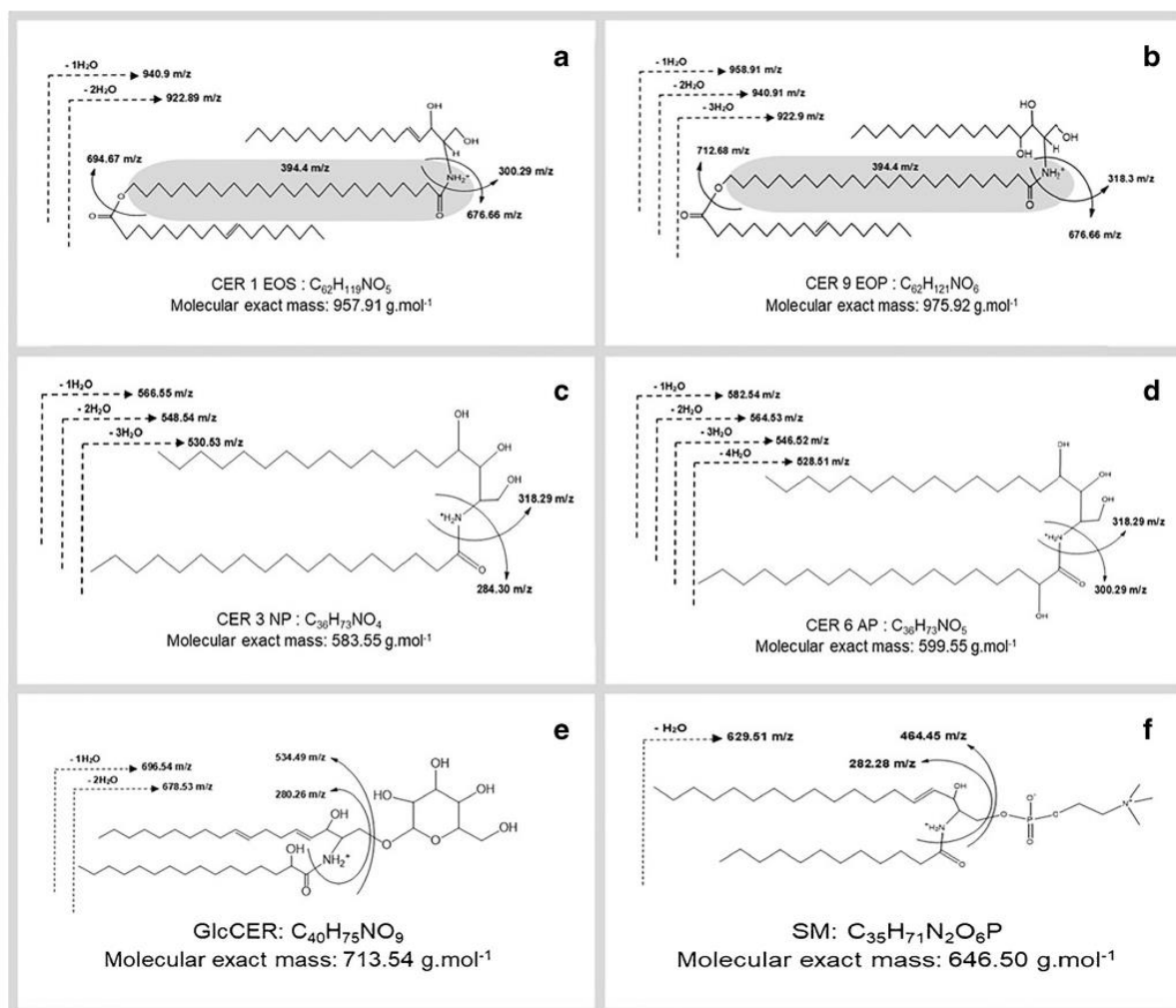


Fig. 3 The characteristic fragments observed in full scan and MS² spectra of analytical standards of ceramides: **a** CER 1 EOS, **b** CER 9 EOP, **c** CER 3 NP, **d** CER 6 AP, **e** GlcCER, **f** SM

water losses at m/z 300.29 [$C_{18}H_{38}NO_2$]⁺, 282.28 [$C_{18}H_{36}NO$]⁺, and 264.27 [$C_{18}H_{34}N$]⁺.

In addition, the fragment [$CH_3-(CH_2)_{15}-CH(OH)-CO-NH_3$]⁺ m/z 300.29 [$C_{18}H_{38}NO_2$]⁺ corresponds to the fatty acid part [FA+NH₃]⁺ (Fig. 3d).

Thus, [$C_{18}H_{38}NO_2$]⁺ is obtained from two fragmentation ways, one from the sphingoid base part and the second from the fatty acid part.

Esterified ceramides

Ceramide 1 (EOS, C₆₂H₁₁₉NO₅ (d18:1/26:0/18:1)) This ceramide is esterified on the ω position of its acid part and contains 2 hydroxyl groups on its base part moiety.

In the full scan spectrum, we observed the molecular peak [M+H]⁺ m/z 958.92 with two water losses of m/z 940.9 and m/z 922.99 corresponding to the number of hydroxyl groups.

Fragments exposed below could be obtained from the fragmentation of m/z 958.91 and/or m/z 940.9 using MS² mode.

Therefore, we observed m/z 300.29 corresponding to the sphingoid base part [$C_{18}H_{35}O_2-NH_3$]⁺ with fragments resulting from the losses of two water molecules at m/z 282.28 and m/z 264.27. In addition, we detected m/z 676.66 related to the acid part with the ester [$CH_3-(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_8-COO-(CH_2)_{25}-CO-NH_3$]⁺; the m/z 394.4 corresponding to the fatty acid part [FA+NH₃]⁺ only without the ester part [$CH_2=CH-(CH_2)_{23}-CO-NH_3$]⁺ was observed. Finally, the m/z 694.67 corresponds to the ceramide after the loss of the ester of the fatty acid part [$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-$

$\text{CH(OH)-CH(CH}_2\text{OH)-NH-CO-(CH}_2\text{)}_{24}\text{-CH}_2\text{-OH,H}^+$ (Figs. 2 and 3a).

Ceramide 9 (EOP, C₆₂H₁₂₁NO₆, (t18:0/26:0/18:1)) This ceramide is esterified on the ω position of its fatty acid part and contains 3 hydroxyl groups on its sphingoid base part.

In the full scan spectrum, we observe the molecular peak $[\text{M+H}]^+$ at m/z 976.92 with the losses of three water molecules at m/z 958.91, 940.91, and 922.9.

The fragmentation of m/z 976.92 and/or m/z 958.91 using MS² mode allowed the detection of: m/z 318.3 corresponding to the sphingoid base part $[\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{-NH}_3]^+$ and all the losses of three water molecules at m/z 300.29, 282.28, and 264.27. Moreover, m/z 676.66 corresponding to the acid part with the ester $[\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_8\text{-COO-(CH}_2\text{)}_{25}\text{-CO-NH}_3]^+$ and the m/z 394.4 matching the fatty acid part $[\text{FA+NH}_3]^+$ only without the ester part $[\text{CH}_2\text{=CH-(CH}_2\text{)}_{23}\text{-CO-NH}_3]^+$ were evidenced. Finally, the m/z 712.68 related to the ceramide after the loss of the ester of the fatty acid part $[\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{13}\text{-CH(OH)-CH(OH)-CH(CH}_2\text{OH)-NH-CO-(CH}_2\text{)}_{24}\text{-CH}_2\text{-OH,H}^+$ was observed (Fig. 3b).

Glucosylceramide (C40H75NO9, (d18:2/16:0))

In the full scan mass spectrum, we observed the molecular peak $[\text{M+H}]^+$ at m/z 714.55 which was associated with the fragment representing water molecule losses at m/z 696.54 and 678.53 that correspond to the hydroxyl groups carried by the fatty acid moiety and the base moiety.

However, glucosylceramide has lost the glucose moiety in the ionization source; thus, we detected $[\text{M+H-180}]^+$ at m/z 534.49, which was associated with m/z 516.48 and 498.47 due to the losses of two water molecules.

Finally, we observed m/z 280.26 matching the sphingoid base part after fatty acid part cleavage $[\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH=CH-CH(OH)-C(CH}_2\text{)-NH}_3]^+$ and one water molecule loss at m/z 262.25 (Fig. 3e).

Sphingomyelin (C₃₅H₇₁N₂O₆P, (d18:1/12:0))

Similarly, the sphingomyelin was fragmented in the ionization source. Then, in the full scan spectrum, we observed the molecular peak $[\text{M+H}]^+$ m/z 647.51 with one water molecule loss at m/z 629.51 corresponding to the hydroxyl group carried by the base moiety.

However, sphingomyelin has mainly lost the phosphocholine group in the ionization source; thus, we detected $[\text{M+H-183}]^+$ at m/z 464.45, which was more intense than the molecular peak, and we observed one water molecule loss at m/z 446.44.

Finally, we characterized the fragment corresponding to the sphingoid base part after the fatty acid part cleavage

$[\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-CH=CH-CH(OH)-C(CH}_2\text{)-NH}_3]^+$ at m/z 282.28 and one water molecule loss at m/z 264.27 (Fig. 3f).

Characterization of lipid epidermis

After the development of the separation protocol and the characterization method of ceramides as well as glucosylceramides and sphingomyelins, this method was used to study a biological sample: the reconstructed human epidermis at the 22nd day (D22) of differentiation. The lipids were extracted and analyzed using our approach, in which the totality of different lipid classes was detected: triglycerides, cholesterol, diglycerides, free fatty acids, and ceramides were eluted between 20 and 30 min, glucosylceramides detected at 36 min, and finally phospholipids and sphingomyelins detected at 40 and 43 min respectively (Fig. 1). The identification of ceramide subclasses, as well as glucosylceramides and sphingomyelins, was then achieved based on characteristic fragments defined above. For example, the most intense ceramide molecules in each class are exposed in Table 3. Thus, 15 subclasses of ceramides were determined. Based on a sphingoid base, we resume the identified ceramides and we indicate the range of the total carbon number of each subclass: sphingosine S: NS (C41–C48), AS (C34–C56), OS (C52–C56), EOS (C64–C72); dihydrosphingosine dS: NdS (C41–C48), Ads (C34–C56); phytosphingosine P: NP (C34–C56), AP (C42–C52), EAP (C58–60); 6-hydroxysphingosine H: NH (C33–C48), AH (C44–C54), OH (C50–57), ENH (C61–66), EAH (C58–C64), EOH (C64–C70); and tetrahydroxylated sphingoid base T: NT (C44–C54), OT (C50–56), ENT (C57–60) (Tables 4 and 5). In all subclasses, ceramides were saturated or unsaturated with one or two degrees of unsaturation on fatty acid moiety, and double unsaturation for ester chain when the ceramides are linked to linoleic acid.

In addition, we identified the glucosylceramides and sphingomyelins.

Interestingly, comparing the molecular composition of ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins, we are seeing the complete similitude of the ceramide moieties overall of these three lipid classes in terms of the total numbers of carbons, unsaturation, and hydroxyl groups on the polar head. Table 3 summarizes all identified classes and subclasses.

Identification of a novel ceramide subclass

A new ceramide subclass was detected in RHE sample; it was eluted at retention time between 19.0 and 20.0 min (Table 6). The particularity of this subclass is that the ceramide is double esterified: on the 1-O-position of sphingoid base with a long to very long chain acyl residues

Table 3 The identified ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins in a biological sample (RHE at D22). The first 3 columns show the identified subclasses of ceramides then their molecular formula and their retention time in columns 4 and 5 respectively. Columns 6 and 7 represent respectively the molecular formula and the retention time of identified glucosylceramides (if present) for each ceramide subclass. Finally, columns 8 and 9 show respectively the molecular formula and the retention time of identified sphingomyelins (if present) for each ceramide subclass. Different molecules could be co-eluted at the same retention time

Identified ceramide subclasses	Ceramides		Glucosylceramides		Sphingomyelins	
	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)
E(18:0) N(28:0) H(20:1)	C ₆₆ H ₁₂₉ NO ₅	19.32				
E(18:0) N(26:0) H(20:1)	C ₆₄ H ₁₂₅ NO ₅	19.39				
E(18:0) N(26:0) H(18:1)	C ₆₂ H ₁₂₁ NO ₅	19.46				
E(18:0) N(27:0) H(18:1)	C ₆₃ H ₁₂₃ NO ₅	19.48				
E(18:0) N(24:0) T(18:0)	C ₆₀ H ₁₁₉ NO ₆	19.53				
E(18:0) A(24:0) P(18:0)	C ₆₁ H ₁₁₉ NO ₅	19.54				
E(18:0) N(23:0) T(18:0)	C ₅₉ H ₁₁₇ NO ₆	19.68				
E(18:0) A(24:0) P(17:0)	C ₅₈ H ₁₁₅ NO ₆	19.75				
E(18:0) N(22:0) T(18:0)	C ₅₇ H ₁₁₃ NO ₆	19.84				
E(18:0) A(24:0) P(16:0)	C ₆₆ H ₁₂₇ NO ₅	19.99	C ₇₂ H ₁₃₇ NO ₁₀	35.29		
E(18:0) N(22:0) T(17:0)	C ₆₄ H ₁₂₃ NO ₅	20.06				
E(18:2) O(30:1) S(18:0)	C ₆₀ H ₁₁₇ NO ₆	20.26				
E(18:2) O(28:1) S(20:0)	C ₅₈ H ₁₁₃ NO ₆	20.5				
E(18:2) A(24:0) H(18:1)	C ₇₂ H ₁₃₇ NO ₅	20.62	C ₇₈ H ₁₄₇ NO ₁₀	36.03	C ₇₇ H ₁₄₉ N ₂ PO ₈	41.82
E(18:2) O(32:2) S(22:0)	C ₇₁ H ₁₃₅ NO ₅	20.74	C ₇₇ H ₁₄₅ NO ₁₀	35.88	C ₇₆ H ₁₄₇ N ₂ PO ₈	41.96
E(18:2) O(31:2) S(22:0)	C ₆₈ H ₁₂₉ NO ₅	20.9	C ₇₄ H ₁₃₉ NO ₁₀	35.29	C ₇₃ H ₁₄₁ N ₂ PO ₈	41.82
E(18:2) O(30:2) S(20:0)	C ₄₈ H ₉₅ NO ₃	21.15	C ₅₄ H ₁₀₅ NO ₈	35.88	C ₅₃ H ₁₀₇ N ₂ PO ₆	42.62
N(28:0) S(20:0)	C ₄₆ H ₉₁ NO ₃	21.28	C ₅₂ H ₁₀₁ NO ₈	36.18	C ₅₁ H ₁₀₃ N ₂ PO ₆	42.81
N(28:1) dS(20:0)	C ₄₇ H ₉₃ NO ₃	21.3	C ₅₃ H ₁₀₃ NO ₈	35.96	Not found	
N(26:0) S(20:0)	C ₄₄ H ₈₇ NO ₃	21.36	C ₅₀ H ₉₇ NO ₈	36.18	C ₄₉ H ₉₉ N ₂ PO ₆	43
N(26:1) dS(20:0)	C ₄₃ H ₈₅ NO ₃	21.37	C ₅₁ H ₉₉ NO ₈	36.18	C ₅₀ H ₁₀₁ N ₂ PO ₆	42.55
N(24:0) S(20:0)	C ₄₃ H ₈₅ NO ₃	21.52	C ₄₉ H ₉₅ NO ₈	36.33	C ₄₈ H ₉₇ N ₂ PO ₆	43.06
N(24:1) dS(20:0)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₃	21.59	C ₄₈ H ₉₃ NO ₈	36.4	C ₄₇ H ₉₅ N ₂ PO ₆	43.19
N(22:0) S(20:0)						
N(22:1) dS(18:0)						

Table 3 (continued)

Identified ceramide subclasses		Ceramides		Glucosylceramides		Sphingomyelins	
		Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)
N(25:0) S(16:1)	N(24:0) S(17:0)	C ₄₁ H ₈₁ NO ₃	21.66	C ₄₇ H ₈₁ NO ₈	36.55	C ₄₆ H ₉₃ N ₂ PO ₆	43.3
N(25:1) dS(16:0)	N(24:1) dS(17:0)						
N(20:0) P(16:0)	N(18:0) P(18:0)	C ₃₈ H ₇₃ NO ₄	22.12	C ₄₂ H ₈₃ NO ₉	37.07	C ₄₁ H ₈₅ N ₂ PO ₇	43.93
A(20:0) dS(16:0)	A(18:0) dS(18:0)						
N(18:0) P(16:0)	N(17:0) P(17:0)	C ₃₄ H ₆₉ NO ₄	22.26	C ₄₀ H ₇₉ NO ₉	37.14	C ₃₉ H ₈₁ N ₂ PO ₇	42.81
A(18:0) dS(16:0)	A(17:0) dS(17:0)						
N(26:0) P(22:0)	N(24:0) P(24:0)	C ₄₈ H ₉₇ NO ₄	22.78	C ₅₄ H ₁₀₇ NO ₉	36.55	C ₅₃ H ₁₀₉ N ₂ PO ₇	42.62
A(28:0) dS(20:0)	A(27:0) dS(21:0)						
N(24:0) P(22:0)	N(28:0) P(18:0)	C ₄₆ H ₉₃ NO ₄	22.98	C ₅₂ H ₁₀₃ NO ₉	36.93	Not found	
A(28:0) dS(18:0)	A(27:0) dS(19:0)						
N(26:0) P(18:0)	N(24:0) P(20:0)	C ₄₄ H ₈₉ NO ₄	22.99	C ₅₀ H ₉₉ NO ₉	36.93	C ₄₉ H ₁₀₁ N ₂ PO ₇	43.3
A(26:0) dS(18:0)	A(25:0) dS(19:0)						
N(24:0) P(18:0)	N(26:0) P(16:0)	C ₄₂ H ₈₅ NO ₄	23.14	C ₄₈ H ₉₅ NO ₉	37	C ₄₇ H ₉₇ N ₂ PO ₇	43.49
A(26:0) dS(16:0)	A(24:0) dS(18:0)						
N(25:0) P(18:0)	N(26:0) P(17:0)	C ₄₃ H ₈₇ NO ₄	23.2	C ₄₉ H ₉₇ NO ₉	36.63	C ₄₈ H ₉₉ N ₂ PO ₇	43.36
A(18:0) dS(25:0)	A(17:0) dS(26:0)						
N(24:0) P(17:0)	N(23:0) P(18:0)	C ₄₁ H ₈₃ NO ₄	23.44	C ₄₇ H ₉₃ NO ₉	36.93	C ₄₆ H ₉₅ N ₂ PO ₇	43.56
A(23:0) dS(16:0)	A(22:0) dS(18:0)						
N(24:0) P(16:0)	N(23:0) P(17:0)	C ₄₀ H ₈₁ NO ₄	23.57	C ₄₆ H ₉₁ NO ₉	37.07	C ₄₅ H ₉₃ N ₂ PO ₇	43.72
N(34:2) P(22:0)	N(32:2) P(24:0)	C ₅₆ H ₁₀₉ NO ₄	23.95	C ₆₂ H ₁₁₉ NO ₉	36.82	Not found	
A(34:1) S(22:1)	A(32:1) S(24:0)						
A(35:2) dS(21:0)	A(34:2) dS(22:0)						
N(30:1) P(22:0)	N(32:1) P(20:0)	C ₅₃ H ₁₀₃ NO ₄	24.19	C ₅₈ H ₁₁₃ NO ₉	36.88	C ₅₇ H ₁₁₃ N ₂ PO ₇	42.55
A(30:0) S(22:1)	A(32:0) S(20:0)						
N(34:2) P(18:0)	N(32:2) P(20:0)	C ₅₂ H ₁₀₁ NO ₄	24.34	C ₅₈ H ₁₁₁ NO ₉	36.88	C ₅₇ H ₁₁₁ N ₂ PO ₇	43.56
A(34:1) S(18:1)	A(32:1) S(20:0)						
A(31:2) dS(21:0)	A(34:2) dS(18:0)						
N(32:1) P(18:0)	N(30:1) P(20:0)	C ₅₀ H ₉₉ NO ₄	24.42	C ₅₆ H ₁₀₉ NO ₉	36.93	C ₅₅ H ₁₁₁ N ₂ PO ₇	43.64
A(32:0) S(18:1)	A(30:0) S(20:0)						
N(34:2) P(20:0)	N(34:2) P(22:0)	C ₅₄ H ₁₀₅ NO ₄	24.43	C ₆₀ H ₁₁₅ NO ₉	36.88	Not found	
A(34:1) S(20:1)	A(32:1) S(22:0)						
A(35:1) dS(19:0)	A(33:1) dS(21:0)						
N(30:1) P(18:0)	N(28:1) P(20:0)	C ₄₈ H ₉₅ NO ₄	24.51	C ₅₄ H ₁₀₅ NO ₉	36.93	C ₅₃ H ₁₀₇ N ₂ PO ₇	43.85
A(30:0) S(18:1)	A(28:0) S(20:0)						
A(31:1) dS(17:0)							
N(32:2) P(18:0)	N(30:2) P(20:0)	C ₅₀ H ₉₇ NO ₄	24.6	C ₅₆ H ₁₀₇ NO ₉	36.93	C ₅₅ H ₁₀₉ N ₂ PO ₇	43.72
A(32:1) S(18:1)	A(30:1) S(20:0)						

Table 3 (continued)

Identified ceramide subclasses			Ceramides		Glucosylceramides		Sphingomyelins	
	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)
A(32:2) dS(19:0)	A(31:2) dS(19:0)	A(29:2) dS(21:0)	C ₄₅ H ₈₉ NO ₄	24.96	C ₅₁ H ₉₉ NO ₉	36.93	C ₅₀ H ₁₀₁ N ₂ PO ₇	43.19
A(32:1) P(18:0)	A(30:1) P(20:0)	A(28:1) P(22:0)	C ₅₀ H ₉₉ NO ₅	24.6	C ₅₆ H ₁₀₉ NO ₁₀	37.14	C ₅₅ H ₁₁₁ N ₂ PO ₈	43.93
A(34:1) P(18:0)	A(32:1) P(20:0)	A(30:1) P(22:0)	C ₅₂ H ₁₀₃ NO ₅	24.68	C ₅₈ H ₁₁₃ NO ₁₀	37.22	C ₅₇ H ₁₁₅ N ₂ PO ₈	43.79
N(30:1) P(17:0)	N(29:1) P(18:0)	N(26:1) P(21:0)	C ₄₇ H ₉₃ NO ₄	24.9	C ₅₃ H ₁₀₃ NO ₉	36.93	C ₅₂ H ₁₀₅ N ₂ PO ₇	43.93
A(30:0) S(17:1)	A(29:0) S(18:0)	A(26:0) S(21:0)						
A(30:1) dS(17:0)	A(29:1) dS(18:0)	A(26:1) dS(21:0)						
N(27:1) P(18:0)	N(25:1) P(20:0)	N(24:1) P(21:0)	C ₄₅ H ₈₉ NO ₄	24.96	C ₅₁ H ₉₉ NO ₉	36.93	C ₅₀ H ₁₀₁ N ₂ PO ₇	43.19
A(27:0) S(18:1)	A(25:0) S(20:0)	A(24:0) S(21:0)						
A(28:1) dS(18:0)	A(25:1) dS(20:0)	A(24:1) dS(21:0)						
N(28:1) P(18:0)	N(26:1) P(20:0)	N(24:1) P(22:0)	C ₄₆ H ₉₁ NO ₄	25.1	C ₅₂ H ₁₀₁ NO ₉	36.93	C ₅₁ H ₁₀₃ N ₂ PO ₇	43.06
A(28:0) S(18:1)	A(26:0) S(20:0)	A(24:0) S(22:0)						
A(28:1) dS(18:0)	A(24:1) dS(21:0)							
N(25:1) P(17:0)	N(24:1) P(18:0)	N(20:1) P(22:0)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₄	25.15	C ₄₈ H ₉₃ NO ₉	36.93	C ₄₇ H ₉₅ N ₂ PO ₇	43.49
A(25:0) S(17:1)	A(24:0) S(18:0)	A(20:0) S(22:0)						
A(25:1) dS(16:0)	A(24:1) dS(17:0)	A(20:1) dS(19:0)						
N(26:1) P(18:0)	N(24:1) P(20:0)		C ₄₄ H ₉₇ NO ₄	25.22	C ₅₀ H ₉₇ NO ₉	36.93	C ₄₉ H ₉₉ N ₂ PO ₇	43.24
A(26:0) S(18:1)	A(24:0) S(20:0)							
A(26:1) dS(18:0)	A(27:1) dS(18:0)							
E(18:2) O(32:0) H(20:1)								
E(18:2) O(30:0) H(20:1)								
A(26:0) P(16:0)	A(25:0) P(17:0)	A(24:0) P(18:0)						
E(18:2) O(31:0) H(20:1)								
E(18:2) O(30:0) H(20:1)								
E(18:2) O(29:0) H(20:1)								
E(18:2) O(28:0) H(18:0)								
N(24:1) P(16:0)	N(20:1) P(20:0)	N(18:1) P(22:0)						
A(24:0) S(16:1)	A(20:0) S(20:0)	A(18:0) S(22:0)						
A(24:1) dS(17:0)								
E(18:2) O(28:0) H(20:1)								
N(18:1) P(16:0)	N(17:1) P(17:0)	N(16:1) P(18:0)	C ₆₀ H ₁₂₅ NO ₆	25.73	C ₇₂ H ₁₃₅ NO ₁₁	36.88	C ₇₁ H ₁₃₇ N ₂ PO ₉	42.26
A(18:0) S(16:1)	A(17:0) S(17:0)	N(16:0) S(18:0)	C ₃₄ H ₆₇ N O ₄	26.31	C ₄₀ H ₇₇ NO ₉	37.14	C ₃₉ H ₇₉ N ₂ PO ₇	44.62
A(17:1) dS(17:0)								
N(30:0) H(18:1)	N(28:0) H(20:0)	N(26:0) H(22:0)	C ₄₈ H ₉₅ NO ₄	26.32	C ₅₄ H ₁₀₅ NO ₉	36.93	C ₅₃ H ₁₀₇ N ₂ PO ₇	43.85
N(28:0) H(19:1)	N(27:0) H(20:0)	N(26:0) H(21:0)	C ₄₇ H ₉₃ NO ₄	26.48	C ₅₃ H ₁₀₃ NO ₉	36.93	C ₅₂ H ₁₀₅ N ₂ PO ₇	43.93

Table 3 (continued)

Identified ceramide subclasses				Ceramides		Glucosylceramides		Sphingomyelins	
				Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)	Molecular formula	RT (min)
N(27:0) H(18:1)	N(28:0) H(17:0)	N(25:0) H(20:0)	C ₄₅ H ₈₉ NO ₄	26.55	C ₅₁ H ₉₉ NO ₉	36.93	C ₅₀ H ₁₀₁ N ₂ PO ₇	43.19	
N(28:0) H(18:1)	N(27:0) H(19:0)	N(26:0) H(20:0)	C ₄₆ H ₉₁ NO ₄	26.7	C ₅₂ H ₁₀₁ NO ₉	36.93	C ₅₁ H ₁₀₃ N ₂ PO ₇	43.06	
N(28:0) H(16:1)	N(26:0) H(18:0)	N(24:0) H(20:0)	C ₄₄ H ₈₇ NO ₄	26.93	C ₅₀ H ₈₇ NO ₉	36.93	C ₄₉ H ₈₉ N ₂ PO ₇	43.24	
N(26:0) H(16:1)	N(25:0) H(17:0)	N(24:0) H(18:0)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₄	27.09	C ₄₈ H ₉₃ NO ₉	36.93	C ₄₇ H ₈₅ N ₂ PO ₇	43.49	
N(24:0) H(16:1)	N(22:0) H(18:0)	N(20:0) H(20:0)	C ₄₀ H ₇₉ NO ₄	27.1	C ₄₆ H ₈₉ NO ₉	36.93	C ₄₅ H ₈₇ N ₂ PO ₇	43.72	
N(26:0) T(16:0)	N(24:0) T(18:0)	N(22:0) T(20:0)	C ₄₂ H ₈₅ NO ₅	27.33	C ₄₈ H ₉₅ NO ₁₀	36.93	C ₄₇ H ₈₇ N ₂ PO ₈	43.06	
N(18:0) H(16:1)	N(16:0) H(18:0)		C ₃₄ H ₆₇ NO ₄	28.16	C ₄₀ H ₇₇ NO ₉	37.14	C ₃₉ H ₇₉ N ₂ PO ₇	44.62	
N(17:0) H(16:1)	N(16:0) H(17:0)		C ₃₃ H ₆₅ NO ₄	28.31	C ₃₉ H ₇₅ NO ₉	37.22	C ₃₈ H ₇₇ N ₂ PO ₇	44.62	
A(36:1) H(18:1)	A(34:1) H(20:0)	A(32:1) H(22:0)	C ₅₄ H ₁₀₃ NO ₅	29.08	C ₆₀ H ₁₁₅ NO ₁₀	37.14	Not found		
N(36:2) T(18:0)	N(34:2) T(20:0)	N(32:2) T(22:0)							
A(27:0) H(20:1)	A(26:0) H(21:0)	A(25:0) H(22:0)	C ₄₇ H ₉₃ NO ₅	29.15	C ₅₃ H ₁₀₃ NO ₁₀	37.14	C ₅₂ H ₁₀₅ N ₂ PO ₈	43.43	
N(27:1) T(20:0)	N(26:1) T(21:0)	N(25:1) T(22:0)							
A(28:0) H(18:1)	A(26:0) H(20:0)	A(24:0) H(22:0)	C ₄₆ H ₉₁ NO ₅	29.64	C ₅₂ H ₁₀₁ NO ₁₀	37.14	C ₅₁ H ₁₀₃ N ₂ PO ₈	41.67	
N(28:1) T(18:0)	N(26:1) T(20:0)	N(24:1) T(22:0)							
A(27:0) H(18:1)	A(26:0) H(19:0)	A(25:0) H(20:0)	C ₄₅ H ₈₉ NO ₅	29.78	C ₅₁ H ₈₉ NO ₁₀	37.22	C ₅₀ H ₁₀₁ N ₂ PO ₈	43.56	
N(27:1) T(18:0)	N(26:1) T(19:0)	N(25:1) T(20:0)							
A(28:0) H(16:1)	A(26:0) H(18:0)	A(24:0) H(20:0)	C ₄₄ H ₈₇ NO ₅	29.84	C ₅₀ H ₈₇ NO ₁₀	37.29	C ₄₉ H ₈₉ N ₂ PO ₈	41.82	
N(28:1) T(16:0)	N(26:1) T(18:0)	N(24:1) T(20:0)							
A(26:0) H(17:1)	A(25:0) H(18:0)	A(24:0) H(19:0)	C ₄₃ H ₈₅ NO ₅	29.98	C ₄₉ H ₉₅ NO ₁₀	37.36	C ₄₈ H ₉₇ N ₂ PO ₈	41.82	
N(26:1) T(17:0)	N(25:1) T(18:0)	N(24:1) T(19:0)							
A(26:0) H(16:1)	A(24:0) H(18:0)	A(22:0) H(20:0)	C ₄₂ H ₈₃ NO ₅	30.04	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₀	37.36	C ₄₇ H ₈₅ N ₂ PO ₈	41.82	
N(26:1) T(16:0)	N(24:1) T(18:0)	N(22:1) T(20:0)							
A(30:0) H(18:1)	A(28:0) H(20:0)	A(26:0) H(22:0)	C ₄₈ H ₉₅ NO ₅	30.05	C ₅₄ H ₁₀₅ NO ₁₀	37.14	C ₅₃ H ₁₀₇ N ₂ PO ₈	44.2	
N(30:1) T(18:0)	N(28:1) T(20:0)	N(26:1) T(22:0)							
A(25:0) H(16:1)	A(24:0) H(17:0)	A(23:0) H(18:0)	C ₄₁ H ₈₁ NO ₅	30.33	C ₄₇ H ₉₁ NO ₁₀	37.44	C ₄₆ H ₉₃ N ₂ PO ₈	44.13	
N(25:1) T(16:0)	N(24:1) T(17:0)	N(23:1) T(18:0)							
A(24:0) H(16:1)	A(23:0) H(17:0)	A(22:0) H(18:0)	C ₄₀ H ₇₉ NO ₅	30.53	C ₄₆ H ₈₉ NO ₁₀	37.51	C ₄₅ H ₉₁ N ₂ PO ₈	42.55	
N(24:1) T(16:0)	N(23:1) T(17:0)	N(22:1) T(18:0)							

Table 4 Total carbon numbers of identified ceramide subclasses obtained for the RHE culture at D22. Sphingoid base moiety in columns and fatty acid moiety in lines. The newly identified subclasses of ceramide obtained for the RHE culture at D22 are colored on yellow

	S	dS	P	H	T	1-O-E_S	1-O-E_P	1-O-E_H	1-O-E_T
N	C ₄₁ -C ₄₈	C ₄₁ -C ₄₉	C ₃₄ -C ₅₆	C ₃₃ -C ₄₈	C ₄₄ -C ₅₄		-	C ₆₁ -C ₆₆	C ₅₇ -C ₆₀
A	C ₃₄ -C ₅₆	C ₃₄ -C ₅₆	C ₄₂ , C ₅₀ , C ₅₂	C ₄₄ -C ₅₄	-	C ₆₄ -C ₇₂	C ₅₈ -C ₆₀	C ₅₈ -C ₆₄	-
O	C ₅₂ -C ₅₆	-	-	C ₅₀ -C ₅₇	C ₅₀ -C ₅₆	-	-	-	-
EO	C ₆₄ -C ₇₂	-	-	C ₆₄ -C ₇₀	-	C ₈₀ -C ₈₉	-	C ₉₁ -C ₉₅	C ₈₃ -C ₉₀

(1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linolenic acid (EO).

Following the nomenclature developed by Motta et al. [40] and expanded by Robson et al. [41], Masukawa et al. [42], and Rabionet [21], we suggest the following name to this subclass 1-O-E (EO) Cer.

In this new identified subclass 1-O-E (EO) Cer, three sphingoid bases were characterized: sphingosine (S), 6-hydroxysphingosine (H), or the dihydroxy-dihydro sphingosine (T). As for the fatty acid part, it is derived from the esterification of the ω -hydroxyl group of the ULC fatty acid moiety with the linoleic acid (C18:2) (EO).

In Fig. 4, we represent the characteristic fragments of 3 molecules from 3 different subclasses as explained below:

Table 5 The identified protein-bound ceramide species obtained for the RHE culture at D22. Columns 1 and 2 represent respectively the retention time and the chemical formula of the identified subclasses. The difference between the exact mass and the observed mass is shown in column 3

RT (min)	Chemical formula	Δ PPM (+/-)	Identified class
19.96	C ₅₂ H ₉₉ NO ₄	2.66	OS (C52:2)
	C ₅₃ H ₁₀₁ NO ₄	2.32	OS (C53:2)
	C ₅₄ H ₁₀₃ NO ₄	2.6	OS (C54:2)
	C ₅₅ H ₁₀₅ NO ₄	3.01	OS (C55:2)
	C ₅₆ H ₁₀₇ NO ₄	3.26	OS (C56:2)
21.73	C ₅₀ H ₉₅ NO ₅	1.97	OH (C50:2)
	C ₅₁ H ₉₇ NO ₅	2.43	OH (C51:2)
	C ₅₂ H ₉₉ NO ₅	2.88	OH (C52:2)
	C ₅₃ H ₁₀₁ NO ₅	3.01	OH (C53:2)
	C ₅₄ H ₁₀₃ NO ₅	1.93	OH (C54:2)
	C ₅₅ H ₁₀₅ NO ₅	2.82	OH (C55:2)
	C ₅₆ H ₁₀₇ NO ₅	2.63	OH (C56:2)
	C ₅₇ H ₁₀₉ NO ₅	2.23	OH (C57:2)
	22.48	C ₅₀ H ₉₅ NO ₆	1.68
C ₅₂ H ₉₉ NO ₆		1.91	OT (C52:3)
C ₅₄ H ₁₀₃ NO ₆		2.04	OT (C54:3)
C ₅₅ H ₁₀₅ NO ₆		1.6	OT (C55:3)
C ₅₆ H ₁₀₇ NO ₆		2.39	OT (C56:3)

Double esterified ceramide 1-O-E (EO)-T, (C₈₆H₁₆₅NO₈) (1-O-E (18:0) EO (18:2/32:0) T (te18:0))

In the full scan spectrum, the most intense peak was [M+H-2H₂O]⁺ corresponding to m/z 1305.24. The ion [M+H]⁺ at m/z 1341.26 was less intense.

In the MS² fragmentation of the parent ion m/z 1305.24 [M+H-2H₂O]⁺, we observed a m/z 1020.97 indicating the loss of third water molecule and the acyl chain (18:0) at the 1-O-position of sphingoid [M-2H₂O-C₁₈H₃₆O₂]⁺.

Then, in MS³ of m/z 1020.97, we observed the m/z 756.72 related to the cleavage of the linoleic acid (18:2) esterified on

Table 6 The newly identified subclasses of ceramide obtained for the RHE culture at D22. Columns 1 and 2 represent respectively the retention time and the chemical formula of the identified subclasses. The difference between the exact mass and the observed mass is shown in column 3

RT (min)	Chemical formula	Δ PPM (+/-)	Identified class	
18.45–20	C ₈₀ H ₁₄₉ NO ₆	2.365	1-O-E(EOS)	
	C ₈₀ H ₁₅₁ NO ₆	2.884		
	C ₈₁ H ₁₅₃ NO ₆	3.943		
	C ₈₁ H ₁₅₁ NO ₆	1.884		
	C ₈₂ H ₁₅₅ NO ₆	4.578		
	C ₈₂ H ₁₅₃ NO ₆	1.863		
	C ₈₄ H ₁₅₇ NO ₆	2.53		
	C ₈₉ H ₁₆₇ NO ₆	3.68		
	C ₉₁ H ₁₇₃ NO ₇	0.766		1-O-E(EO)H
	C ₉₂ H ₁₇₅ NO ₇	3.15		
C ₉₃ H ₁₇₇ NO ₇	2.78			
	C ₉₄ H ₁₇₉ NO ₇	4.9	1-O-E(EO)T	
	C ₉₄ H ₁₇₇ NO ₇	3.09		
	C ₉₅ H ₁₇₉ NO ₇	4.04		
	C ₈₃ H ₁₅₉ NO ₈	5.332		
	C ₈₄ H ₁₆₁ NO ₈	5.321		
	C ₈₅ H ₁₆₃ NO ₈	4.88		
	C ₈₆ H ₁₆₅ NO ₈	3.26		
	C ₈₇ H ₁₆₇ NO ₈	7.05		
	C ₈₈ H ₁₆₉ NO ₈	4.76		
	C ₉₀ H ₁₇₃ NO ₈	4.9		

the ω -hydroxyl group of ceramide ultra-long chain fatty acid of ceramide $[M-2H_2O-C_{18}H_{37}O_2-C_{18}H_{32}O]^+$ and the m/z 738.71 due to one water molecule loss.

Finally, we observed the peak of the fatty acid moiety at m/z 494.49 $[CHO-C_{30}H_{60}CO-NH_3]^+$ and the sphingoid base moiety without its hydroxyl groups at m/z 262.28 $[C_{11}H_{23}-CH=CH-CH=C=CH-C(CH_2)-NH_3]^+$ (Fig. 4a).

Double esterified ceramide 1-O-E (EO)-S, ($C_{84}H_{157}NO_6$), 1-O-E (16:1) EO(18:2/30:0) S (d20:1)

In the full scan spectrum, the most intense peak was $[M+H]^+$ at m/z 1277.21.

In the MS^2 fragmentation of the parent ion m/z 1277.21 $[M+H]^+$, we observed a m/z 1004.97 indicating the loss of one water molecule and the acyl chain (16:1) at the 1-O-position of sphingoid $[M-H_2O-C_{16}H_{30}O_2]^+$.

Then, in MS^3 of m/z 1004.97, we observed the m/z 740.73 corresponding to the cleavage of the linoleic acid (18:2) esterified on the ω -hydroxyl group of ceramide ultra-long chain fatty acid of ceramide $[M-H_2O-C_{16}H_{30}O_2-C_{18}H_{32}O]^+$.

Finally, we observed the peak of the fatty acid moiety $[CHO-C_{28}H_{56}CO-NH_3]^+$ and the sphingoid base moiety after one water molecule loss $[C_{15}H_{31}-CH=C=CH-C(CH_2)-NH_3]^+$ at m/z 466.46 and 292.30 respectively (Fig. 4b).

Double esterified ceramide 1-O-E (EO)-H, ($C_{92}H_{175}NO_7$), 1-O-E (24:0) EO (18:2/32:0) H (t18:1)

In the full scan spectrum, the most intense peak was $[M+H-H_2O]^+$ matching m/z 1389.33. The ion $[M+H]^+$ at m/z 1407.34 was less intense.

In the MS^2 fragmentation of the parent ion m/z 1389.33 $[M+H-H_2O]^+$, we observed a m/z 1020.97 indicating the loss

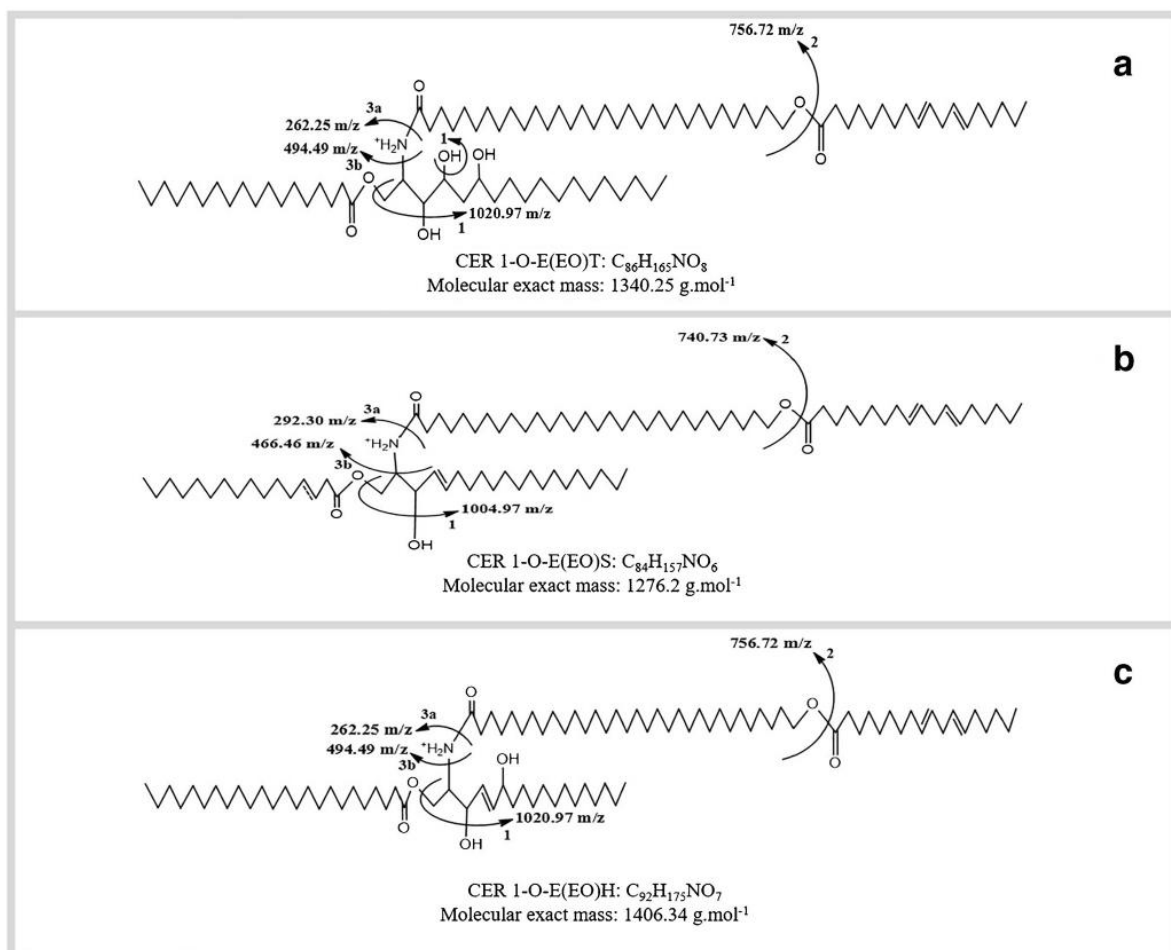


Fig. 4 The fragmentation observed in full scan and MS^2 spectra of the new ceramide subclass 1-O-E(EO) Cer: **a** 1-O-E(EO)T, **b** 1-O-E(EO)S, **c** 1-O-E(EO)H

of one water molecule and the acyl chain (24:0) at the 1-O-position of sphingoid $[M-H_2O-C_{24}H_{48}O_2]^+$.

Then, in MS³ of m/z 1020.97, we observed the m/z 756.72 corresponding to the cleavage of the linoleic acid (18:2) esterified on the ω -hydroxyl group of ceramide ultra-long chain fatty acid of ceramide $[M-H_2O-C_{24}H_{48}O_2-C_{18}H_{32}O]^+$ and the m/z 738.71 due to the loss of the second water molecule.

Finally, we observed the peak of the fatty acid moiety $[CHO-C_{30}H_{60}CO-NH_3]^+$ at m/z 494.49 and the sphingoid base moiety $[C_{11}H_{23}-CH=CH-CH=C=CH-C(CH_2)-NH_3]^+$ at m/z 262.28 after two water molecule losses (Fig. 4c).

Discussion

The aim of this study was to investigate at the molecular level the overall epidermis lipidome, especially the biomarkers of keratinocyte differentiation: ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins. Indeed, studying lipid biosynthesis as well as the lipids from the *stratum corneum* helps us to explain the impaired barrier function induced by metabolic pathways disruption.

To this end, a new analytical approach in NPLC/HR-MSⁿ was developed herein to permit the simultaneous characterization of epidermis lipids.

The complexity of lipids mixture represents a real analytical challenge. Epidermis lipids consist of 9 lipid classes (TG, DG, MG, Chol, FFA, Cer, GlcCer, SM, and PL) and 18 subclasses of ceramides, with a large polarity range. In addition, within each class or subclass, the structures are very diversified.

Thus, our analytical protocol allowed us to separate correctly all epidermis lipid classes according to the polar head, while preserving the structural integrity of molecules, by starting from the less polar molecules the triglycerides until the more polar the sphingomyelins in one single run. In fact, the ceramide class is divided into different subclasses in form of several peaks between 18.3 and 30 min, which differ by the structural microheterogeneity, due to the number of hydroxylation, the number of instauration, the chain length of amide-linked fatty acid, and the isomeric. However, for glucosylceramides and sphingomyelins, all the lipids of each class are eluted in a single chromatographic peak at 36.9 min and 43.1 min respectively, because the polarities of the glucosyl and phosphocholine groups are greater than the polarity differences induced by their under-class structural microheterogeneity.

Additionally, the use of high-resolution mass spectrometry to determine the exact mass of molecules and the optimization of the fragmentation parameters enabled us to identify and to determine the microstructure within the ceramide subclasses in the reconstructed human epidermis (RHE). Full scan and MS² spectra were explained and illustrated for the three

biomarkers of interest: ceramides, glucosylceramides, and sphingomyelins. Thus, we were able to determine the subclass and the number of water losses corresponding to the numbers of the hydroxyl groups of the polar head and to obtain precise information on the lengths of the alkyl chains as well as the number of unsaturation of the acid part and the sphingoid part.

In the literature, several methods were developed to analyze ceramides in detail in order to study only the *stratum corneum*, the upper layer of epidermis, but they do not take into consideration the totality of epidermis layers [7, 8, 43, 44]. Other studies reported the analysis of lipid mixtures using the separation by class in normal-phase liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. Nevertheless, the elution gradient was not adapted to epidermis lipids especially to discriminate ceramide subclasses following the increasing polarity and to separate sphingomyelins from phospholipids [15, 30, 32]. In addition, the epidermal lipids are subjected of wide isomeric phenomenon, i.e., different molecules can have the same molecular formula but belong to two lipid subclasses coming from two different metabolic pathways. Thus, the characterization of the fine structure of biomarkers is crucial to be able to follow and to study the metabolic pathways. In summary, using a unique analysis, we have gathered the advantages of two types of methods: those able to analyze a wide range of compounds and those offering a precise characterization by molecular species [29, 43, 45, 46]. This lipidomic approach will permit the comparison of epidermis lipid profiles between several samples in order to identify the eventual markers of a physio-pathologic status.

The identified compounds within the RHE represent the overall classes of skin CERs: long, very long, and ultra-long chain CERs (NS, NdS, NP, NH, NT, AS, AdS, AP, AH); esterified ultra-long chain CERs, which are esterified either with linoleic acid (EOH, EOS) or with cornified envelope proteins and are required for the water permeability barrier (OS, OH, OT) and 1-O-acylceramides (EAH, ENT, EAP). Thus, we would be able to characterize overall ceramide subclasses in the epidermis according to the literature, including the ceramide subclasses which are present at low proportions in the *stratum corneum*, such as the NT and OT. This requires a significant sensitivity of the analytical method to detect these molecules and to demonstrate the advantage of our analysis protocol.

In the present study, a new ceramide subclass was characterized in the RHE sample. We suggest the following nomenclature for it: 1-O-E (EO) Cer. These ceramides are double esterified: on the 1-O-position of sphingoid base with a long to a very long chain acylresidues (1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linolenic acid (EO). To our knowledge, so far, it has been shown that during epidermis ceramide biosynthesis, the 1-O-acylceramides (1-O-AcylCers) subclass is generated by the 1-O-Acyl esterification of an alkyl chain to the primary hydroxyl in position 1 of the sphingoid base (1-O-E). Only two 1-O-acylceramides

(1-O-AcylCers) subclasses have been identified in the literature: 1-O-ENS and 1-O-EAS ceramides. In these cases, the sphingoid base is the sphingosine (S), and on the fatty acid part, the acyl chain is a non-hydroxy (N) or α -hydroxy (A) [21]. In the new identified subclass 1-O-E (EO) Cer, three sphingoid bases were characterized: sphingosine (S), 6-hydroxysphingosine (H), or the dihydroxy-dihydro sphingosine (T), and fatty acid part is derived from the esterification of the ω -hydroxyl group of the ULC fatty acid moiety with the linoleic acid (C18:2) (EO) (Table 6). The identification of this new class leads to suggest a novel biosynthetic pathway in which 1-O-Acyl esterification could be done on ω -hydroxy-ultra long chain-ceramide before the step of glycosylation on the Golgi apparatus. Indeed, regarding the chemical structure and the hydrophobicity of this class, its role in the barrier function seems to be very important to explore. Moreover, the mechanism already illustrated of ω -hydroxy-ultra long chain-ceramide ester bound to glutamate residues of the proteins (mostly involucrin) at the surface of a corneocyte [47] to establish the barrier function could be possible to transpose on the 1-O-E (EO) Cer. In addition, the chain length could have an impact on lipid organization if they are present at *stratum corneum* level and also participate in the barrier function.

At the level of biomarkers of keratinocyte differentiation, the same ceramide subclasses identified within RHE sample have been characterized in glucosylceramide and sphingomyelin classes. A previous study mentioned that GlcCER species are predominant in epidermis ceramides, being precursors for non-h-ceramides (N: NS, NH, NP), α -h-ceramides (A: AS, AH, AP), and all ω -esterified (EO: EOS, EOH, EOP) and protein-bound ceramide species (O: OS, OH) [21, 48]. SM are precursors for exclusively sphingosine-containing NS- and AS-ceramides [20, 21]. Hence, the lack of sphingomyelinase results in a milder compromised barrier as compared with barrier disruption in the case of β -glucocerebrosidase deficiency [21, 49]. Interestingly, in this work and for the first time, studying the totality of epidermis lipids allowed us to characterize several new sphingomyelin subclasses: NS, NdS, NP, NH, NT, AH, AdS, AS, AP, EOS, EOH (Table 3). Thus, we assume that the lack of sphingomyelinase could cause significant disruption to the barrier function. These observations show the possibility and the importance of following lipid biosynthesis simultaneously in each epidermis layer and highlight the relevance of our method at different levels: sample preparation, chromatographic separation, detection, and molecular characterization.

Finally, the analytical method described herein is adapted to the analysis of epidermis lipids in particular. We have established an approach which is well adapted for the complexity of these lipids and can be widely exploited in lipidomic studies with a direct access to the biomarkers of

interest within the cosmetic and dermato-pharmaceutical investigations.

Acknowledgments We thank the Ile de France region for funding the purchase of mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro and Mr. Bastien Prost for his technical assistance.

Funding information This work received financial support from the SILAB - Jean PAUFIQUE Corporate Foundation.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Breiden B, Gallala H, Doering T, Sandhoff K. Optimization of submerged keratinocyte cultures for the synthesis of barrier ceramides. *Eur J Cell Biol.* 2007;86(11–12):657–73.
- Franzke CW, Cobzaru C, Triantafyllopoulou A, Loffek S, Horiuchi K, Threadgill DW, et al. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *J Exp Med.* 2012;209(6):1105–19.
- van Drongelen V, Alloul-Ramdhani M, Danso MO, Mieremet A, Mulder A, van Smeden J, et al. Knock-down of filaggrin does not affect lipid organization and composition in stratum corneum of reconstructed human skin equivalents. *Exp Dermatol.* 2013;22(12):807–12.
- Vyumvuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Effects of atmospheric relative humidity on stratum corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis. *Analyst.* 2013;138(14):4103–11.
- Sahle FF, Gebre-Mariam T, Dobner B, Wohlrab J, Neubert RH. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin Pharmacol Physiol.* 2015;28(1):42–55.
- Mlitz V, Latreille J, Gardinier S, Jdid R, Drouault Y, Hufnagl P, et al. Impact of filaggrin mutations on Raman spectra and biophysical properties of the stratum corneum in mild to moderate atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26(8):983–90.
- van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Curr Probl Dermatol.* 2016;49:8–26.
- van Smeden J, Hoppel L, van der Heijden R, Hankemeier T, Vreeken RJ, Bouwstra JA. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res.* 2011;52(6):1211–21.
- Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie.* 2009;91(6):784–90.
- Arct J, Majewski S, Lelen-Kamińska K, Stepulak M, Malejczyk M. Biological activity of ceramides and other sphingolipids. *Postep Derm Alergol.* 2012;29(3/2012):169–75.
- Holleran WM, Takagi Y, Uchida Y. Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett.* 2006;580(23):5456–66.
- Brooks G, Idson B. Skin lipids. *Int J Cosmet Sci.* 1991;13(2):103–13.
- Farwanah H, Wohlrab J, Neubert RH, Raith K. Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2005;383(4):632–7.

14. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):295–313.
15. Graeve M, Janssen D. Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: application to exceptional marine lipids. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(20–21):1815–9.
16. Gerits LR, Pareyt B, Delcour JA. Single run HPLC separation coupled to evaporative light scattering detection unravels wheat flour endogenous lipid redistribution during bread dough making. *LWT Food Sci Technol*. 2013;53(2):426–33.
17. Homan R, Anderson MK. Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;708(1):21–6.
18. Cajka T, Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem*. 2014;61:192–206.
19. Holleran WM, Takagi Y, Menon GK, Legler G, Feingold KR, Elias PM. Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1656–64.
20. Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, et al. Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res*. 2000;41(12):2071–82.
21. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):422–34.
22. Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):2080–95.
23. t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, et al. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2012;84(1):403–11.
24. Schmitt T, Neubert RHH. State of the art in stratum corneum research: the biophysical properties of ceramides. *Chem Phys Lipids*. 2018;216:91–103.
25. Guillard E, Tfayli A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part II: effect of chains lengths and head group structures. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399(3):1201–13.
26. Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, Epstein S, Dalpke A, Rothermel U, et al. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet*. 2012;21(3):586–608.
27. Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(2):107–29.
28. Marekov LN, Steinert PM. Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17763–70.
29. Rabionet M, Bayerle A, Marsching C, Jennemann R, Grone HJ, Yildiz Y, et al. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res*. 2013;54(12):3312–21.
30. Imbert L, Gaudin M, Libong D, Touboul D, Abreu S, Loiseau PM, et al. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*. *J Chromatogr A*. 2012;1242:75–83.
31. Hvattum E, Uran S, Sandbaek AG, Karlsson AA, Skotland T. Quantification of phosphatidylserine, phosphatidic acid and free fatty acids in an ultrasound contrast agent by normal-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;42(4):506–12.
32. Abreu S, Solgadi A, Chaminade P. Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *J Chromatogr A*. 2017;1514:54–71.
33. Ramos RG, Libong D, Rakotomanga M, Gaudin K, Loiseau PM, Chaminade P. Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of *Leishmania* membrane phospholipids. *J Chromatogr A*. 2008;1209(1–2):88–94.
34. Zheng L, T'Kindt R, Decuypere S, von Freyend SJ, Coombs GH, Watson DG. Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24(14):2074–82.
35. Christie WW. Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. *J Lipid Res*. 1985;26(4):507–12.
36. Postle AD, Wilton DC, Hunt AN, Attard GS. Probing phospholipid dynamics by electrospray ionisation mass spectrometry. *Prog Lipid Res*. 2007;46(3–4):200–24.
37. Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, Le BN. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J Biol Chem*. 1951;191(2):833–41.
38. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497–509.
39. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911–7.
40. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1182(2):147–51.
41. Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT. 6-Hydroxy-4-sphinganine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res*. 1994;35(11):2060–8.
42. Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1466–76.
43. Boiten W, Helder R, van Smeden J, Bouwstra J. Selectivity in cornified envelop binding of ceramides in human skin and the role of LXR inactivation on ceramide binding. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(9):1206–13.
44. van Smeden J, Boiten WA, Hankemeier T, Rissmann R, Bouwstra JA, Vreeken RJ. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(1):70–9.
45. Cha HJ, He C, Zhao H, Dong Y, An IS, An S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (review). *Int J Mol Med*. 2016;38(1):16–22.
46. Vávrová K, Kováčik A, Opálka L. Ceramides in the skin barrier. *Eur Pharm J*. 2017;64(2):28–35.
47. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):328–40.
48. Hamanaka S, Suzuki A, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Uchida Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol*. 2002;119(2):416–23.
49. Schmuth M, Man M-Q, Weber F, Gao W, Feingold KR, Fritsch P, et al. Permeability barrier disorder in Niemann–Pick disease: sphingomyelin–ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*. 2000;115(3):459–66.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article 3

Comparison of SC lipid profiles *In vitro*, *Ex vivo* and *In vivo*: characterization of the α -Hydroxy double esterified ceramide sub-class.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Danielle Libong, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli.

Soumis dans «ABC »

Contexte : Les céramides estérifiés sont des céramides hautement hydrophobes qui contiennent une très longue chaîne hydrocarbonée. Ces céramides ont montré leur rôle clé dans la fonction de la barrière cutanée. Suite à la découverte de la nouvelle sous-classe de céramides (céramides doublement estérifiés) (1-O-E-(EO) Cer) dans le modèle cellulaire RHE *in vitro* et compte tenu de son degré de hydrophobicité élevé, nous supposons qu'elle peut également jouer un rôle important dans la fonction barrière cutanée. Le but principal de ce travail est de vérifier, préalablement à toute autre étude, si cette nouvelle sous-classe se trouve également dans le SC humain.

Méthode : Les lipides ont été extraits sur 3 modèles cellulaires : le RHE comme un modèle *in vitro*, le SC humain isolé durant une plastie chirurgicale (*in vivo*) ainsi que les lipides extraits directement sur les fronts de volontaires (*ex vivo*). Les lipides issus de ces modèles sont analysés et caractérisés selon la méthodologie développée précédemment durant cette thèse. En général, les céramides estérifiés y compris la nouvelle sous-classe (1-O-E-(EO) Cer) se trouvent dans le RHE et le SC à des quantités moins importantes par rapport aux céramides classiques. Afin d'identifier la totalité des ions m/z qui correspondent à cette nouvelle sous-classe de céramide, nous avons choisi dans cette étude d'utiliser la méthode MS^2/MS^3 ciblée.

Résultats : Nos résultats confirment la présence de cette nouvelle sous-classe de céramides dans le SC humain. Les ions m/z correspondant à la nouvelle sous-classe de céramides présents dans le RHE, ont été observés en totalité dans les extraits lipidiques du SC humain (*ex vivo*) et partiellement dans le SC humain (*in vivo*). L'analyse MS^2/MS^3 ciblée nous a permis de détecter une autre nouvelle sous-classe de céramides : il s'agit également d'une sous-classe de céramides doublement estérifiés mais dans lesquels l'acide gras lié à la base sphingoïde en position 1-O via une liaison ester est hydroxylé en position α définissant ainsi la sous-classe (A-1-O-E (EO) Cer).

Conclusion : Nos résultats démontrent la capacité du modèle RHE *in vitro* à reproduire un profil lipidique comparable à celui obtenu à partir du SC humain, ce qui confirme l'utilité de ces modèles comme des modèles alternatifs aux tests sur animaux. De plus, la découverte d'une autre sous-classe de céramides confirme la puissance de notre méthode analytique à étudier et caractériser les structures fines des espèces lipidiques.

1- Title page

Full title: *Stratum Corneum lipid profiles In vitro, Ex vivo and In vivo: characterization of the α -Hydroxy double esterified ceramides.*

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Danielle Libong, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli.

Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

Authors:

- 7- Joudi Bakar : joudi.bakar@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 8- Rime Michael-Jubeli : **This author accept correspondance and proofs**, rime.michael-jubeli@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France. . Orcid ID : 0000-0002-2944-5295.
- 9- Danielle Libong : danielle.libong@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 10- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@u-psud.fr, Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 11- Ali Tfayli : ali.tfayli@u-psud.fr Université Paris-Saclay, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, 92296, Châtenay-Malabry, France.

***Corresponding author** : Rime Michael-Jubeli, 5 rue Jean-Baptiste Clément - 92296 Châtenay-Malabry – France, +33146835904, fax: +33146835458, rime.michael-jubeli@u-psud.fr

2- Abbreviations

APPI: Atmospheric Pressure PhotoIonization

Cer: Ceramide

FFAs: Free Fatty Acids

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR-MSⁿ: High Resolution Mass Spectrometry

NP-LC: Normal Phase -Liquid Chromatography

RHE: Reconstructed Human Epidermis

RT: Retention Time

SC: *Stratum Corneum*

3- Abstract

The presence of a new ceramide subclass, the 1-O-Acyl Omega-linoleoyloxy ceramides [1-O-E (EO) Cer], has been previously highlighted in Reconstructed Human Epidermis (RHE). This ceramide is double esterified on the 1-O-position of sphingoid base with long to very long chain acyl residues (1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linolenic acid (EO). Considering its chemical structure and hydrophobicity, this subclass can contribute to the skin barrier. Thus, it is important to verify if this subclass is also present in native human *stratum corneum* (SC). In this work, ceramides structures of this novel subclass were compared between RHE (*in vitro*) and two sources of human SC (*in vivo* and *ex vivo*) using HPLC/HR-MSⁿ. Results confirm the presence of this double esterified ceramide subclass [1-O-E (EO) Cer] in human SC. The ceramide profile of this subclass obtained for the RHE was very similar to that obtained for both *in vivo* and *ex vivo* human SC. In addition, thanks to the targeted analysis MS²/MS³, a new ceramide subclass has been identified and characterized in the three studied samples, in which the fatty acid linked to 1-O-position sphingoid base via ester bond is hydroxylated on the α position of this fatty acid (A-1-O-E (EO) Cer). These results highlight the potential of the analytical method and the characterization approach employed in this study. In addition, our results demonstrate the ability of RHE models to reproduce a ceramide profile closely similar to that of human SC and confirm their quality as alternative models of animal testing.

Key words: A-1-O-E (EO) Cer, 1-O-E (EO) Cer, ceramides, Reconstructed Human Epidermis, Human *Stratum Corneum*, NP-LC/HR-MSⁿ

4- Introduction

The skin barrier function strongly relies on the outermost layer, the stratum corneum (SC), which consists of corneocytes embedded in a lipid matrix (1, 2). Ceramides (Cers), cholesterol, and free fatty acids (FFAs) are the main lipid classes in the SC (3). In human SC, FFA are predominantly saturated, but mono-unsaturated and trace amounts of poly-unsaturated are present as well (4-6). In addition, it has been detected the presence of α -Hydroxy Free Fatty Acids (α -OH FFAs) in the living layer and Stratum Corneum lipid of human Epidermis (4, 7). The (α -OH FFAs) in the *Stratum Corneum* have the greatest proportion of acids below C20 and particularly a high proportion for C16 and a little less for C18(4). The generated fatty acids will participate afterwards for the formation of ceramides class (8).

A Ceramide is composed of a Fatty Acid (FA) linked by amide bond to a sphingoid base (9). Human Cer class can be divided into different subclasses according to their fatty acid moiety (non-hydroxy [N], α -hydroxy [A], or ω -hydroxy [O]) and to their sphingoid structure (sphingosine [S], dihydrosphingosine [dS], phytosphingosine [P], 6-hydroxy-sphingosine [H], or the dihydroxy-dihydro sphingosine [T]) (8). Within these Cer subclasses, structural microheterogeneity is observed due to the carbon chain length, the number of unsaturation, number of hydroxyl groups and isomers (8, 10). In addition, the Cer can be esterified [E] predominantly with linoleic acid C (18:2) on the position of ω -hydroxyl group of the ultra-long chain (C28–C32) of fatty acid moiety [O] (9). Also the ω -hydroxyl group of Cer can be esterified to glutamate residues of the cornified envelope (CE) proteins (mostly involucrin) [PO](8). In 2013, Rabionet et al (8, 11) have identified the ceramide subclass (1-O-E), in which the Cer can be esterified [E] to the primary hydroxyl in position 1 of the sphingoid base (1-O-E) (8, 11). Recently, our group has identified in the Reconstructed Human Epidermis model (RHE) the ceramide subclass [1-O-E-(EO) Cer] (12). It is a double esterified ceramide, on the 1-O-position of sphingoid base with a long to very long chain acyl residues [1-O-E] and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linoleic acid [EO] (12). Since esterified ceramides have a very long and ultra-long chain of fatty acid, they are considered as highly hydrophobic molecules (13). Several studies demonstrate that ceramides and particularly those having a terminal ω -hydroxy group

and their esterified derivatives (acyl-ceramide) play a major role in the skin barrier function and are involved in the Corneocyte Lipid Envelope (CLE) formation (9, 14, 15). It is worth noting that the ω -O-acyl Cers and especially the Cer [EOS] which are esterified to the linoleic acid (16) are significantly reduced in impaired skin barrier (17) such as in the Atopic Dermatitis (AD) (18) and Psoriasis (19).

The aim of the study is to investigate if the [1-O-E-(EO)Cer] ceramide subclass is also present in the human SC and not only in the RHE model. In this order, the lipids of two sources of human SC (*in vivo* and *ex vivo*) have been analyzed in parallel to the RHE lipids using HPLC/HR-MSⁿ. Then ceramide structures have been identified and characterized using MS²/MS³ targeted analysis.

5- Materials and methods

Chemicals:

The HPLC grade solvents for lipid extraction and analysis of RHE (*in vitro*) and isolated SC (*in vivo*) and the internal standard (1-Eicosanol) were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Solvents for (*ex vivo*) lipid extracted SC: Ether diéthylique MERCK Seccosolv[®], Ethyl acetate $\geq 99.8\%$ HiPerSolv CHROMANORM[®] for HPLC, Methanol $\geq 99.9\%$ HiPerSolv CHROMANORM[®] for LC-MS were all of HPLC grade or trace analysis.

Collection of skin samples:

1- Isolated human SC (*in-vivo*).

Skin tissues were collected from plastic surgery of abdominal skin from 3 healthy donors (3 women aged between 31–54 years). All participants gave written informed consent prior to the beginning of experimentation. After excision, the skin was cleaned with purified water and the fatty tissue was removed with a scalpel. The skin was stored in aluminum foils at -30°C .

For SC isolation, frozen skin was thawed to room temperature on a filter paper and then washed at 37°C in distilled water for 120 seconds. To separate the full-thickness skin in dermis and epidermis we followed the protocol of Kligman et al (20). The sheets were immersed in 60°C warm purified water for 60 seconds. Subsequently, the total epidermis was peeled off using forceps and transferred into a petri dish. To separate the SC from the epidermis, the petri dish was covered with a plastic wrap and the epidermis allowed to incubate at 37°C in an oven in a solution of 0.1% trypsin (weight percent) in 0.05 M Tris Buffer (pH 7.9) for 30 min. After this step, the epidermis was removed in fresh purified water and the remaining SC sheets were placed in a clean tray and stocked at room temperature (21).

2- Extracted human SC (*ex vivo*)

The SC lipids were sampled from the forehead of a healthy skin volunteer on an area of 7cm x 3cm previously cleaned with diethyl ether.

The SC lipids were taken using 4 swabs soaked in a solvent solution (Ethyl acetate: Methanol [2: 8]). The first swab was passed 10 times from left to right in order to cover the entire sampling area surface. The other 3 swabs were passed in the other 3 directions (10 passes from right to left, 10 passes from top to bottom and 10 passes from bottom to top). Lipids were extracted from the thawed swab tissues by 3 successive extractions as described later.

3- Artificial skin (RHE) (*in vitro*):

Episkin® (Episkin, France), is a Reconstructed Human Epidermis (RHE) model obtained from the culture of normal human derived epidermal keratinocytes (NHEK) on polycarbonate filters in the interface air-liquid. The culture diameter is 0.5 cm² for each sample. In this study the RHE samples whose batch number is (16 RHE-040) were used at day 22 of keratinocytes maturation.

Lipid extraction procedure:

1- From isolated human SC (*in vivo*):

Total lipids of isolated SC were extracted by the modified method of Folch (22, 23) and Bligh and Dyer (24). Isolated SC was placed into a tube which contains 2 mL of methanol and 4 mL of chloroform. Then 25 µL of 1-Eicosanol (0.3 mg/mL) was added as an internal standard. The whole mixture was vortexed twice for 2 min. The recovery for the organic phase was achieved. The lipid extraction was repeated twice. The whole organic phase was collected and evaporated under a stream of nitrogen until dryness. The lipid residue was taken up with 100 µL of chloroform.

2- From human SC (*ex vivo*):

After adding 25 µL of 1-Eicosanol (0.3 mg/mL) as an internal standard to swab tissue, lipids were extracted by 3 successive extractions with 5mL of Folch solution. Between each extraction, the solution

was vortexed for 2 min then evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was then taken up in 100 μL of chloroform.

3- From RHE (*in-vitro*):

Total lipid of RHE samples were extracted following the protocol developed in our latest work(12). A 25 μL of 1-Eicosanol (0.3 mg/mL) was used as an internal standard.

Instrumentation and analytical method NP-LC/APPI-MSⁿ:

Samples were analyzed in HPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The separation of the lipids was carried out in normal phase liquid chromatography using a polyvinyl alcohol (PVA)-Sil column (PVA-bonded column; 5 μm particle size, 150 \times 4.6 mm) purchased from YMC (Kyoto, Japan). NP-LC was performed using an elution gradient of Heptane/ethyl acetate (99.8: 0.2 v/v) (Solvent A), acetone and ethyl acetate (2: 1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v) (Solvent B) and 2-propanol/ water (85:15, v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v) (solvent C). The mobile phases and the solvent program are described in our previously work (12). The flow rate was set at 1 mL.min⁻¹. The injected volume was 10 μL .

The outgoing LC flow rate was split post-column in two detectors: a Corona CAD[®] and an hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an Atmospheric Pressure Photoionization APPI. A positive mode APPI was used for the identification of ceramides. The APPI heater was set to 400°C and the heated capillary to 350°C. Sheath gas and auxiliary gas flow rates were set at 40 and 5 L/minute respectively. The mass scan range was 220-1800 atomic mass units (amu). A full scan detection mode and fragmentation were performed by the orbital trap at a resolution of 100 000. The MS²/MS³ spectra were obtained simultaneously in data dependent on the acquisition (DDA) mode. Fragmentation was performed in CID (Collision-induced dissociation) at 35 eV of collision energy in positive ionization mode in the double linear trap with high resolution. For MS², CID was performed on the 5 most abundant precursor ions with a signal threshold 10⁺³. For MS³, CID was

performed on the 3 most abundant ions with a signal threshold 10^{+3} . Dynamic exclusion parameters were: repeat count: 3 of each parent ion, repeat duration: 30 seconds, exclusion duration: 15 s and exclusion mass with 1.5 uma. Additional targeted product ion $[M+H]^+$ or water molecule loss $[M - n(H_2O) + H]^+$ CID MS² and MS³ experiments were selectively triggered to provide higher quality characterization of the novel ceramide subclasses [1-O-E-(EO)Cer] and [A-1-O-E (EO)Cer]. Analyses were performed using Thermo Fisher Xcalibur software. Data were searched at +/- 10 ppm between theoretical masses experimental values.

6- Results:

In NP-LC/HR-MSⁿ, the lipid elution depends on the polar moieties or “head group” of each lipid class. The analytical method used in this study, previously developed by our team, is able to separate the epidermis lipid classes in one single run. The total run time between injections and elution of all lipid classes was 51 min. Moreover, an ideal elution window of the ceramide subclasses in the area of medium polarity lipids was obtained, thus the method enables to separate ceramide subclasses which are present in the form of several peaks between 15 and 30 min (results not shown) (12).

Presence of the subclass 1-O-E (EO) Cer in the human *Stratum Corneum*.

The double esterified ceramide subclass 1-O-E (EO) Cer was detected in the RHE model as described in our latest work (12). These compounds are eluted at RT between 15.4 and 19.5 min. In this study, we detected the molecules of this subclass in the chromatograms of the RHE samples (*in vitro*) and in two types of SC: human isolated SC (*ex vivo*) and human extracted SC lipids (*in vivo*). All ceramides of the subclass 1-O-E (EO) Cer are characterized in the three samples using the fragmentation mechanism highlighted in our previous work (12) (table 1). Fig (3) illustrates the similarity of the ions (m/z) profiles obtained by the high-resolution mass spectrometry of the subclass 1-O-E (EO) Cer for the three studied samples.

For RT between 15.4 and 19.5 min, we identified the most intense ions correspond to the molecules of the subclass 1-O-E(EO) Cer, which represents 85 ceramides. These molecules present a total carbon number between C78-C99, saturated or unsaturated fatty acid moieties and they are divided into 3 molecular families according the sphingoid base 1-O-E(EO) S and 1-O-E(EO) dS within the RT area between 15.4 and 15.7 minutes and 1-O-E(EO) H within the RT area between 18.7 and 19.5 minutes (Table 1).

The m/z corresponding to the double esterified subclass (1-O-E (EO)) which were detected in the RHE model were also totally present in the human extracted SC (*ex vivo*) and partially in the isolated human SC

(in-vivo). Even if the used method can be used for quantitative comparison, only qualitative analyses were developed in the current work.

Novel ceramide subclass A-1-O-E (EO) Cer.

Interestingly, the most ions (m/z) detected for RT area 18.7-19.5 min and the RT area 16.6-17.4 min are similar, thus ions at two different Retention Times, present two molecules having the same chemical formula consequently the same mass with different polarity values figure (2). In addition, thanks to the targeted analysis MS^2/MS^3 we can notice that this ion at same m/z presents two fragmentation paths according to the RT area. Thus, in addition to the ceramide subclass 1-O-E (EO) Cer eluted in RT area 18.7-19.5 min, our analytical method allowed to detect a novel ceramide subclass eluted in RT area 16.6-17.4 min. This is also a double esterified ceramide: on the 1-O-position of sphingoid base with a long to very long chain acyl residues (1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linoleic acid (EO). The particularity of this subclass is that the acyl chain residue (1-O-E) is hydroxylated probably on the (α) position. We suggest naming these compounds as (A-1-O-E (EO) Cer).

The MS^2/MS^3 fragmentation of these novel ceramides subclasses is described below. In this order, the ceramide A-1-E-O(EO)S, $C_{84}H_{159}NO_7$, is taken as example.

In the full scan mass spectrum, the most intense ion peak was $[M+H-H_2O]^+$ at m/z 1277.21, it corresponds to the molecular mass with a loss of one water molecule and represents the chemical formula of $[C_{84}H_{158}NO_6]^+$. In fact, the molecular ion $[M+H]^+$ at m/z 1295.22 was less intense. In the MS^2 fragmentation of the parent ion at m/z 1277.21 $[M+H-H_2O]^+$, a major fragment ion at m/z 1004.97 $[C_{68}H_{126}NO_3]^+$ was detected, indicating the loss of the hydroxylated (probably in position α) acyl chain C16:0 at the 1-O-position of sphingoid ($C_{14}H_{29}-CH(OH)-C(OH)=O$). Then in the MS^2 fragmentation spectrum of the fragment ion at m/z 1004.97, we observed two major fragment ion peaks: the fragment ion at m/z 740.73 $[C_{50}H_{94}NO_2]^+$ indicating the loss of the linoleic acid C18:2 esterified on the ω -hydroxyl group of ceramide

ultra-long chain fatty acid ($C_{18}H_{32}O$) and the fragment ion at m/z 292.30 corresponding to the sphingoid base moiety [$C_{15}H_{31}-CH=C=CH-C(CH_2)-NH_3^+$] and indicating the loss of the ultra-long chain of fatty acid moiety ($CHO-C_{28}H_{54}-CHO$). We can conclude that the ceramide is A-1-E-O(EO)S, $C_{84}H_{159}NO_7$, it is composed of : 1-the sphingoid base moiety is an unsaturated chain of 20 carbon atoms with one hydroxyl group, 2- the fatty acid moiety corresponds to C30:0, 3-the acyl chain at the 1-O-position of the sphingoid base is a saturated chain of 16 carbon atoms with one hydroxyl group, 4- the linoleic acid $C_{18}:2$ esterified on the ω -hydroxyl of fatty acid chain as shown in figure (1).

Thus, within the RT area between 16.6 and 17.4 min, we identified the most intense ions peaks correspond to the most intense molecules of the novel subclass A-1-O-E (EO) Cer, which represents 21 ceramides. These molecules present a total carbon number between C78-C92, a saturated fatty acid moiety on the polar head, and they are divided into 2 molecules family according the sphingoid base A-1-O-E(EO) S and A-1-O-E(EO) dS (Table 2).

In addition, we detected the same ions *i.e* the same molecules of this novel subclass in the chromatograms of the RHE samples (*in vitro*) and in the two types of SC samples: human isolated SC (*ex vivo*) and human extracted SC (*in vivo*) (Table 2).

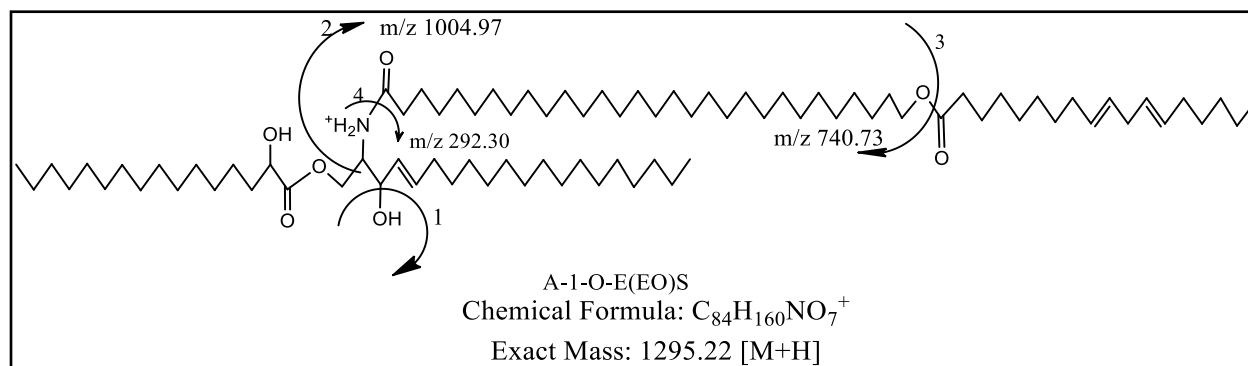


Figure 1: The characteristic fragments ions observed in full scan and MS^2/MS^3 spectra of the novel ceramide subclass A-1-O-E(EO) Cer in which the acyl chain residue (1-O-E) is hydroxylated probably on the (α) position (A). Ex: (A-1-O-E(EO)S)

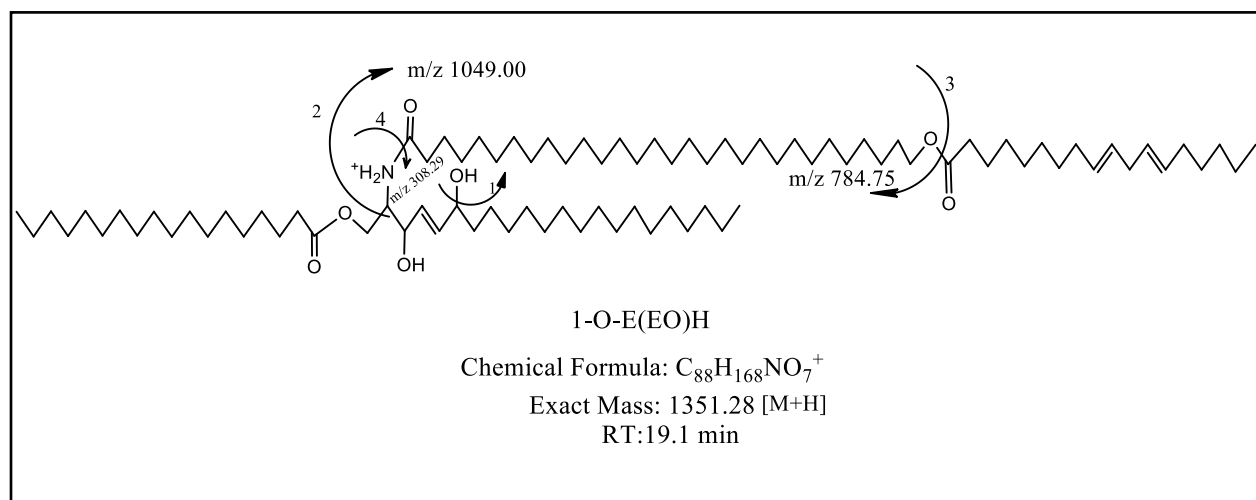
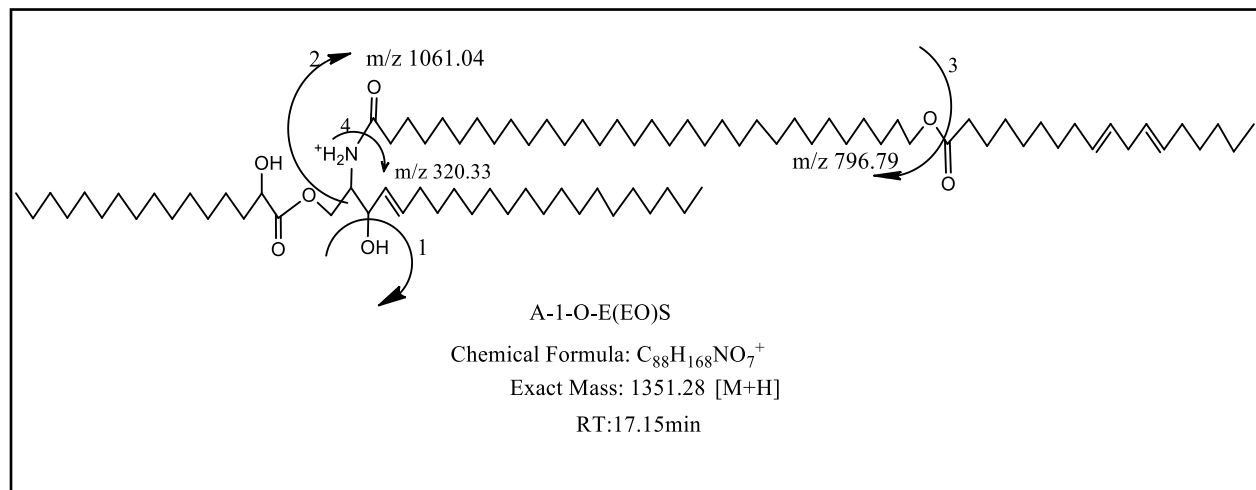


Figure 2: the characteristic fragments ions of two ceramides having the same chemical formula and eluted in two different RT a) A-1-O-E(EO)S at 17.15 min. b) 1-O-E(EO)H at 19.1 min.

Table 1: The identified ceramides 1-O-E(EO) Cer in the RHE (in vitro), isolated human SC (in vivo) and extracted human SC (ex vivo). Column (1) presents the list of the parent ions (m/z) detected in the RHE. Column (2) and (3) present the chemical formula of parent ion [M+H-H₂O]⁺ and the molecular formula respectively. Column (4) present the RT of each molecule. The identified ceramide subclass is showed in column (5). The presence of each ceramide was verified in the in vivo and ex vivo SC as shown in column (6 and 7) respectively. *: presence of unsaturation on the fatty acid chain.

RHE (in vitro)					Isolated human SC (in vivo)	Extracted human SC (ex vivo)
m/z	Chemical formula of [M+H-H ₂ O] ⁺	Molecular formula	RT (min)	Ceramide subclass		
1193.1	C78H146NO6	C78H147NO7	19.52	1-O-E(EO)H		
1207.1	C79H148NO6	C79H149NO7	19.38	1-O-E(EO)H		x
1221.1	C80H150NO6	C80H151NO7	19.38	1-O-E(EO)H		x
1233.1	C81H150NO6	C81H151NO7	19.52	1-O-E(EO)H*		x
1235.2	C81H152NO6	C81H153NO7	19.38	1-O-E(EO)H		x
1247.2	C82H152NO6	C82H153NO7	19.52	1-O-E(EO)H*		x
1249.2	C82H154NO6	C82H155NO7	19.45	1-O-E(EO)H	x	x
1261.2	C83H154NO6	C83H155NO7	19.38	1-O-E(EO)H*		x
1263.2	C83H156NO6	C83H157NO7	19:38	1-O-E(EO)H	x	x
1275.2	C84H156NO6	C84H157NO7	19.38	1-O-E(EO)H*	x	x
1277.2	C84H158NO6	C84H159NO7	19.31	1-O-E(EO)H	x	x
1289.2	C85H158NO6	C85H159NO7	19.38	1-O-E(EO)H*	x	x
1291.2	C85H160NO6	C85H161NO7	19.31	1-O-E(EO)H	x	x
1303.2	C86H160NO6	C86H161NO7	19.31	1-O-E(EO)H*	x	x
1305.2	C86H162NO6	C86H163NO7	19.23	1-O-E(EO)H	x	x
1317.2	C87H162NO6	C87H163NO7	19.31	1-O-E(EO)H*		x
1319.3	C87H164NO6	C87H165NO7	19.17	1-O-E(EO)H	x	x
1331.3	C88H164NO6	C88H165NO7	19.17	1-O-E(EO)H*		x
1333.3	C88H166NO6	C88H167NO7	19.1	1-O-E(EO)H	x	x
1345.3	C89H166NO6	C89H167NO7	19.17	1-O-E(EO)H*	x	x
1347.3	C89H168NO6	C89H169NO7	19.1	1-O-E(EO)H	x	x
1361.3	C90H170NO6	C90H171NO7	19.03	1-O-E(EO)H	x	x
1373.3	C91H170NO6	C91H171NO7	19.1	1-O-E(EO)H*	x	x
1375.3	C91H172NO6	C91H173NO7	19.03	1-O-E(EO)H	x	x
1387.3	C92H172NO6	C92H173NO7	19.03	1-O-E(EO)H*	x	x
1389.3	C92H174NO6	C92H175NO7	18.96	1-O-E(EO)H	x	x
1403.3	C93H176NO6	C93H177NO7	18.96	1-O-E(EO)H	x	x
1415.4	C94H176NO6	C94H177NO7	18.96	1-O-E(EO)H*	x	x
1417.4	C94H178NO6	C94H179NO7	18.9	1-O-E(EO)H	x	x
1429.4	C95H178NO6	C95H179NO7	18.96	1-O-E(EO)H*		x
1431.4	C95H180NO6	C95H181NO7	18.9	1-O-E(EO)H		x
18.9	C96H180NO6	C96H181NO7	18.9	1-O-E(EO)H*	x	x
1445.4	C96H182NO6	C96H183NO7	18.9	1-O-E(EO)H	x	x
1457.4	C97H182NO6	C97H183NO7	18.9	1-O-E(EO)H*		x
1459.4	C97H184NO6	C97H185NO7	18.76	1-O-E(EO)H	x	x
1471.4	C98H184NO6	C98H185NO7	18.9	1-O-E(EO)H*	x	x
1177.1	C78H146NO5	C78H147NO6	15.77	1-O-E(EO)S		x
1179.1	C78H148NO5	C78H149NO6	15.77	1-O-E(EO)dS		x
1191.1	C79H148NO5	C79H149NO6	15.85	1-O-E(EO)S		x
1193.2	C79H150NO5	C79H151NO6	15.77	1-O-E(EO)dS		x

1205.2	C80H150NO5	C80H151NO6	15.85	1-O-E(EO)S	x	x
1207.2	C80H152NO5	C80H153NO6	15.77	1-O-E(EO)dS		x
1217.1	C81H150NO5	C81H151NO6	15.85	1-O-E(EO)S*		x
1219.2	C81H152NO5	C81H153NO6	15.85	1-O-E(EO)S	x	x
1221.2	C81H154NO5	C81H155NO6	15.77	1-O-E(EO)dS		x
1231.2	C82H152NO5	C82H153NO6	15.77	1-O-E(EO)S*		x
1233.2	C82H154NO5	C82H155NO6	15.77	1-O-E(EO)S	x	x
1245.2	C83H154NO5	C83H155NO6	15.85	1-O-E(EO)S*		x
1247.2	C83H156NO5	C83H157NO6	15.77	1-O-E(EO)S	x	x
1249.2	C83H158NO5	C83H159NO6	15.63	1-O-E(EO)dS		x
1259.2	C84H156NO5	C84H157NO6	15.77	1-O-E(EO)S*	x	x
1261.2	C84H158NO5	C84H159NO6	15.77	1-O-E(EO)S	x	x
1263.2	C84H160NO5	C84H161NO6	15.63	1-O-E(EO)dS		x
1273.2	C85H158NO5	C85H159NO6	15.77	1-O-E(EO)S*		x
1275.2	C85H160NO5	C85H161NO6	15.7	1-O-E(EO)S	x	x
1277.2	C85H162NO5	C85H163NO6	15.63	1-O-E(EO)dS	x	x
1287.2	C86H160NO5	C86H161NO6	15.7	1-O-E(EO)S*	x	x
1289.2	C86H162NO5	C86H163NO6	15.63	1-O-E(EO)S	x	x
1291.3	C86H164NO5	C86H165NO6	15.63	1-O-E(EO)dS		x
1301.2	C87H162NO5	C87H163NO6	15.63	1-O-E(EO)S*	x	x
1303.3	C87H164NO5	C87H165NO6	15.63	1-O-E(EO)S	x	x
1305.3	C87H166NO5	C87H167NO6	15.56	1-O-E(EO)dS	x	x
1315.3	C88H164NO5	C88H165NO6	15.63	1-O-E(EO)S*	x	x
1317.3	C88H166NO5	C88H167NO6	15.63	1-O-E(EO)S	x	x
1329.3	C89H166NO5	C89H167NO6	15.63	1-O-E(EO)S*		x
1331.3	C89H168NO5	C89H169NO6	15.63	1-O-E(EO)S	x	x
1333.3	C89H170NO5	C89H171NO6	15.56	1-O-E(EO)dS	x	x
1343.3	C90H168NO5	C90H169NO6	15.63	1-O-E(EO)S*	x	x
1345.3	C90H170NO5	C90H171NO6	15.56	1-O-E(EO)S	x	x
1357.3	C91H170NO5	C91H171NO6	15.63	1-O-E(EO)S*		x
1359.3	C91H172NO5	C91H173NO6	15.56	1-O-E(EO)S	x	x
1371.3	C92H172NO5	C92H173NO6	15.56	1-O-E(EO)S*	x	x
1373.3	C92H174NO5	C92H175NO6	15.56	1-O-E(EO)S	x	x
1385.3	C93H174NO5	C93H175NO6	15.56	1-O-E(EO)S*		x
1387.4	C93H176NO5	C93H177NO6	15.49	1-O-E(EO)S	x	x
1399.4	C94H176NO5	C94H177NO6	15.56	1-O-E(EO)S*	x	x
1401.4	C94H178NO5	C94H179NO6	15.49	1-O-E(EO)S	x	x
1413.4	C95H178NO5	C95H179NO6	15.43	1-O-E(EO)S*		x
1415.4	C95H180NO5	C95H181NO6	15.43	1-O-E(EO)S	x	x
1427.4	C96H180NO5	C96H181NO6	15.49	1-O-E(EO)S*	x	x
1429.4	C96H182NO5	C96H183NO6	15.43	1-O-E(EO)S	x	x
1441.4	C97H182NO5	C97H183NO6	15.49	1-O-E(EO)S*	x	x
1443.4	C97H184NO5	C97H185NO6	15.43	1-O-E(EO)S	x	x
1457.4	C98H186NO5	C98H187NO6	15.43	1-O-E(EO)S	x	x
1469.4	C99H186NO5	C99H187NO6	15.43	1-O-E(EO)S*		x

Table 2: The identified ceramides A-1-O-E(EO) Cer in the RHE (in vitro), isolated human SC (in vivo) and extracted human SC (ex vivo). Column (1) presents the list of the parent ions (m/z) detected in the RHE. Column (2) and (3) present the chemical formula of the parent ion [M+H-H₂O]⁺ and the molecular formula respectively. Column (4) present the RT of each molecule. The identified ceramide subclass is showed in column (5). The presence of each ceramide was verified in the in vivo and ex vivo SC as shown in column (6 and 7) respectively.

RHE (in vitro)					Isolated human SC (in vivo)	Extracted human SC (ex vivo)
m/z	Chemical formula of [M+H-H ₂ O] ⁺	Molecular formula	RT (min)	Ceramide subclass		
1195.13	C78H148NO6	C78H149NO7	17.43	A-1-O-E(EO) dS		x
1209.14	C79H150NO6	C79H151NO7	17.43	A-1-O-E(EO) dS		x
1221.14	C80H150NO6	C80H151NO7	17.43	A-1-O-E(EO) S		x
1223.16	C80H152NO6	C80H153NO7	17.23	A-1-O-E(EO) dS		x
1235.16	C81H152NO6	C81H153NO7	17.43	A-1-O-E(EO) S		x
1237.17	C81H154NO6	C81H155NO7	17.29	A-1-O-E(EO) dS		x
1249.17	C82H154NO6	C82H155NO7	17.36	A-1-O-E(EO) S		x
1251.19	C82H156NO6	C82H157NO7	17.29	A-1-O-E(EO) dS		x
1263.19	C83H156NO6	C83H157NO7	17.36	A-1-O-E(EO) S	x	x
1265.2	C83H158NO6	C83H159NO7	17.29	A-1-O-E(EO) dS		x
1277.2	C84H158NO6	C84H159NO7	17.29	A-1-O-E(EO) S	x	x
1279.22	C85H160NO6	C85H161NO7	17.23	A-1-O-E(EO) dS		x
1291.22	C85H160NO6	C85H161NO7	17.23	A-1-O-E(EO) S	x	x
1293.23	C85H162NO6	C85H163NO7	17.23	A-1-O-E(EO) dS		x
1305.24	C86H162NO6	C86H163NO7	17.23	A-1-O-E(EO) S	x	x
1307.24	C86H164NO6	C86H165NO7	17.23	A-1-O-E(EO) dS		x
1319.25	C87H164NO6	C87H165NO7	17.23	A-1-O-E(EO) S		x
1333.3	C88H166NO6	C88H167NO7	17.15	A-1-O-E(EO) S	x	x
1347.28	C89H168NO6	C89H169NO7	17.08	A-1-O-E(EO) S		x
1361.3	C90H170NO6	C90H171NO7	17.08	A-1-O-E(EO) S	x	x
1389.32	C92H174NO6	C92H175NO7	16.66	A-1-O-E(EO) S		x

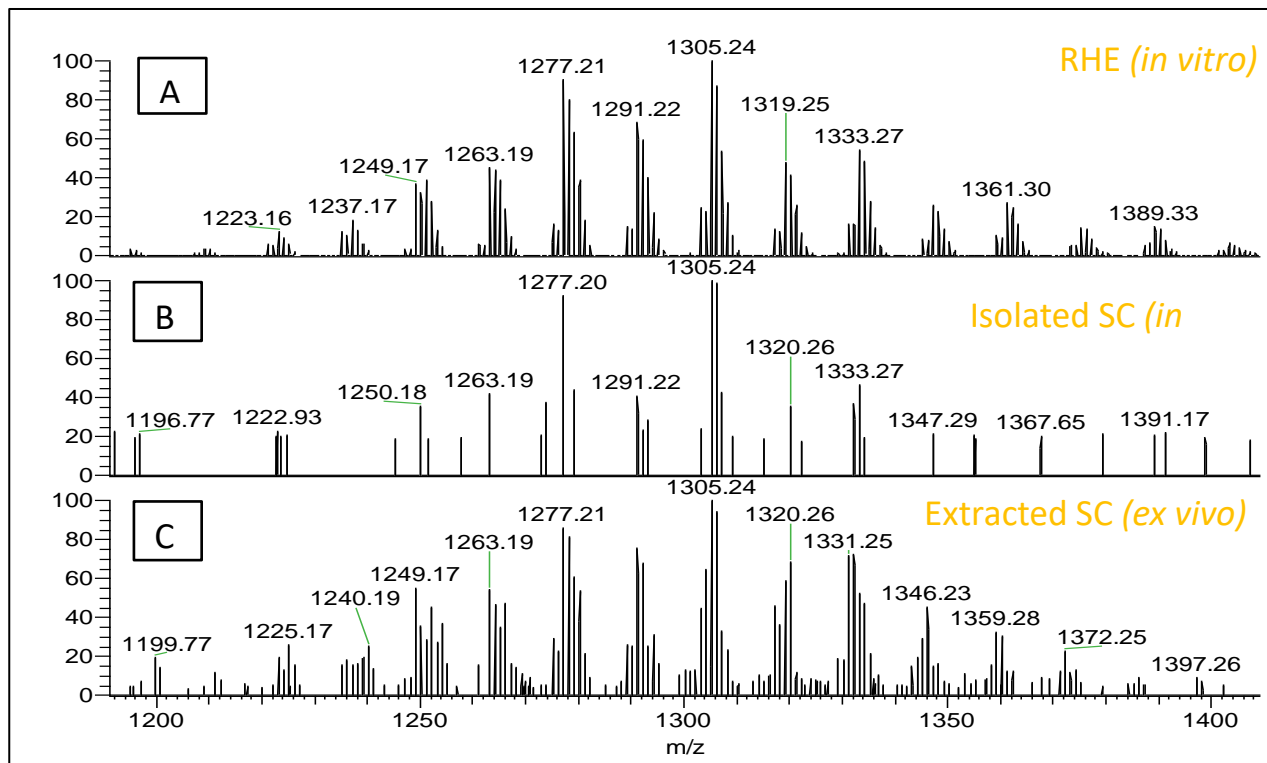


Figure 3: Comparison of the parent ions $[M+H-H_2O]^+$ correspond to the ceramide subclasses 1-O-E (EO) Cer within the RT between 18.7 and 19.5 min obtained for: A) RHE culture (in vitro) at Day 22 of keratinocytes maturation, B) isolated human SC (in vivo), C) extracted human SC (ex vivo).

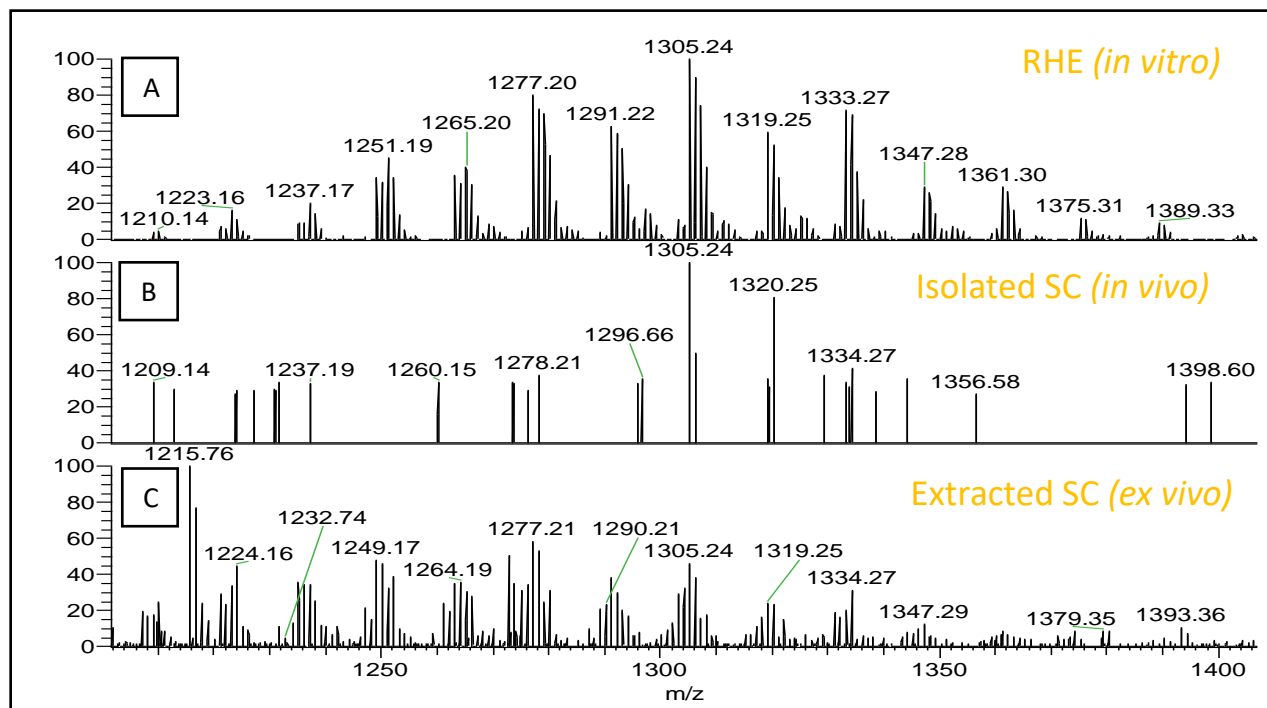


Figure 4: Comparison of the parent ions $[M+H-H_2O]^+$ correspond to the novel ceramide subclasses A-I-O-E (EO) Cer within the RT between 16.6 and 17.4 min obtained for: A) RHE culture (in vitro) at Day 22 of keratinocytes maturation, B) isolated human SC (in vivo), C) extracted human SC (ex vivo).

Discussion

Since 2013, the use of animal testing for cosmetics in the European Union is no longer possible (25). Different models of *in vitro* Human Skin Equivalent (HSEs) and Reconstructed Human Epidermis model (RHE) are developed to replace the animal test (26). In our latest publication (12) we characterized a novel ceramide subclass in the RHE (Episkin®) samples. This newly discovered subclass 1-O-E(EO) Cer is a double esterified ceramides : on the 1-O-position of sphingoid base with a long to very long chain acyl residue (1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linoleic acid (EO). Regarding the chemical structure and the hydrophobicity of this subclass, its role in the skin barrier function seems to be very important to explore. It was therefore important to explore if this subclass is also present in human SC. For this purpose, we studied lipids from two sources of human SC samples: 1- SC of the volunteer's epidermis (*ex vivo*) extracted using swabs, 2- SC of human skin biopsy that has been removed during surgery (*in vivo*). SC lipid obtained from the three kind of samples were analyzed using NP-LC/HR-MSⁿ. The ceramides were characterized and compared between the studied samples. Results confirmed the presence of this double esterified ceramide subclass 1-O-E (EO) Cer in both *ex vivo* and *in vivo* extracted SC lipids. From the overall observation, three families of the 1-O-E(EO) Cer molecules according to the sphingoid moiety were identified: 1-O-E(EO)S, 1-O-E(EO)dS and 1-O-E(EO)H.

Stratum Corneum ceramides represent a highly complex mixture, in which, the number of molecules is very high and the structural micro-heterogeneity present a huge diversity. In addition, ceramide subclasses present important differences in terms of relative intensities. For example the Non-hydroxy Cers subclasses such as [NP],[NH],[NdS],and [NS] present the highest relative (%) abundance compared to other CER subclasses, inversely to molecules which present at a low intensity such as mono esterified ceramides and particularly the ceramides EOdS which form just 0.4% of total ceramide subclasses (6). In full scan mass spectrometry, ceramide m/z (corresponding to the ion $[M+H-H_2O]^+$) has a variable intensity according to the type of ceramides subclass. The non-targeted MS² analysis seems to be very useful for characterizing the m/z ions corresponding to the ceramide subclasses which show a very high intensities. However, for

the double esterified ceramides 1-O-E (EO) Cer, present at a low content in the SC samples, the use of the targeted analysis MS²/MS³ seems to be very efficient in order to characterize the fine structure of this subclass. The analytical method developed in our latest work (12) and particularly the use of targeted analysis MS²/MS³ allowed us to detect another ceramide subclass in which the fatty acid linked to 1-O-position sphingoid base via ester bond is hydroxylated probably on the α position of this fatty acid (A-1-O-E (EO) Cer) as shown in table (2) and fig (2). As known, the hydroxylation of FFAs in the keratinocytes was referred on two positions according to the alkyl chain length: on the α position when alkyl chain is composed particularly of C16 and less of C18 and C24(4), and on the ω position for ultra-long alkyl chain above C26 (8). From these bibliographic data, we could suppose that the fatty acid on the 1-O-position sphingoid base of this novel subclass is hydroxylated at α position.

In fact, two families of the A-1-O-E(EO) Cer molecules according to their sphingoid moiety were identified: A-1-O-E(EO)S, A-1-O-E(EO)dS. This novel ceramide subclass was detected and confirmed in the three skin samples (RHE, *in vivo* and *ex vivo* SC) . However, the highly hydroxylated ceramides are involved in some skin disturbances such as atopic dermatitis (6, 18). Thus, our results may be of significant interest in dermatology, allowing the complexity of these diseases to be increasingly revealed in order to improve their medical and cosmetic management.

One can conclude the powerful and the ability of our analytical method to detect all skin lipids even in small amounts in the skin such as the 1-O-E (EO) Cer and A-1-O-E (EO) Cer.

Interestingly, the same 5 ceramide observed families 1-O-E(EO)S, 1-O-E(EO)dS, 1-O-E(EO)H, A-1-O-E(EO)S, and A-1-O-E(EO)dS were detected in the studied samples, which could highlight the similarity in ceramide biosynthesis paths in the three samples *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. Molecules are completely similar in terms of exact molecular mass, chemical formula, and finally their fine structure notably the lengths of the alkyl chains, the number of the unsaturated bonds and also the number of the hydroxyl groups. Thus, the biosynthesis steps as the alkyl chain elongation, the dehydrogenation and the hydroxylation are closely comparable between the studied samples, RHE and Human SC.

However, in full scan mass spectrometry, the m/z (corresponding to the ion $[M+H-H_2O]^+$) of the double esterified ceramides (1-O-E (EO) Cer) and (A-1-O-E (EO) Cer) detected in RHE models was found in extracted and isolated human SC as shown in tables 1 and 2. The use of extracted SC (*ex vivo*) is more satisfied compared to isolated one. This observation seems to be very important for dermatological and cosmetic researchers, because the sample preparation from the extracted SC is much easier to carry out compared to the isolated SC, which requires surgical intervention and SC layer separation that may affect the lipid structural integrity.

The RHE ceramide entities are very comparable to those obtained from human SC. These results confirm the ability of the RHE model to reproduce the same lipid molecular species as the human SC. Thus, this model is able to mimic the lipid environment of human epidermis and could be used as an alternative epidermis model.

7- Conclusion

Ceramides are a complex lipid mixture that plays a critical role in skin barrier. Although esterified ceramides are less abundance compared to other ceramide subclasses, they have an essential role to maintaining the skin barrier integrity. Our aim was to investigate the presence of double esterified ceramides 1-O-E (EO) Cer -previously discovered in RHE model- in the human SC. Our analytical method and characterization approach allowed us to identify a novel subclass of ceramides A-1-O-E (EO) Cer. In this study, we confirm the presence of the two ceramide subclasses 1-O-E (EO) Cer and. A-1-O-E (EO) Cer in RHE model as well in the human SC. The high similarity of the ceramide composition between RHE and human SC confirms the relevance of using RHE as an alternative model to animal testing.

Acknowledgements

Financial support: The authors would like to thank the SILAB - Jean PAUFIQUE Corporate Foundation of the financial support for this work.

Compliance with ethical standards Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121(2):231-41.
2. Jiang SJ, Chen JY, Lu ZF, Yao J, Che DF, Zhou XJ. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science.* 2006;44(1):29-36.
3. Bouwstra JA, Dubbelaar FER, Gooris GS, Ponc M. The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm-Venereol.* 2000:23-30.
4. Ansari MN, Nicolaides N, Fu HC. Fatty acid composition of the living layer and stratum corneum lipids of human sole skin epidermis. *Lipids.* 1970;5(10):838-45.
5. Norlen L, Nicander I, Lundsjo A, Cronholm T, Forslind B. A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Archives of dermatological research.* 1998;290(9):508-16.
6. van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current problems in dermatology.* 2016;49:8-26.
7. van Smeden J, Boiten WA, Hankemeier T, Rissmann R, Bouwstra JA, Vreeken RJ. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(1):70-9.
8. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Bba-Mol Cell Biol L.* 2014;1841(3):422-34.
9. Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie.* 2009;91(6):784-90.
10. Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res.* 2008;49(7):1466-76.
11. Rabionet M, Bayerle A, Marsching C, Jennemann R, Grone HJ, Yildiz Y, et al. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res.* 2013;54(12):3312-21.
12. Assi A, Bakar J, Libong D, Sarkees E, Solgadi A, Baillet-Guffroy A, et al. Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MS(n): 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2019.
13. Berdyshev E, Goleva E, Bronova I, Dyjack N, Rios C, Jung J, et al. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI insight.* 2018;3(4).
14. Behne M, Uchida Y, Seki T, de Montellano PO, Elias PM, Holleran WM. Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol.* 2000;114(1):185-92.
15. Lee JY, Liu KH, Cho Y, Kim KP. Enhanced Triacylglycerol Content and Gene Expression for Triacylglycerol Metabolism, Acyl-Ceramide Synthesis, and Corneocyte Lipid Formation in the Epidermis of Borage Oil Fed Guinea Pigs. *Nutrients.* 2019;11(11).

16. van Smeden J, Hoppel L, van der Heijden R, Hankemeier T, Vreeken RJ, Bouwstra JA. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res.* 2011;52(6):1211-21.
17. Danso M, Boiten W, van Drongelen V, Gmelig Meijling K, Gooris G, El Ghalbzouri A, et al. Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition. *J Dermatol Sci.* 2017;88(1):57-66.
18. Ishikawa J, Narita H, Kondo N, Hotta M, Takagi Y, Masukawa Y, et al. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol.* 2010;130(10):2511-4.
19. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1182(2):147-51.
20. Kligman AM, Christophers E. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Archives of dermatology.* 1963;88:702-5.
21. Quatela A, Tfayli A, Baillet-Guffroy A. Examination of the effect of Stratum Corneum isolation process on the integrity of the barrier function: a confocal Raman spectroscopy study. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin.* 2016;22(1):75-80.
22. Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, Le BN. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *The Journal of biological chemistry.* 1951;191(2):833-41.
23. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry.* 1957;226(1):497-509.
24. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology.* 1959;37(8):911-7.
25. Pedrosa TDN, Catarino CM, Pennacchi PC, Assis SR, Gimenes F, Consolaro MEL, et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2017;42:31-7.
26. Brohem CA, Cardeal LB, Tiago M, Soengas MS, Barros SB, Maria-Engler SS. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment cell & melanoma research.* 2011;24(1):35-50.

Assessment of Skin Barrier Function in Reconstructed Human Epidermis using a Multimodal

Approach at molecular, tissular and functional level.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli *, Rindala El Khoury, Sabrina Hamla, Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli.

Accepté dans « Analyst »

Contexte : Différents modèles d'Epiderme Reconstituit Humain (RHE) ont été développés afin de reproduire les fonctions cutanées *in vitro*. Plusieurs études ont été réalisées sur ces modèles et surtout aux derniers stades de la maturation afin d'évaluer la fonction de barrière cutanée. La fonction barrière cutanée, est le résultat d'un processus biologique complexe qui englobe différents aspects: aspect fonctionnel, aspect structurel et morphologie. Dans cet ordre, et pour mieux comprendre le développement de la barrière RHE, cette étude se concentre sur la caractérisation et l'évaluation du processus de maturation de la fonction barrière RHE non seulement au stade de différenciation terminale mais à plusieurs jours de maturation, et en combinant trois méthodes analytiques complémentaires.

Méthode : Dans cette étude, au cours du processus de la différenciation des kératinocytes (de jour 12 et jusqu'à jour 24), ont été suivies :

- 1- la cinétique de la pénétration de la caféine qui fournit une évaluation fonctionnelle de barrière cutanée.
- 2- l'évolution de l'épaisseur de l'épiderme, la formation de la couche cornée et l'organisation des lipides par la microspectroscopie Raman.
- 3- l'évolution des biomarqueurs lipidiques (céramides, glucosylcéramides et sphingomyélines) ainsi l'évolution des sous-classes de céramides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution.

Résultats : Nos résultats ont montré que la pénétration de la caféine diminue logiquement au cours du processus de la différenciation. Les images Raman réalisées en profondeur ont montré une évolution nette du *Stratum Corneum* avec une meilleure organisation lipidique aux derniers jours de maturation. Concernant la composition lipidique, le taux de céramides a augmenté tout au long de la différenciation avec une relation inverse entre les niveaux de céramides et ceux de leurs précurseurs (glucosylcéramides et sphingomyélines). Un comportement différent entre plusieurs sous-classes de céramides est mis en évidence et s'appuie sur l'étape de la différenciation correspondante. Un décalage de période entre la formation des lipides et leur organisation a été constaté. Nos données analytiques ont permis d'identifier 3

niveaux d'évolution sous forme de 3 groupes de jours de maturation: avant le jour 15, entre les jours 15 et 19, et après le jour 19.

Conclusion : Ce travail prouve la grande capacité de cette approche multimodale à offrir des informations complémentaires cruciales pour relier la fonction barrière à la structure moléculaire du SC. Ainsi, la fonction barrière du *Stratum Corneum* n'est pas seulement déterminée par sa génération et son épaisseur mais plutôt par la composition et l'organisation structurale de ses lipides intercellulaires et l'homogénéité de sa formation. Cette approche permet aux chercheurs de déterminer la période de maturation qui correspond le mieux à leur objectif d'analyse.

Assessment of the Skin Barrier Function in the Reconstructed Human Epidermis using a Multimodal Approach at molecular, tissular and functional levels.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli *, Rindala El Khoury, Sabrina Hamla, Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli.
Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

Author(s):

- 1- Joudi Bakar : joudi.bakar@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 2- Rime Michael-Jubeli : **This author accept correspondance and proofs**, rime.michael-jubeli@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
Orcid ID : 0000-0002-2944-5295.
- 3- Rindala El Khoury : contact.rindala@gmail.com, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 4- Sabrina Hamla : hamla.sab@gmail.com, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 5- Ali Assi: ali.assi@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, , 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 6- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 7- Ali Tfayli : ali.tfayli@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, , 92296, Châtenay-Malabry, France.

***Corresponding author:** Rime Michael-Jubeli, 5 rue Jean-Baptiste Clément - 92290 Châtenay-Malabry – France, +33146835904, fax: +33146835458, rime.michael-jubeli@u-psud.fr

Abbreviations:

1-O-E(EO)Cer : double esterified ceramide: on the 1-O-position of sphingoid base with long to very long chain acyl residues (1-O-E) and on the position of ω -hydroxyl group of fatty acid with the linoleic acid (EO).

Ads: α -hydroxy DihydroSphingosine

AH: α -hydroxy 6-Hydroxysphingosine

AP: α -hydroxy Phytosphingosine

AS: α -hydroxy Sphingosine

APPI: Atmospheric Pressure PhotoIonization

CER: Ceramide

CLS: Classical Least Squares

D: Differentiation Day

EAH: Esterified α -hydroxy 6-Hydroxysphingosine

EAP: Esterified α -hydroxy Phytosphingosine

ENH: Esterified Non-hydroxy 6-Hydroxysphingosine

ENT: Esterified/Non-hydroxy/T: dihydroxy-dihydro sphingosine

EOH: Esterified ω -hydroxy 6-Hydroxysphingosine

EOS: Esterified ω -hydroxy Sphingosine

GlcCER: GlucosylCeramide

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HR-MSⁿ : High-Resolution Mass Spectrometry

NDS: Non-hydroxy DihydroSphingosine

NP: Non-hydroxy Phytosphingosine

NPLC: Normal-Phase Liquid Chromatography

NS: Non-hydroxy Sphingosine

NT: Non-hydroxy/T: dihydroxy-dihydro sphingosine

RSD: Relative Standard Deviation

RT: Retention Time

SC: *Stratum Corneum*

SG: *Stratum Granulosum*

SM: Sphingomyelin

UV: Ultraviolet

VLC: Very Long Chain

ULC: Ultra Long Chain

Abstract

Reconstructed human epidermis models are used as epidermis alternatives in skin researches. It is necessary to provide molecular and functional characterization in order to assess these models. Our aim is to make a link between the barrier function and the structure and the composition of the *Stratum Corneum* using several complementary techniques. Three studies were used on Reconstructed Human Epidermis during the keratinocyte differentiation process: i- caffeine percutaneous penetration kinetic. ii- epidermis thickness measurement, *Stratum Corneum* formation and lipids organization by Raman microspectroscopy. iii- lipid composition evolution by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. Results demonstrated that the caffeine penetration decreased along the differentiation process. Raman in depth images demonstrated an increase in *Stratum Corneum* and RHE thickness accompanied with an evolution of lipid organization. Lipid analysis showed an increase of ceramide amount and an inverse relationship between ceramide and their precursor's levels during the differentiation process. A different behavior between several ceramides subclasses is highlighted and related to corresponding differentiation stage. The generation of the most important ceramides for the barrier function is closely followed. A period shift between lipids generation and their organization was found. Our analytical data allowed identifying 3 groups of maturation days: before day 15, between day 15 and 19, and after day 19. The chemical and physiological states of the barrier function for each group are described thanks to the multimodal approach.

Keywords: Reconstructed Human Epidermis, barrier function, keratinocyte differentiation, multimodal approach, Raman microspectroscopy, NPLC/HR-MSⁿ.

Introduction

Reconstructed human skin epidermis (RHE), is the first tissue generated *in vitro* that mimics its native counterpart to a high degree ². It is a three-dimensional model of normal human-derived epidermal keratinocytes that consists of a viable epidermis, including organized basal, spinous and granular layers as well as an underlying multilayered stratum corneum (SC). It is essentially used in the cosmetic *in vitro* testing such as the evaluation of the irritation or the penetration of an active ingredient. The *in vitro* reconstructed skin models pre-require a barrier function of the SC layer similar to that of the native skin. For this purpose, various techniques were used to characterize the RHE models and to assess the barrier permeability: A/ Morphological studies of tissue structure using light and electron microscopies ³ B/ Lipid organization studies using the X-ray diffraction and freeze fracture electron microscopic techniques ³⁻⁵. C/ RHE lipid profile analysis using separation methods such as thin-layer liquid and gas chromatography ^{3, 6, 7}. D/ Percutaneous penetration studies with typically caffeine as a reference molecule ⁸ using high Performance Liquid Chromatography (HPLC)^{9, 10}, IR absorption or Raman scattering^{11, 12}. In the studies cited above, only one technique at a time is used to evaluate the skin barrier function. Thus, the results obtained provide information concerning a single aspect of the skin barrier, while the barrier function is the result of a complex biological process that encompasses functional, structural and morphological aspects. In this order, and to better assess the RHE barrier development and maturation, the present study is focused on combining three complementary analytical methods:

- HPLC-UV study: Allows for the assessing of the establishment of the skin barrier function by following the caffeine percutaneous penetration kinetics.

- Raman microspectroscopy study: Allows for the assessing of the SC evolution, lipid conformation and epidermis thickness. This technique allows a non-invasive diagnostic and a powerful characterization of lipid conformation and organization. It allows a free staining observation of epidermal cells as well as a tissue or cell culture, in contrast to the light and electron microscopies in which the tissue should be stained before analysis ¹³.

- High Performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry HPLC/HR-MSⁿ: allows assessing the evolution of the lipid biomarkers (the glucosylceramides (GlcCER), the sphingomyelins (SM), the ceramides and the ceramides' subclasses).

It is the combination of the three approaches that allowed us to determine, for the first time in the literature, the RHE differentiation period where the skin barrier becomes functional.

Materials and methods

The chemicals

Solvents for extraction and for normal phase liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (NPLC/HR-MSⁿ) were of HPLC grade, caffeine and the internal standard (1-Eicosanol) and were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

The skin samples

Reconstructed Human Epidermis models (RHE) “Episkin® (Episkin, France)”, is a three dimensional model of normal human-derived epidermal keratinocytes. It consists of organized basal, spinous and granular layers, and a multilayered *stratum corneum* (SC). The differentiation process takes around two weeks, which allows for the development of stratified layers¹⁴. A triplicate of 10 (RHE) samples whose batch number is (16 RHE-040), was received from D12 of keratinocyte maturation. On delivery, samples were immersed in a maintenance medium and incubated for 10 days, in order to reach the D24 of the differentiation process. A duplicate set of RHE was used for a caffeine penetration study and then for lipid analysis studies via LC/HR-MSⁿ. The third set was then used for Raman microspectroscopy analysis.

The kinetic of caffeine percutaneous penetration

200µL of caffeine solution (2.1 mg/mL in PBS) were deposited at the surface of each RHE sample after different maturation days of keratinocytes (D12, D13, D14, D15, D17, D18, D19, D20, D22 and D24). Following the caffeine application, 300 µL of liquid were taken from the receptor fluid on the other side of each sample after 2, 3, 4, 6, and 8 hours. At each interval, the 300 µL of liquid volume collected from each RHE sample was replaced by 300 µL of maintenance medium.

The measurements of the caffeine concentration that passed through the RHE samples were recorded using a high-performance liquid chromatography, with an external calibration and a 7 concentration range (from 0.202µg/mL to 404 µg/mL). The separation was carried out on a C18 Kromasil column measuring 150 mm x 4.6 mm, Ø 5µm, at 35

°C. The Kontron Instruments 465 C4 INJ 003 Auto Sampler Injector was used to inject a volume of 20µL. The solvents were continuously degassed by the Kontron Instruments 422 C4 PMV 004 pump. The mobile phase was composed of water / methanol / acetic acid (75: 25: 1 v / v), with a flow rate of 1mL/min. The HPLC system was coupled with the Kontron Instruments 335 C4 DUV 003 UV spectrophotometric detector. The detection was recorded at a wavelength of 273 nm. The chromatographic data was exploited by the Kroma 2000 system. The analysis time for each injection was 10 minutes (since the retention time of the caffeine peak is 6 minutes).

To estimate the caffeine concentration, a calibration range of reference solutions was prepared daily and analyzed before testing the samples. Calibration curves were then calculated, relating the area under curve of caffeine peak to that of the known concentration, [area under curve = f (concentration)]. All calibration ranges (obtained from reference solutions) gave a regression coefficient $R^2 > 0.999$. The inter-range variability was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD) of the slopes. RSD was found to be lower than 5%.

The extraction of lipids

A duplicate of RHE samples of each maturation day (D12, D13, D14, D15, D17, D18, D19, D20, D22 and D24) was used in this study. The total lipid of the RHE samples were extracted by the modified method of Bligh and Dyer¹⁵. The epidermis was then separated from the nitrocellulose support using pliers and placed into 1.5mL of MeOH and vortexed for 2 min. Then, 3mL of chloroform containing Eicosanol as an internal standard (0.3 mg/mL on chloroform) was added. The mixture was finally incubated for 1 hour at room temperature in the dark. The separation phase was induced by the addition of 1.5mL of water using a magnetic agitator for 10 minutes at room temperature. For better separation of the two phases, a centrifugation step at 3000 rpm for 10 minutes at 20° C was done. The chloroform phase was collected and the aqueous phase, which contains (H₂O + methanol + skin), was washed with 2 mL of chloroform. Then the whole mixture was vortexed and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and at 20 ° C. This step was repeated twice. The organic phases were collected and evaporated under a stream of nitrogen until reaching dryness. The lipid residue was taken up with 100 µL of chloroform¹.

The Raman spectrometer instrumentation: The thickness of the Reconstructed Human Epidermis and the evolution of the lipid biomarkers

Raman spectral acquisition and spectral imaging were performed with the use of a LabRam HR evolution (Horiba scientific, Palaiseau, France). A 632.8 nm He-Ne laser with 10 mW power and a long focal distance microscope

objective MPLFLN 100X (0.90 NA, Olympus) were used. The Confocal pinhole was set to 200 μm . The collected light was filtered through an edge filter and dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution, using a grating of 300 grooves/mm over a wavenumber range of 400-3800 cm^{-1} . Spectral acquisition pre-processing and processing were performed using Labspec 6.1.9 software (Horiba Scientific, Villeneuve d'Ascq, France). For each spectrum, a 5 s exposure time was used with 5 accumulations.

In-depth Raman Imaging: For Raman imaging, RHE samples were deposited on CaF_2 slides. Optical cross sections (XZ confocal maps) were obtained in a point-by-point mode perpendicular to the dry RHE surface. A Raman spectrum was produced every 2 μm from -10 μm (above the *SC* surface) to +25 μm (under the skin surface) with a 2 μm step-size (objective displacement). All spectra were subjected to the same preprocessing protocol. The spectra were smoothed using the Savitsky-Golay algorithm, using 5 points and the baseline correction was done by a 3-order polynomial function.

Raman Data Processing

Epidermis thickness calculation: For each maturation day, 6 profiles representing 6 different locations of the surface were obtained from the confocal maps. The spectral profiles were obtained from the area under curve (AUC) of the band 1004 cm^{-1} . The latter is specific to phenylalanine. When the collection focus is outside the surface of the sample, the signal is near to zero. When the moving down, the spectra collected presented higher AUC values. In this manner, the positions of the outer and lower surfaces of the RHE are considered at the outer and inner mid height of the maximum. The distance between both positions gives the thickness of RHE measured by Raman spectroscopy (figure 1) ¹⁶.

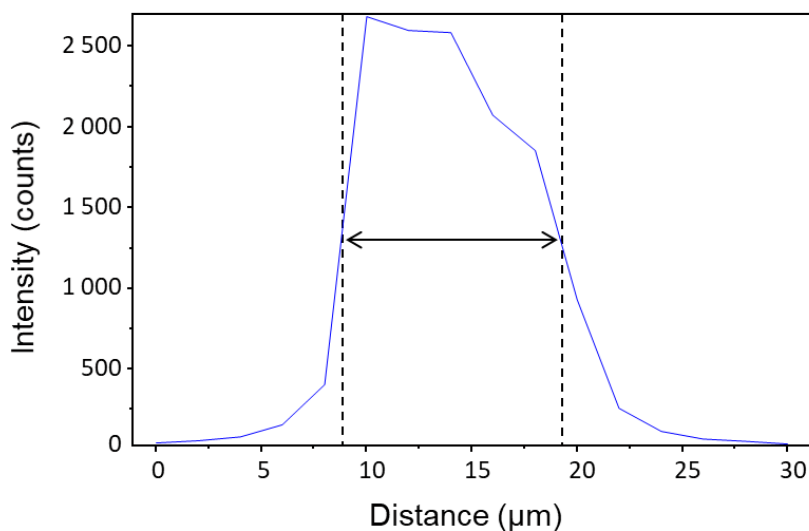


Figure 1 The spectral profile represents the method of the epidermis thickness calculation for each maturation day

Classical least squares fitting (CLS) for the evaluation of stratum corneum evolution: In order to follow the evolution of *Stratum Corneum* formation during the maturation days, reference spectra were collected from human skin cross sections. Spectra were collected from *Stratum Corneum* (SC) while viable epidermis and average spectra were calculated and used as reference.

For each pixel of the confocal Raman maps, the spectrum was de-convoluted with the use of the Labspec 6.1.9 software (Horiba Scientific, Villeneuve d'Ascq, France) by introducing the different contributions of CLS fitting. As a result, a spectral contribution was obtained for both SC and viable epidermis in each pixel of the image. The pseudo-color maps can thus highlight the contribution of both parts of RHE (figure 4).

For all the fits, the fit error was less than 0.7 %. It should be noted that only a spectral contribution percentage is obtained and not a mass or molar ratio. The spectral contribution of SC reference spectrum is thus obtained for all the pixels in the spectral maps. This enabled to calculate a mean percentage of SC contribution at each day of maturation.

Lipid conformational order: The ratio of $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$ (2882 cm^{-1})/ $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ (2852 cm^{-1}) was studied. This ratio is generally used as an indicator of the conformational state and the lateral packing (Figure 5). High values are associated with a compact state in the lipid packing, while a decrease is indicative of a loosening ¹⁷.

The analysis of the biomarkers: instrumentation and analytical method NP-LC/HR-MSn

The analysis of the extracted lipid was done by HPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). Separation of lipid occurred in NPLC using (PVA)-Sil column (PVA-bonded column; 5 μ m particle size, 150 \times 4.6 mm) purchased from YMC (Kyoto, Japan). A solvent gradient of Heptane/ethyl acetate (99.8: 0.2 v/v) (Solvent A), acetone and ethyl acetate (2: 1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v) (Solvent B) and 2-propanol/ water (85:15v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v) (solvent C) was used. A flow rate of 1 mL/min was done. The injected volume was 10 μ L. Detection was performed using two detectors simultaneously: a Corona CAD® and a hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) source. APPI positive ion mode was used to analysis the extracted lipid. The mass scan range was 220-1800 atomic mass units (amu). A full scan detection mode and fragmentation was performed by the orbital trap at a resolution of 100 000. The analytical conditions are detailed in a previous work ¹.

Results

As previously commented, in our study we aim to evaluate the maturation day of keratinocytes while cross-linking different parameters together: 1- the kinetic of caffeine percutaneous penetration, 2- the RHE thickness, 3- the evolution of the SC contribution in RHE, 4- the lipids' conformational state, 5- the evolution of lipids composition and 6- the evolution of the ceramides' subclasses.

The kinetic of caffeine percutaneous penetration

Figure 2 shows the kinetic of caffeine percutaneous penetration over an 8 hour duration at each maturation day of the keratinocytes. For a defined maturation day, the penetration of caffeine increased with time. This is a normal behavior already described in literature ⁸. However, for a defined application time, the penetration decreased along maturation days: during advanced maturation, the caffeine penetrated less. In order to take into account the global penetration profiles and not at a specific point in time, the slopes of the penetration linear regressions obtained for each maturation day were considered. With regards to the slopes (table 1, column 2), we detected a decrease of slope values with the evolution of the cell differentiation days. According to these results and as shown in figure 2, we can distinguish three separated groups: The first group concerns the slopes representing D12, 13 and 14. For these maturation days, the

caffeine amount that passed through the RHE samples was very high due to a not-so- fully formed *Stratum Corneum* and a non-established barrier function which permits a strong penetration of the molecules.

The second group regroups the slopes of D15, 17, 18 and 19. In this group we observed the decrease of the slope values *i.e.* the decrease of caffeine penetration in comparison with the first group.

Finally, from D20 to D24, a third group was identified. The caffeine quantity that passed through RHE samples was much lower.

At this stage of the study one can conclude on a direct relation between the maturation days and the decrease of the penetration of caffeine.

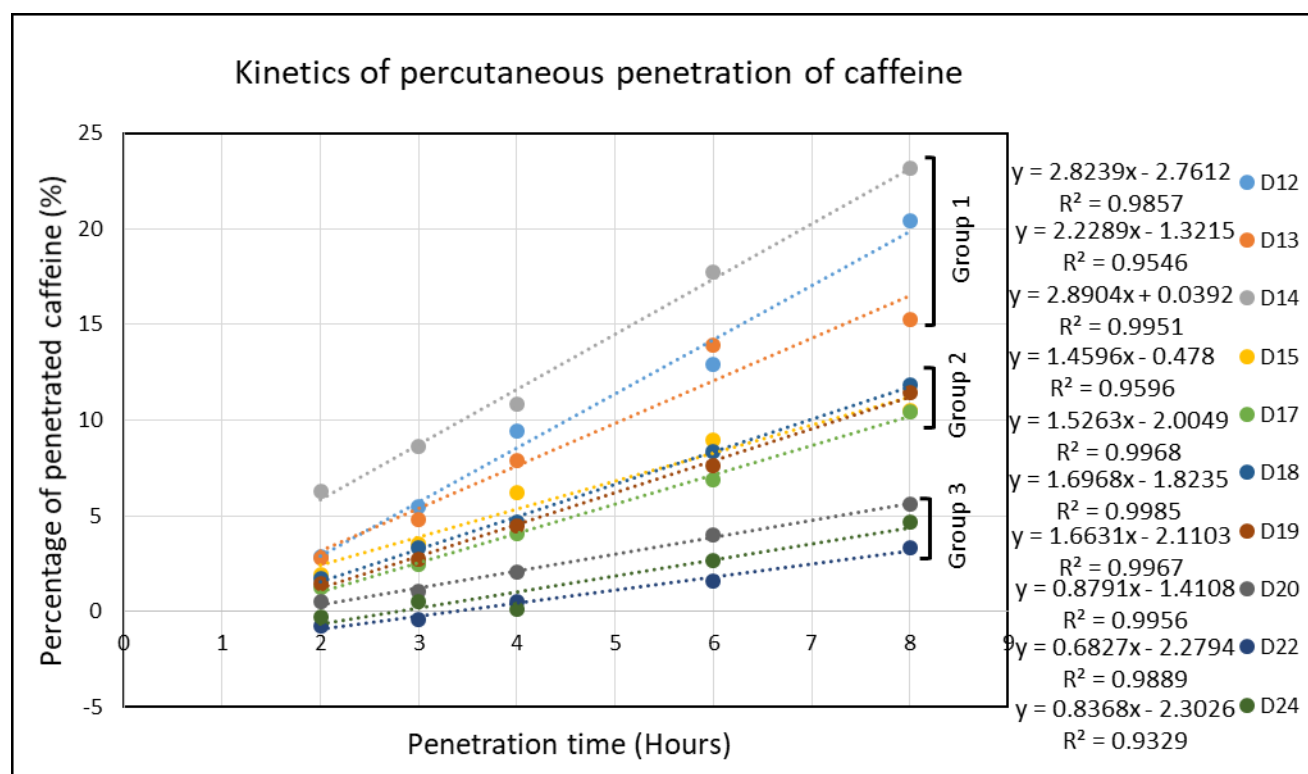


Figure 2 The kinetic of caffeine percutaneous penetration through the Reconstructed Human Epidermis model (RHE). Three groups of penetration profiles are clearly identified. *D: maturation day

Table 1 Data of the kinetic of caffeine percutaneous penetration and Raman microspectroscopy analysis. For each RHE maturation day, the slopes of caffeine penetration and the y intercept were calculated (column 2 and 3 respectively). The average of epidermis thickness and the percentage of SC contribution in the RHE (column 4 and 5 respectively) were calculated based on the Raman microspectroscopy data.

Maturation days	Slopes of caffeine penetration	Y intercept	Average of epidermis thickness (μm)	Percentage of SC contribution in the RHE
D12	2.82	-2.76	13.9 \pm 0.12	17 \pm 2
D13	2.23	-1.32	15.5 \pm 0.29	28 \pm 2
D14	2.89	0.04	15.7 \pm 0.40	15 \pm 6
D15	1.46	-0.48	17.6 \pm 0.40	31 \pm 1
D17	1.53	-2.00	20.5 \pm 0.46	26 \pm 4
D18	1.70	-1.82	23.1 \pm 0.06	31 \pm 5
D19	1.66	-2.11	24.7 \pm 0.29	43 \pm 6
D20	0.88	-1.41	25.4 \pm 0.35	46 \pm 4
D22	0.68	-2.28	26.3 \pm 0.17	41 \pm 4
D24	0.84	-2.30	27.3 \pm 0.17	40 \pm 1

The thickness of the Reconstructed Human Epidermis

Since caffeine percutaneous penetration might be linked to the thickness of the epidermis, the average values of RHE thickness were calculated (Table 1, column 4). Table 1 shows a gradual increase of the RHE thickness along the maturation days, following a linear fit with a correlation coefficient $R^2 = 0.95$ (data not shown). Figure 3 shows the correlation between the caffeine percutaneous penetration kinetics' slopes and the epidermis thickness during the RHE maturation days. The caffeine percutaneous penetration decreases when the RHE thickness increases. Figure 3 shows clearly the three groups of maturation days.

However, even if the global evolution of caffeine penetration is concordant with the RHE thickness, we can observe that in group 2, the thickness increase is not accompanied by a significant variation in the caffeine penetration profiles. We can conclude that the evolution of the skin barrier is not only related to the thickness of the RHE. This is the reason we decided to investigate further on the SC.

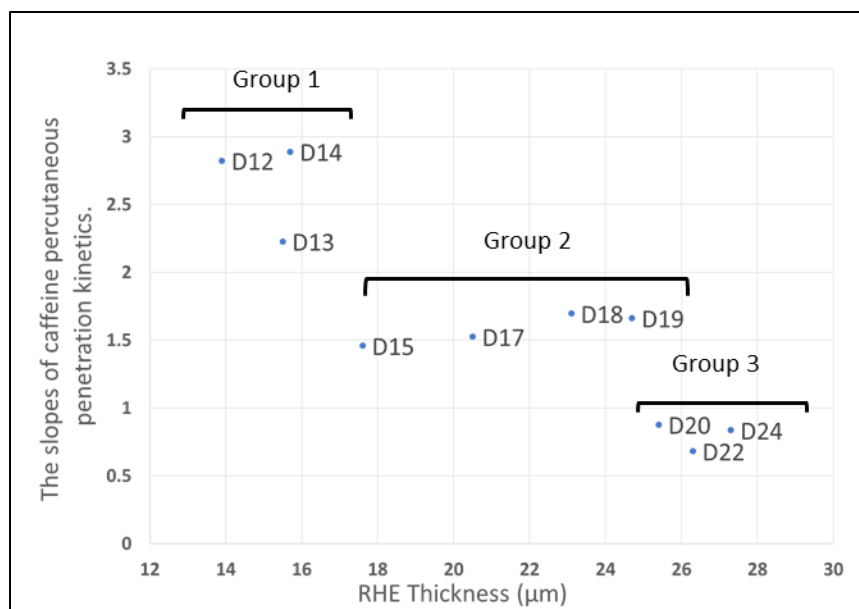


Figure 3 The correlation between the caffeine percutaneous penetration kinetics slopes and the epidermis thickness during the RHE maturation days. Three separated groups of maturation were detected: D12 to D14, D15 to D19 and D20 to D24.

The evolution of the SC contribution in RHE

The reduction of the penetration of caffeine may be due not only to the epidermis thickness, but also to the SC contribution. To confirm this hypothesis, the SC evolution and contribution were studied. Thus, CLS fitting based on reference spectra from human SC and SG was applied to the Raman spectra all in -depth RHE Raman maps for the different maturation days. Figure 4 demonstrates that the SC layer (red color) increased along the differentiation process. One can observe that the SC layer (red color) of the first three days D12, D13, and D14 is almost similar. After D15, the SC is more important. Days 20 and 22 appear to have the thickest layer of SC. These results can give us a first assessment of the SC evolution during RHE differentiation process.

As shown in table 1 (column 5) and figure 4, The SC contribution was the lowest for D12 to D14. Between D15 and up to D18, a clear increase of SC contribution percentage is observed. Finally, from D19 and up to D24 the highest SC contribution percentage is detected. Despite the high SC contribution at D19, its related penetration kinetics is closer to the second group, this may be explained by a time shift between lipids formation and organization. These results are consistent with results on the conformational order of lipids shown in figure. 4. We can observe that day 20 has a better lateral packing.

As shown in table 1 (column 5) and figure 4, we can distinguish 3 groups: D12 and D14 where SC contribution percentage is the lowest. The second group regroups D15 and up to D18. In this group, there is a clear increase of SC contribution percentage compared to the first group. Finally, the group from D19 and up to D24 has the higher SC contribution percentage compared with the first two groups. These results are consistent with results of the epidermis thickness shown in figure. 3. We can observe that day 20 has the most important SC contribution.

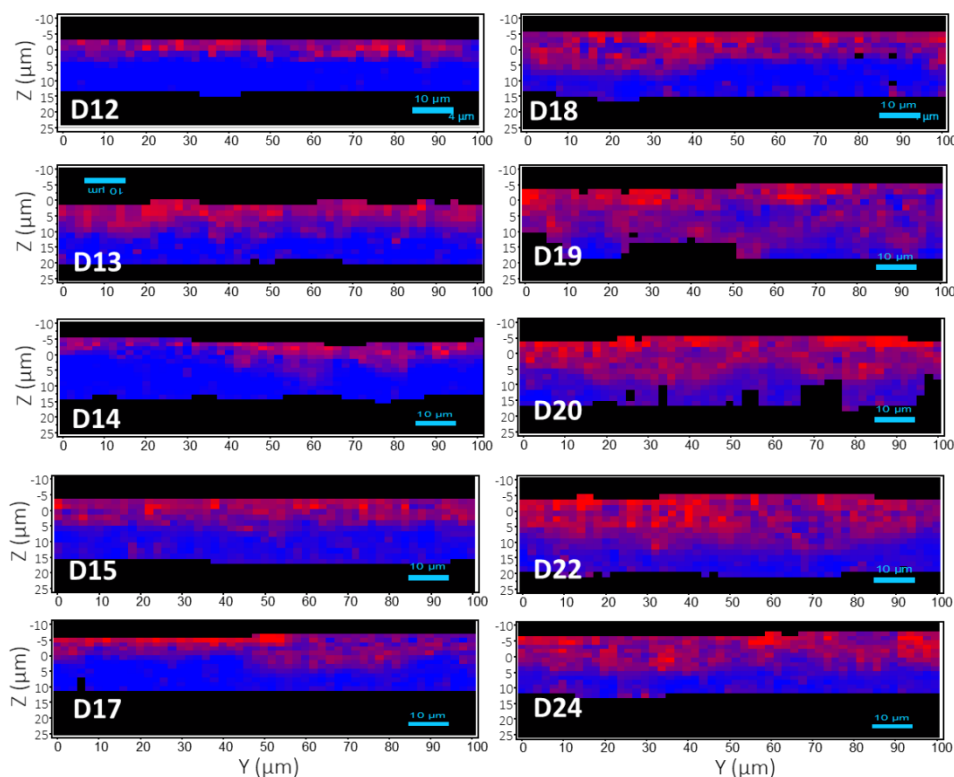


Figure 4 The evolution of the SC (Red color) compared to the granular layer (Blue color) during RHE maturation days. Raman spectra of RHE model at each maturation day were fitted with the reference spectra of human isolated SC and SG.

The lipid conformational state

In this part, we aim to study first the evolution of the lipids' organization during the maturation of keratinocytes and then the relationship between the caffeine percutaneous penetration and the organization of the lipids in the epidermis. The ratio of $v_{\text{asym}} \text{CH}_2$ (2882 cm^{-1})/ $v_{\text{sym}} \text{CH}_2$ (2852 cm^{-1}) was also calculated as shown in figure 5. This ratio is associated with the organizational order of lipids. The false color images were reconstructed based on the values of this ratio at each pixel of the image. Higher organizational order associated to a high ratio is represented in green to red while the lower order is colored in blue. For the first group, D12 and D14 showed lower values of organizational order. These results are in concordance with the data of caffeine penetration, revealing high permeability for these

days. The plot of the organizational order showed a continuing rise increase in the SC lipid organization from D15 up to D24. It is worthy to notice the presence of higher number of red pixels D15 and D20 with a heterogeneous distribution in the SC. Compared to the observations on caffeine penetration (figure 2 and 3) these two days correspond to the transition days between the two groups.

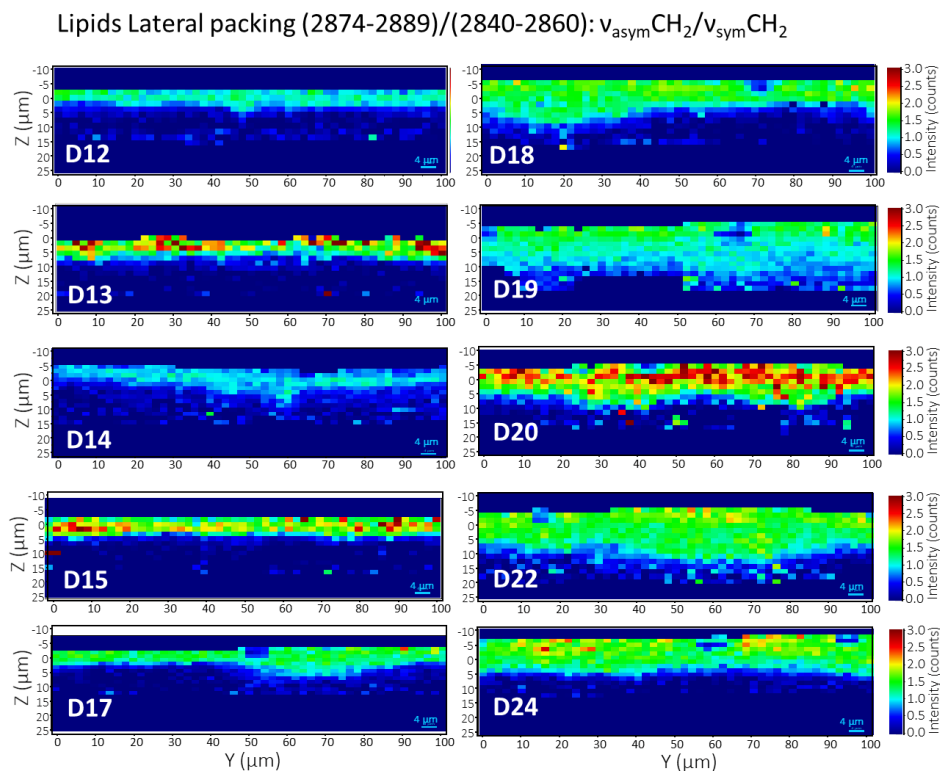


Figure 5 Conformational state and lateral packing of lipids in the Stratum Corneum of RHE: v_{asymCH_2} (2882 cm^{-1})/ v_{symCH_2} (2852 cm^{-1}) ratio. High values are associated with higher trans content and a compact organization. High number of red pixels indicates a heterogeneous distribution in the SC.

The evolution of the lipid biomarkers during the differentiation process

Ceramides, Glucosylceramides and Sphingomyelins classes are considered as biomarkers for lipid biosynthesis during the differentiation process. The analytical method used in this study was previously developed by our group ¹ and was able to separate epidermis lipid classes in one single run. Figure 6 represents the chromatographic profile obtained for RHE models at D22 ¹. In this method, the lipid elution depends on the polar moieties (or “head group”) of each lipid class. The Ceramide class is divided into different subclasses which differ in their structural micro heterogeneity, due to the number of hydroxylation, the number of unsaturation, the chain-length of amide-linked fatty acid and the isomers. Our analytical method is thus able to separate ceramide subclasses which are present in the form of several

peaks between 18.3 and 30 min as shown in figure 6. As for Glucosylceramides and Sphingomyelins, all the lipids of each class were eluted in a one single chromatographic peak at 36.88 and 43.11 minutes of retention time respectively. This is due to the polarity of the glycosyl and phosphocholine groups, which is greater than the polarity differences induced by structural micro-heterogeneity¹. Figure 7 presents the evolution of the 3 lipids biomarkers ceramides, glucosylceramides and sphingomyelins respectively during the differentiation process. Results show that the amount of ceramides increased while the amounts of glucosylceramides and sphingomyelins decreased throughout the differentiation. Marked increases can be observed at D14 and D18: these increases occur 24 to 48 hours before we can see a noticeable decrease in the caffeine penetration profile and an important lipid organization.

The evolution of the ceramides' subclasses

Ceramides play a key role in the skin barrier function¹⁸. Ceramides with ultra-long chain (ULC) of fatty acids (\geq C26) such as esterified ceramides, are the major components of the barrier and of the extracellular multi-lamellar lipid layers of SC¹⁹. For this reason, the evolution of each ceramide subclass was carried out using NPLC/HR-MSⁿ and NPLC/Corona simultaneously¹. The identification of each ceramide subclass in each chromatographic peak was determined previously¹ and the areas of the corresponding chromatographic peaks were measured. In general all ceramides subclasses increased along the differentiation process (figure 8). Ceramides with retention time between 18.3-19.75 min (yellow line) regrouped subclasses with the most nonpolar ceramides such as ceramides with very long chain of fatty acid (ENH,ENT,EAP)¹, and also the new ceramide subclasses, a double esterified ceramides such as cer 1-O-E(EO)T, cer 1-O-E(EO)S and cer 1-O-E(EO)H¹. Ceramide subclasses with retention time between 20-22.5 min (gray line) and 24.5-28 min (orange line) regrouped (EOS, EAH NS, Nds,) and (NP, Ads, AS, AP, EOH, NH) respectively and had a moderate polarity. Ceramides with a very polar head which have several hydroxyl groups such as (AH, NT) were detected at retention times between 29-30 min (blue line). Interestingly, very marked variations can be observed at D14, D18 and D24.

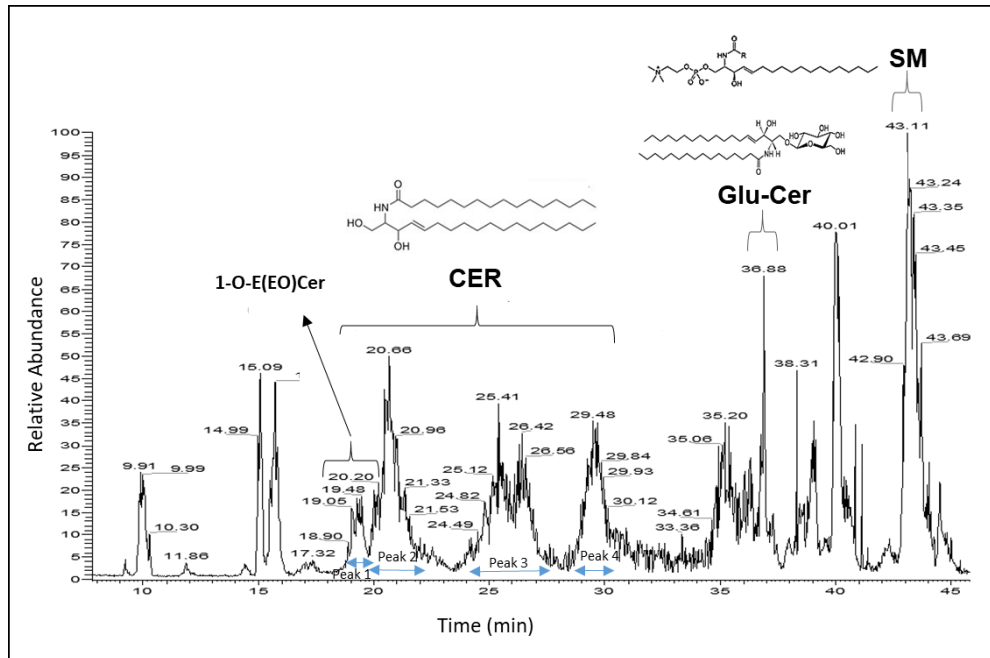


Figure 6 NPLC/Corona chromatographic profile of three lipid biomarkers classes (Ceramide, Glucosylceramide and sphingomyelin) obtained for the RHE culture at D22. CER classes are divided into several subclasses and are presented in the form of several massive between 18.30-30 min.¹

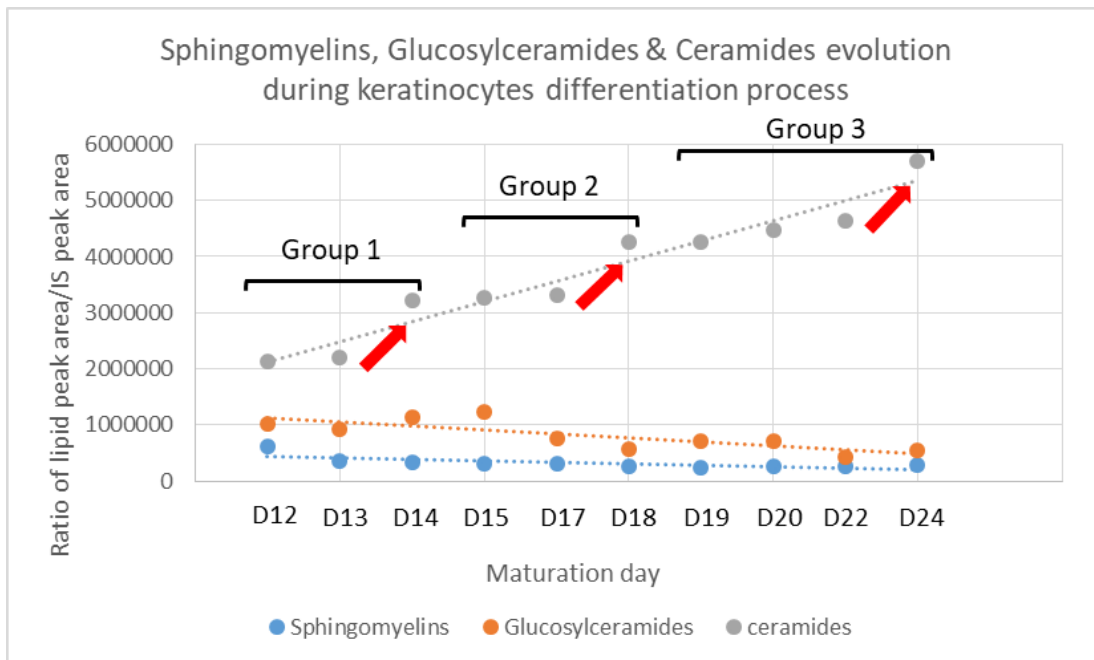


Figure 7 Ceramides, Glucosylceramides and Spingomyelins evolution during keratinocyte differentiation process. The total lipids of RHE samples were extracted and analyzed using NPLC/HR-MSⁿ and HPLC/Corona. The grey linear trendline presents the evolution of sum of ceramide peak areas divided by internal standard (IS) area. The orange linear trendline presents the evolution of glucosylceramide peak areas divided by internal standard area. The blue linear trendline presents the evolution of Spingomyelin peak areas divided by internal standard area.

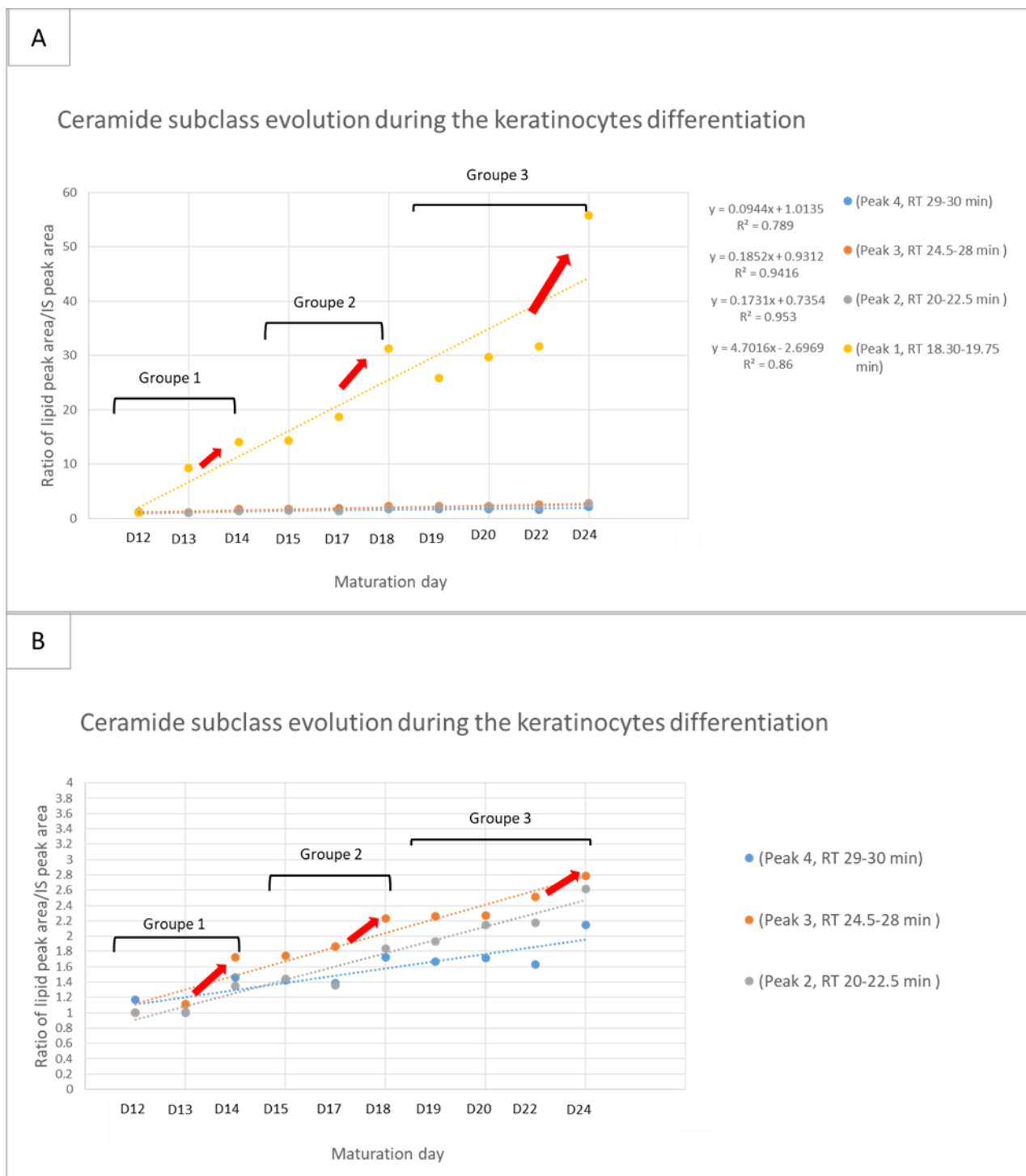


Figure 8 The evolution of the ceramide subclasses during keratinocyte differentiation process. The total lipids of RHE samples were extracted and analyzed using NPLC/HR-MSⁿ and HPLC/Corona. The evolution of ceramide subclasses between retention times of 18.3 minutes and 30 minutes was followed. The yellow trendlines present the evolution of nonpolar ceramide subclasses (esterified ceramide) which have a very long chain of fatty acid part (ENH, ENT, EAP and 1-O-E(EO)Cer) (A). The grey and orange trendline presents the evolution of ceramides with a moderate polarity (EOS, EAH, NS, NDS) and (NP, Ads, AS, AP, EOH, NS) respectively (B). The blue trendlines presents the evolution of the most polar ceramides (AH, NT) (B).

Discussion

In this work, the keratinocyte differentiation process was followed from D12 to D24. We used the multimodal approach described above because it has the advantage of offering different types of data that can converge and provide relevant and solid information to characterize the skin barrier functionality and to establish a link between the barrier function and the structure and the composition of the *SC*.

The barrier function of human skin resides in the Stratum Corneum¹⁹. In this study, the caffeine penetration study gives a first assessment of the skin barrier function.

The properties of the skin barrier depend on the *SC* lipids organization^{3, 20}. Alteration in *SC* lipid organization can impair epidermal function and leads to skin diseases¹⁹. In this study, Raman spectroscopy provided us several information about the lipid organization, the epidermis thickness and the *SC* evolution.

The lipid composition also plays a key role in the skin barrier function²¹. Ceramides are the dominant lipid class (over 50%) of the total lipids species in the outermost epidermal layer. Then at the interface between the *SG* and *SC*, two ceramide precursors (sphingomyelins and glucosylceramides) are converted back to their ceramides species²². Thus, it is important to follow the ceramides precursors' evolution and to provide additional information about the stage of the keratinocytes' maturation. In this study, and for the first time, the evolution of keratinocytes' differentiation biomarkers (ceramides, glucosylceramides and sphingomyelins) was studied not only at the *SC* level but also at an earlier stage of the keratinocytes' differentiation.

However, skin diseases are correlated to lipid abnormality including modification in ceramide subclasses²³. Thus, it is important to assess the evolution of ceramide subclasses during the differentiation process. This investigation was achieved using the NPLC/HR-MSⁿ.

It was observed that the caffeine penetration decreased during the RHE maturation. A clear evolution in the *Stratum Corneum* had been detected, with a better lipid organization at the later maturation days. Regarding the lipid composition, the ceramides level was increased throughout the differentiation, whereas in contrast, a decrease in the glucosylceramides and sphingomyelins levels was observed. In our study, we could distinguish 3 phases of maturation: - Maturation phase I: between D 12 and D 14: results indicate that at this stage that the barrier function was not established yet. A high caffeine penetration throughout the RHE was observed with an important variation of values intra-group (figure 2). RHE was thinner (figure 3), the *SC* contribution in the RHE was the lowest (figure 4). In addition, there was a weak compact organization associated with a random behavior. During this phase, the total

ceramide amount was lower compared to the next phases. Inversely, the glucosylceramide and sphingomyelin levels were more abundant compared with the other maturation phases. The high value of these ceramides precursors is due to the high glycosylation and phosphorylation of ceramides into glucosylceramides, and sphingomyelins respectively, which occur before the *SC* and particularly with a high degree at the *SG*^{18, 24}. For this reason, we were able to conclude that before D15, the *SC* was not fully formed.

- Maturation phase II: between D 15 and D 19: Caffeine penetration was less important compared with previous maturation phases but still not enough compared to the increase of the epidermis thickness (figure 3). These observations confirm that the barrier function is not only determined by RHE thickness, but rather by the organization of the intercellular lipids. In addition, the ceramide amount was increased. In contrast, glucosylceramides showed a high decrease after D15. Glucosylceramides are considered as precursors for the most *SC* ceramides; they convert back to the ceramides at the interface between the *SG* and *SC*. For this reason, their clear decrease after D15 is correlated with the high increase in ceramides. Unlike glucosylceramides, sphingomyelins are precursors for only some of the ceramides subclasses^{25, 26}. Furthermore, sphingomyelins are present in high quantities at the *SG* cells membranes^{26, 27}. This double sphingomyelin origin in keratinocytes may explain its less important decrease due to the ceramides biosynthesis compared to glucosylceramides. In conclusion, after D15, the *SC* forms a continuous layer, with good organization order, in the RHE model. As previously mentioned this observation is in concordance with data provided from Raman microspectroscopy suggesting a transition from *SG* to *SC*. In fact, at D15, in depth Raman imaging (figure 4) demonstrated higher red pixels heterogeneously distributed indicating a heterogeneous distribution in the *SC* and thus, D15 may be identified as a transition day between two phases of differentiation days. All of these data provided from the multimodal approach confirm that between D15-D19 the *Stratum Corneum* was formed and the barrier function was established.

- Maturation phase III: between D20 and D 24: the caffeine penetration decreased more and more. In addition, the RHE thickness and *SC* evolution were more important and the lipid organization was higher. Ceramides reached their maximum value, on the other hand glucosylceramides and sphingomyelins attained their lowest values. Similar to D15, D20 can be identified as a transition day between two phases. These results demonstrated that the multilayers of the *SC* continue to form during the last maturation days with good functionality of the skin barrier. A high value of *SC* contribution in RHE Raman spectral signatures (table 1) was detected and a higher *trans* content which showed a better organized and more compact lipids.

It is worthy to take note of the presence of a shift of about 24h to 48h between the formation of the lipids and their organization. For example, an increase in the amount of ceramides was observed at D14, while an enhancement in the organization of lipids was detected at D15. Similarly, the same observation was obtained at D18-D19 for an enhancement of the organization at D20.

Furthermore, although the amount of each ceramide subclass increased throughout the differentiation, the relative increase is different from one subclass to another depending on the biosynthesis stage in the epidermis²⁵. Thus, the increase of the nonpolar ceramides subclasses such as ceramides with very long chain (ENH, ENT, EAP, and 1-O-E (EO) Cer) (RT =18.3-19.75min) throughout differentiation days was more important compared to the polar ceramides (RT 29-30 min) (figure 8). These nonpolar ceramide subclasses may generate at a late stage of the differentiation process and particularly at the interface between *SG* and *SC*²⁵. Regarding their hydrophobicity, these subclasses play an important role in the barrier function. This may confirm the establishment of the RHE barrier function starting D15. In fact, and thanks to our multimodal approach, we could conclude that for studies involving the barrier function of RHE models, it would be ideal to use these models from the 15th day of differentiation. However, studies related to cytotoxicity, irritation, corrosion could be applied before D15, since they are not related to the barrier function. By studying the last maturation days (D20-D24) we did not observe an alteration of the barrier function, but on the contrary, the *SC* continued its thickening and the lipids presented a better organization with a large quantity of ceramides. This maturation phase could be used when studying the impact of an active ingredient over a long duration of application.

In conclusion, this multimodal approach allows to fine select the maturation day of keratinocytes according to the type of the study that should be conducted.

Conclusion

The use of the reconstructed epidermis model has well evolved in order to better meet the needs of researchers. The choice of the maturation period varies according to the purpose of the study. In this work we presented a multimodal approach which has a very high capacity to offer complementary information, which is crucial to link the barrier function with the structure of the *SC*. Thus, the barrier function of the *Stratum Corneum* is not only determined by its formation and its thickness but also by the composition and the structural organization of its intercellular lipids and

the homogeneity of their formation. This approach allows the researchers to determine the period maturation which corresponds to their analysis goal.

Acknowledgements

The authors would like to thank the SILAB - Jean PAUFIQUE Corporate Foundation of the financial support for this work.

Compliance with ethical standards Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

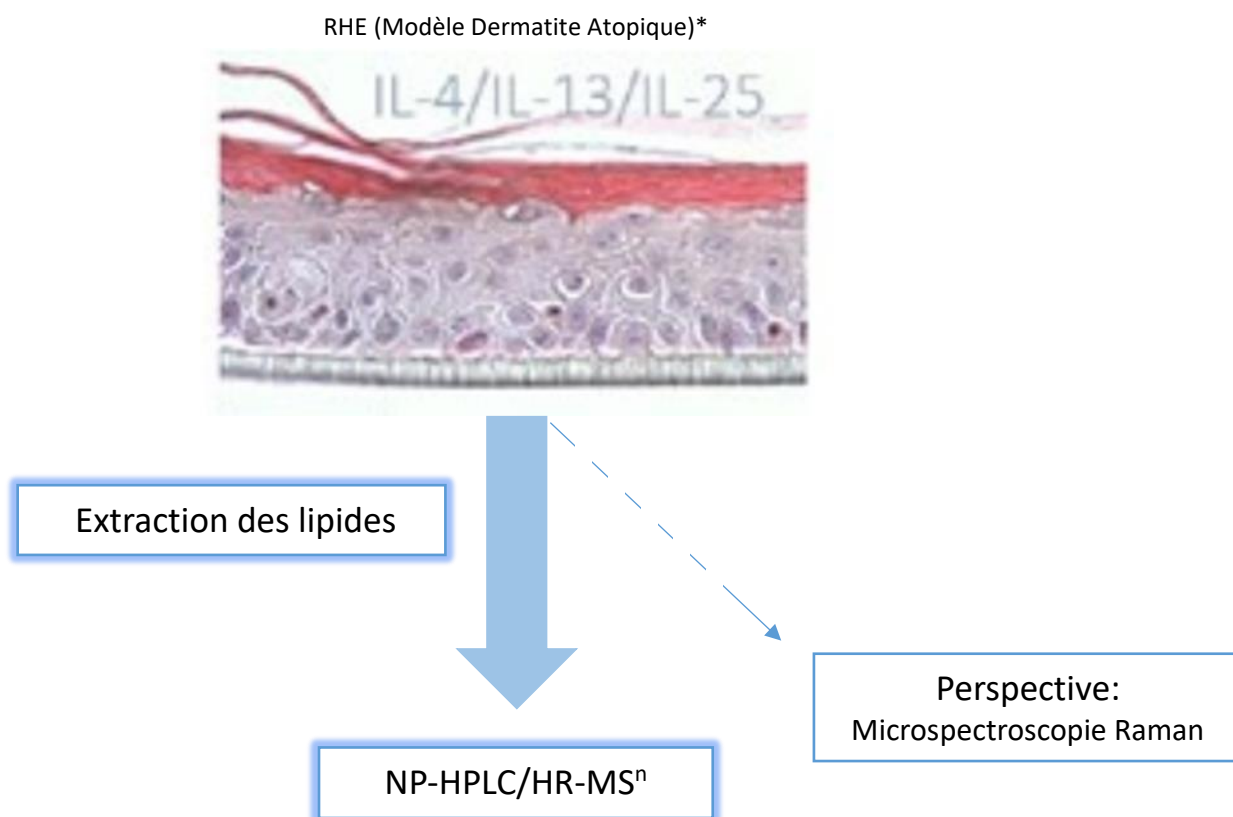
References

1. A. Assi, J. Bakar, D. Libong, E. Sarkees, A. Solgadi, A. Baillet-Guffroy, R. Michael-Jubeli and A. Tfayli, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019, DOI: 10.1007/s00216-019-02301-3.
2. M. Ponec, E. Boelsma, A. Weerheim, A. Mulder, J. Bouwstra and M. Mommaas, *International journal of pharmaceutics*, 2000, **203**, 211-225.
3. M. Ponec, E. Boelsma, S. Gibbs and M. Mommaas, *Skin pharmacology and applied skin physiology*, 2002, **15 Suppl 1**, 4-17.
4. M. Ponec, S. Gibbs, G. Pilgram, E. Boelsma, H. Koerten, J. Bouwstra and M. Mommaas, *Skin pharmacology and applied skin physiology*, 2001, **14 Suppl 1**, 63-71.
5. J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, A. Weerheim, J. Kempenaar and M. Ponec, *J Lipid Res*, 1995, **36**, 496-504.
6. M. Ponec, A. Weerheim, J. Kempenaar, A. Mulder, G. S. Gooris, J. Bouwstra and A. M. Mommaas, *J Invest Dermatol*, 1997, **109**, 348-355.
7. A. Tfayli, F. Bonnier, Z. Farhane, D. Libong, H. J. Byrne and A. Baillet-Guffroy, *Exp Dermatol*, 2014, **23**, 441-443.
8. L. J. Lowenau, C. Zoschke, R. Brodewolf, P. Volz, C. Hausmann, S. Wattanapitayakul, A. Boreham, U. Alexiev and M. Schafer-Korting, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 2017, **116**, 149-154.
9. G. Potard, C. Laugel, A. Baillet, H. Schaefer and J. P. Marty, *International journal of pharmaceutics*, 1999, **189**, 249-260.
10. F. Netzlaff, M. Kaca, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, P. Meiers, C. M. Lehr and U. F. Schaefer, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 2007, **66**, 127-134.
11. R. Darlenski, S. Sassning, N. Tsankov and J. W. Fluhr, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 2009, **72**, 295-303.
12. S. Tfayli, C. Gobinet, G. Josse, J. F. Angiboust, A. Baillet, M. Manfait and O. Piot, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2013, **405**, 1325-1332.

13. L. Verzeaux, R. Vyumvuhore, D. Boudier, M. Le Guillou, S. Bordes, M. Essendoubi, M. Manfait and B. Closs, *Exp Dermatol*, 2017, **27**, 403-408.
14. C. A. Brohem, L. B. Cardeal, M. Tiago, M. S. Soengas, S. B. Barros and S. S. Maria-Engler, *Pigment cell & melanoma research*, 2011, **24**, 35-50.
15. E. G. Bligh and W. J. Dyer, *Can J Biochem Phys*, 1959, **37**, 911-917.
16. A. Tfayli, O. Piot and M. Manfait, *Journal of biophotonics*, 2008, **1**, 140-153.
17. A. Tfayli, E. Guillard, M. Manfait and A. Baillet-Guffroy, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, **397**, 1281-1296.
18. M. H. Meckfessel and S. Brandt, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2014, **71**, 177-184.
19. B. Breiden and K. Sandhoff, *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1841**, 441-452.
20. J. van Smeden and J. A. Bouwstra, *Current problems in dermatology*, 2016, **49**, 8-26.
21. M. Danso, W. Boiten, V. van Drongelen, K. Gmelig Meijling, G. Gooris, A. El Ghalbzouri, S. Absalah, R. Vreeken, S. Kezic, J. van Smeden, S. Lavrijsen and J. Bouwstra, *J Dermatol Sci*, 2017, **88**, 57-66.
22. Y. Mizutani, S. Mitsutake, K. Tsuji, A. Kihara and Y. Igarashi, *Biochimie*, 2009, **91**, 784-790.
23. F. F. Sahle, T. Gebre-Mariam, B. Dobner, J. Wohlrab and R. H. Neubert, *Skin pharmacology and physiology*, 2015, **28**, 42-55.
24. P. M. Elias, *J Invest Dermatol*, 1983, **80**, 44s-49s.
25. M. Rabionet, K. Gorgas and R. Sandhoff, *Bba-Mol Cell Biol L*, 2014, **1841**, 422-434.
26. Y. Uchida, M. Hara, H. Nishio, E. Sidransky, S. Inoue, F. Otsuka, A. Suzuki, P. M. Elias, W. M. Holleran and S. Hamanaka, *J Lipid Res*, 2000, **41**, 2071-2082.
27. B. Ramstedt and J. P. Slotte, *Febs Lett*, 2002, **531**, 33-37.

CHAPITRE 6

Application à l'analyse d'un modèle d'Epiderme Reconstruit Humain (RHE) altéré, de type atopique et étude de preuve de concept d'un actif « correcteur »



6.1- Définition de la dermatite atopique (AD)

La dermatite atopique, également appelée eczéma atopique, est une maladie très courante associée avec une inflammation chronique et une barrière cutanée altérée¹. Cette maladie touche dans une grande majorité des cas les nourrissons et les jeunes enfants (15%) mais également peut apparaître chez les adultes (2-10%)^{1, 4}. Elle se caractérise par une sècheresse cutanée associée à des lésions de type eczéma (rougeurs et démangeaisons, vésicules, suintement et croûtes). En effet, l'altération de la barrière cutanée est l'une des principales anomalies de cette maladie. Elle provoque le mouvement de l'eau de la couche cornée (SC) vers l'atmosphère communément appelée perte d'eau transépidermique (Perte Insensible en Eau *PIE*) et la pénétration d'allergènes et de micro-organismes dans la peau. Ces processus entraînent une irritation, un prurit et des égratignures, provoquant une lésion mécanique de l'épiderme qui aggrave encore l'altération de la barrière cutanée^{5, 6}.

6.2- Physiopathologie de l'AD

Concernant sa pathogenèse, la dermatite atopique (AD) est une maladie récurrente complexe, multifactorielle et encore mal comprise. Elle peut très probablement être déclenchée par : l'altération de la barrière épidermique et la dérégulation de la réponse immunitaire Th2, chacune étant potentiellement responsable de l'induction de l'autre altération, créant ainsi un cercle vicieux responsable des lésions⁷. Plusieurs facteurs génétiques, ainsi que divers facteurs environnementaux (utilisation intensive de savons et de détergents, polluants, allergènes et stress psychologique) sont impliqués dans la pathogenèse d'AD^{8, 9}.

Concernant les causes génétiques, le gène de la filaggrine, protéine majeure de l'enveloppe cornée, est considéré comme le facteur de risque génétique le plus important pour le développement de la maladie atopique, car la protéine codée est impliquée à différents niveaux dans la formation et le maintien d'une barrière épidermique correcte⁷. En effet, toute diminution de l'expression de la filaggrine, ainsi que de sa fonction, peut altérer l'agrégation des filaments de kératine et ainsi la formation d'une barrière fonctionnelle¹⁰. Dans une peau saine, les métabolites finaux de cette protéine sont l'acide urocanique (UCA) qui contribue à l'acidification de la couche cornée et l'acide pyrrolidine -5-carboxylique (PCA) qui est un constituant majeur des facteurs naturels d'hydratation (NMF)¹¹. Pour ces raisons, une mutation dans le gène de la filaggrine, conduit *in fine* à une diminution de ses métabolites et donc une augmentation du pH du SC. Cette augmentation au niveau du pH peut altérer l'activité de différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides telles que les enzymes précurseurs des céramides : la β -glucocérébrocidase (qui métabolise les glucosylcéramides en céramides) et la sphingomyélinase (qui métabolise les

sphingomyélines en céramides). Ces deux enzymes nécessitent un pH égal ou inférieur à 5,5 pour une activité optimale ¹¹.

Depuis plusieurs années, les recherches bibliographiques montrent qu'il existe une relation entre la perturbation de la barrière cutanée (comme dans le cas de la peau atopique) et la réponse inflammatoire. La surexpression de cytokines Th2 telles que l'IL-4, l'IL-13 représente un marqueur de la peau atopique. De plus, l'ajout des cytokines Th2 conduit à diminuer l'expression de filaggrine ¹². Certaines cytokines peuvent affecter l'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides tels que les acides gras et les céramides ¹³.

On peut conclure, que la manifestation de la peau atopique résulte de la présence des interactions entre trois éléments : facteur génétique, facteur immunitaire et perturbation de barrière cutanée.

6.3- Perturbation de la biosynthèse des lipides dans l'AD et impact des cytokines Th2

6.3.1- Impact de l'atopie sur la composition des lipides de l'épiderme humain (*in vivo*)

Dans un épiderme humain sain, les lipides du SC sont principalement composés de céramides, de stérols (cholestérol) et d'acides gras libres ¹⁴.

Dans la peau atopique le taux des acides gras libres saturés reste relativement comparable à celui de la peau saine. Le niveau des acides gras libres portant une seule insaturation est augmenté dans les zones affectées de la peau atopique. Le niveau des FFAs de très longue chaîne (≥ 24 atomes de carbone) présente une forte diminution, tandis que les FFAs plus courts augmentent, en particulier dans les parties affectées de la peau atopique ^{6, 15}.

En comparaison avec d'autres lipides cutanés, les céramides ont attiré l'attention des chercheurs, en particulier les sous-classes des céramides ω -estérifiées (EO) qui contiennent une ultra longue chaîne d'acide gras ($C > 26$). En raison de cette longueur de chaîne, cette sous-classe est hautement hydrophobe et peut jouer un rôle important pour maintenir la fonction barrière ¹⁶.

Plusieurs études ont montré des perturbations dans la composition des lipides en général et des céramides en particulier dans la peau des patients atteints d'atopie ^{6, 3, 17}.

Ishikawa et al ³ (2010) ont comparé la composition des différentes sous-classes de céramides entre la peau saine, et la peau atopique (zone affectée et non-affectée) en utilisant la LC/ESI-MS. Les résultats ont montré que la concentration totale de céramides a été significativement diminuée dans la zone affectée de la peau atopique par rapport à la peau saine. Il en est de même pour le taux de certaines sous-classes de céramides: Cer[NH] et Cer[NP] (céramides avec une chaîne acide gras Non hydroxylée), Cer[EOS], Cer[EOH] et Cer[EOP] (céramides estérifiés). Par contre, le taux de la sous-classe Cer [AS] (céramides avec une chaîne acide gras α hydroxylée) a été significativement plus élevé dans la zone affectée de la peau atopique par rapport à la peau saine.

Il est important de noter qu'au sein de chaque sous-classe de céramides, les longueurs de chaînes alkyles sont impactées dans les peaux atopiques : dans les zones affectées, les céramides composés d'un nombre total de carbone supérieur à 40 atomes sont significativement plus faibles par rapport à la peau saine, contrairement à ceux dont leur nombre total de carbone est inférieur à 40 atomes qui sont significativement plus élevés (Figure 6-1, C).

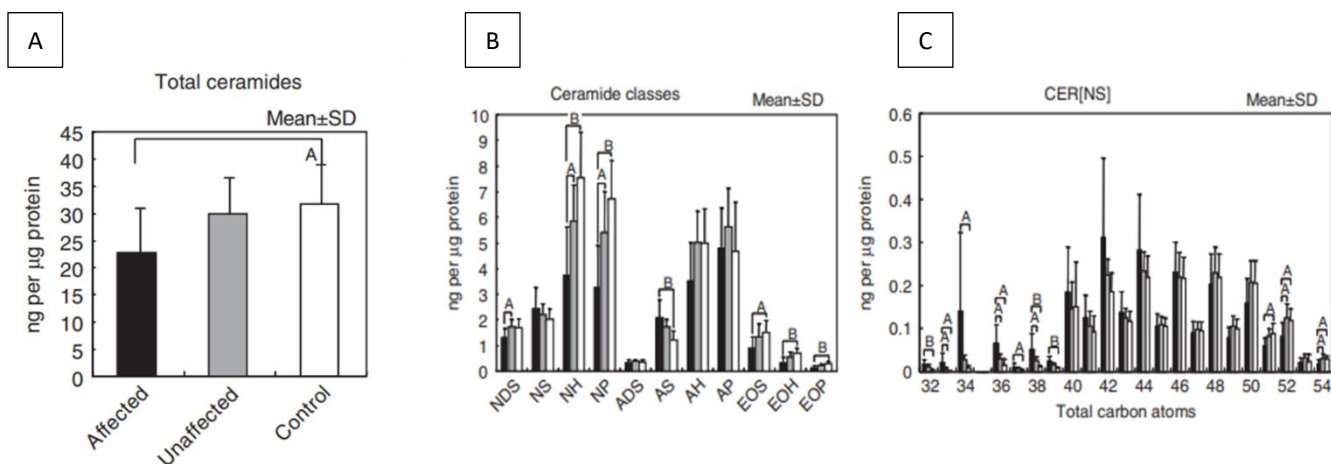


FIGURE 6-1 : Profils de céramides comparés entre la peau saine et la peau atopique (zones affectée et non-affectée) ³

En 2014, Smeden et al ont montré en particulier une augmentation de la quantité relative des céramides dont le nombre total de carbone est de 34 atomes, principalement dans les sous-classes Cer [NS] et Cer [AS], alors qu'une réduction près de 50% a été observée pour la quantité relative des céramides ω -estérifiés Cers(EOS, EOP, EOH, EODS) dans la zone affectée de la peau atopique par rapport à la peau saine¹⁵.

En plus de leur composition, l'organisation des lipides joue un rôle important pour maintenir la fonction barrière. Des altérations dans l'organisation des lipides ont été observées dans la peau atopique¹⁸. En effet, le taux de céramides avec des longueurs courtes de la chaîne alkyle (C16-C18) est considérablement élevé dans le SC des patients atteints de dermatite atopique, ce qui conduit à une organisation lipidique perturbée et à une fonction de barrière cutanée moins efficace¹⁸.

Le tableau 6-1 résume les altérations dans la composition et l'organisation des lipides dans la peau atopique.

Tableau 6-1 : Modifications de la composition et l'organisation des lipides du SC dans la peau atopique⁶.

Changed parameter	Observations in AD patients (compared with healthy subjects)
CER	Increase in CER subclasses AS, AH, AP, ADS, NS Decrease in CER subclasses NP, NH, acyl-CERs (CER-EO) Increase in short chain CERs (<C42), particularly C34 CERs Decrease in long chain CERs (>C44)
Fatty acids	Increase in short chain FFAs (≤C18) Reduction in long chain FFAs (≥C24) Increase in MUFAs Decrease in hydroxy-FFAs
Lateral lipid organization	Less lipids adopt an orthorhombic packing Increased level of lipids adopting a hexagonal lipid packing Less conformational ordering of the lipids
Lamellar lipid organization	Reduction in repeat distance of lamellar phases

6.3.2- Impact des cytokines Th2 sur les enzymes clés dans la biosynthèse des lipides.

L'imitation des conditions de la dermatite atopique peut être obtenue *in vitro* par incubation des kératinocytes avec des cocktails d'interleukines surexprimées dans la pathologie ou en bloquant l'expression des gènes codant des composants impliqués dans le développement et la structure de la barrière,^{19, 20, 13, 16}. Les cytokines Th2 affectent l'expression de l'ARNm des enzymes impliquées dans la biosynthèse lipidique^{13, 16}. En particulier, les IL-4, IL-13 et IL-31 induisent une altération de l'expression des enzymes de la biosynthèse lipidique telles que SCD1 (insaturation des chaînes alkyles), aSmase (hydrolyse des sphingomyélines), ELOVL1 (élongation des chaînes des acides gras), GBA (hydrolyse des glucosylcéramides) et CERS3 (synthèse de certains céramides)¹³. Dans une étude récente sur des kératinocytes humains primaires, différenciés en présence de CaCl₂ et traités par IL-4 / IL-13, il a été démontré que les cytokines conduisaient à une augmentation de la teneur des céramides NS à chaîne courte

avec un acide gras en C16 - C20 ¹⁶. Cette observation est le résultat d'une régulation à la baisse de l'expression des élongases ELOVL3, ou d'ELOVL6 corrélée avec la présence des IL-4 / IL-13 en contact avec les kératinocytes humains différenciés ¹⁶. ELOVL3, ELOVL6 expliquent l'allongement de la synthèse des acides gras de longues chaînes de carbone saturées et mono-insaturées. L'enzyme ELVOL3 est responsable de la formation d'acides gras à chaîne très longue (C18-C26) à partir de leurs précurseurs à chaîne courte, tandis que l'enzyme ELVOL6 forme des acides gras à chaîne courte (C12-C18) ^{16, 21}. La régulation à la baisse de l'expression des enzymes ELOVL3 et ELOVL6 par l'ARNsi a déplacé le profil global des acides gras vers les espèces à chaîne courte et a diminué la proportion relative d'espèces à longue chaîne dans plusieurs classes de lipides ¹⁶.

De plus, ABHD5/CGI-58 est une protéine impliquée dans la régulation d'une lipase épidermique spécifique qui libère l'acide linoléique à partir d'un pool de triglycérides enrichi en acide linoléique, le rendant disponible pour la transestérification (catalysée par l'enzyme PNLPA1) pour générer des acyl-céramides (ie EOS céramides) décisifs pour la formation de la barrière. La mutation du gène codant la protéine ABHD5/CGI-58 entraîne un syndrome de Chanarin-Dorfman, caractérisé par une peau sèche et squameuse à la naissance similaire à la dermatite atopique ²².

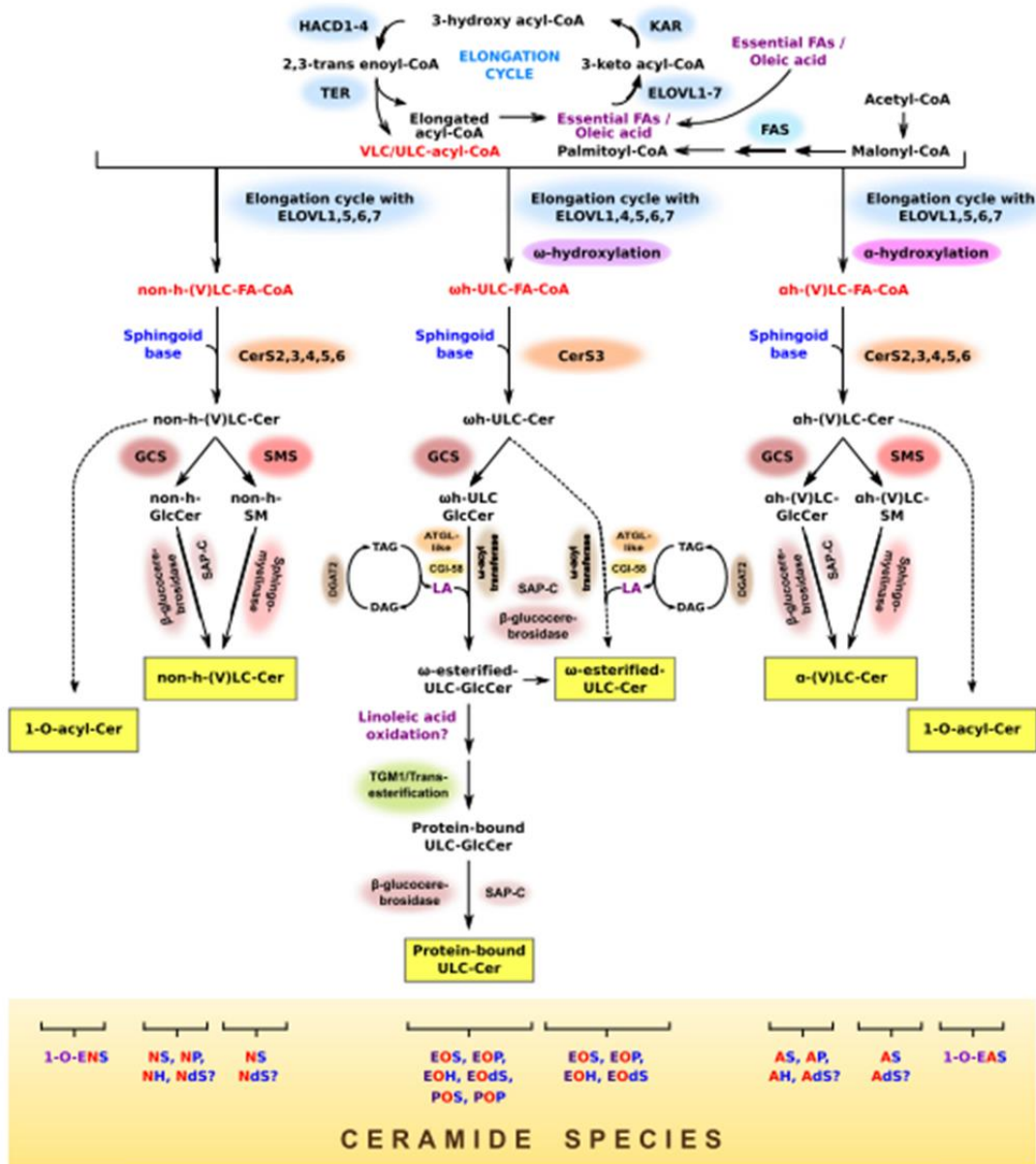


FIGURE 6-2 : Enzymes impliqués dans la biosynthèse des céramides épidermiques ²⁷. ATGL-Like (lipase qui libère l'acide linoléique à partir de triglycérides), CERS (synthèse des céramides); CGI-58 (comparative gene identification-58), DGAT2 (diacylglycérol acyltransférase 2), ELOVL : (élongation des chaînes des acides gras), FAS (synthèse d'acides gras), GCS (synthèse des glucosylcéramides), HACD1-4 (3-hydroxy acyl-CoA désaturase), 1-4; KAR (3-keto acyl-CoA réductase), SAP-C (saposin-C); SMS(synthèse de sphingomyélines), TER (2,3 trans enoyl-CoA réductase) TGM1(transglutaminase 1).

6.4- Modèles cellulaires 3D mimant l'épiderme atopique

Les modèles d'épiderme reconstruit humain *in vitro* constituent des outils précieux pour les études des aspects spécifiques de la physiopathologie épidermique, pour la recherche et les investigations mécanistiques de nouveaux agents thérapeutiques. Plusieurs progrès ont été réalisés afin de développer des modèles qui miment *in vitro* la physiologie de différentes maladies cutanées telles que l'atopie. Pour reproduire les caractéristiques de l'AD dans l'épiderme reconstruit, différentes stratégies ont été utilisées, la plus courante est l'induction d'un environnement inflammatoire ²³. La plupart de ces modèles sont des modèles « in house ». Cependant, il n'y a pas de preuves suffisantes que ces modèles soient adéquats pour répondre favorablement à des médicaments candidats.

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser des modèles de RHE altérés, développés et validés par le laboratoire StratiCELL[®]. L'étude de la morphologie cellulaire ainsi que l'analyse des protéines impliquées dans la manifestation de la peau atopique (telle que la filaggrine) ont prouvé la grande capacité de ces modèles à mimer la maladie d'atopie *in vitro* ².

Les traitements utilisés en général dans l'AD, sont des traitements à application locale et/ou systémiques. Les traitements visent à restaurer les défauts de la barrière épidermique et/ou réduire l'inflammation cutanée ⁷. La nouvelle molécule GW 3965 présente une activité anti inflammatoire. Les modèles de RHE altéré (StratiCELL[®]) ont servi pour évaluer l'efficacité de cette molécule. Cette dernière a réparé les altérations (morphologiques, protéiques et l'expression de gènes) dans le modèle RHE altéré pour atteindre un état comparable au RHE normal ^{2, 24}.

Par ailleurs, la molécule GW 3965 étant un agoniste du récepteur LXR (Liver X Receptor), elle est susceptible d'améliorer l'homéostasie de la fonction barrière en augmentant la synthèse du cholestérol, des acides gras et des céramides avec accélération de la formation des corps lamellaires et du processus de l'exocytose ²⁵. Le traitement de cultures cellulaires des kératinocytes humains par des activateurs du récepteur LXR induit une régulation positive des enzymes ELOVL 4 et ELOVL 7 et CERS3 ²⁶.

Dans ce chapitre, la méthode d'analyse développée précédemment a été appliquée aux modèles de RHE des laboratoires StratiCELL: RHE sain, RHE altéré ² et RHE altéré traité par la molécule GW3965. Cette étude a pour but d'évaluer l'impact des cytokines Th2 sur les lipides du modèle RHE altéré par rapport au RHE sain, centrée sur les sous-classes Cer [NS] et Cer [EOS] dont la variation dans le cas de l'atopie est la plus référencée dans la littérature. De plus, l'efficacité la molécule GW3965 vis à vis des lipides perturbés a été investiguée. Cette étude est présentée dans l'article 5.

Références associées à l'étude bibliographique sur la dermatite atopique

1. Bieber, T.; D'Erme, A. M.; Akdis, C. A.; Traidl-Hoffmann, C.; Lauener, R.; Schappi, G.; Schmid-Grendelmeier, P., Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *The Journal of allergy and clinical immunology* **2017**, *139* (4S), S58-S64.
2. Hubaux, R.; Bastin, C.; Salmon, M., On the relevance of an in vitro reconstructed human epidermis model for drug screening in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* **2018**, *27* (12), 1403-1407.
3. Ishikawa, J.; Narita, H.; Kondo, N.; Hotta, M.; Takagi, Y.; Masukawa, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Koyano, S.; Yamazaki, S.; Hatamochi, A., Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* **2010**, *130* (10), 2511-4.
4. Janssens, M.; van Smeden, J.; Puppels, G. J.; Lavrijsen, A. P.; Caspers, P. J.; Bouwstra, J. A., Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with atopic eczema. *The British journal of dermatology* **2014**, *170* (6), 1248-55.
5. Verzeaux, L.; Vyumvuhore, R.; Boudier, D.; Le Guillou, M.; Bordes, S.; Essendoubi, M.; Manfait, M.; Closs, B., Atopic skin: In vivo Raman identification of global molecular signature, a comparative study with healthy skin. *Exp Dermatol* **2017**, *27* (4), 403-408.
6. van Smeden, J.; Bouwstra, J. A., Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current problems in dermatology* **2016**, *49*, 8-26.
7. De Vuyst, E.; Salmon, M.; Evrard, C.; Lambert de Rouvroit, C.; Poumay, Y., Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Frontiers in medicine* **2017**, *4*, 119.
8. Cork, M. J.; Robinson, D. A.; Vasilopoulos, Y.; Ferguson, A.; Moustafa, M.; MacGowan, A.; Duff, G. W.; Ward, S. J.; Tazi-Ahnini, R., New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *The Journal of allergy and clinical immunology* **2006**, *118* (1), 3-21; quiz 22-3.
9. Kuchler, S.; Henkes, D.; Eckl, K. M.; Ackermann, K.; Plendl, J.; Korting, H. C.; Hennies, H. C.; Schafer-Korting, M., Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **2011**, *39* (5), 471-80.
10. Kezic, S.; O'Regan, G. M.; Lutter, R.; Jakasa, I.; Koster, E. S.; Saunders, S.; Caspers, P.; Kemperman, P. M.; Puppels, G. J.; Sandilands, A.; Chen, H.; Campbell, L. E.; Kroboth, K.; Watson, R.; Fallon, P. G.; McLean, W. H.; Irvine, A. D., Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* **2012**, *129* (4), 1031-9 e1.
11. Vavrova, K.; Henkes, D.; Struver, K.; Sochorova, M.; Skolova, B.; Witting, M. Y.; Friess, W.; Schreml, S.; Meier, R. J.; Schafer-Korting, M.; Fluhr, J. W.; Kuchler, S., Filaggrin deficiency leads to impaired lipid profile and altered acidification pathways in a 3D skin construct. *J Invest Dermatol* **2014**, *134* (3), 746-753.
12. Howell, M. D.; Kim, B. E.; Gao, P.; Grant, A. V.; Boguniewicz, M.; DeBenedetto, A.; Schneider, L.; Beck, L. A.; Barnes, K. C.; Leung, D. Y., Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* **2009**, *124* (3 Suppl 2), R7-R12.
13. Danso, M.; Boiten, W.; van Drongelen, V.; Gmelig Meijling, K.; Gooris, G.; El Ghalbzouri, A.; Absalah, S.; Vreeken, R.; Kezic, S.; van Smeden, J.; Lavrijsen, S.; Bouwstra, J., Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition. *J Dermatol Sci* **2017**, *88* (1), 57-66.

14. Sahle, F. F.; Gebre-Mariam, T.; Dobner, B.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H., Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin pharmacology and physiology* **2015**, *28* (1), 42-55.
15. van Smeden, J.; Janssens, M.; Kaye, E. C.; Caspers, P. J.; Lavrijsen, A. P.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp Dermatol* **2014**, *23* (1), 45-52.
16. Berdyshev, E.; Goleva, E.; Bronova, I.; Dyjack, N.; Rios, C.; Jung, J.; Taylor, P.; Jeong, M.; Hall, C. F.; Richers, B. N.; Norquest, K. A.; Zheng, T.; Seibold, M. A.; Leung, D. Y., Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI insight* **2018**, *3* (4).
17. Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* **1991**, *96* (4), 523-6.
18. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A., Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* **2012**, *53* (12), 2755-66.
19. Sawada, E.; Yoshida, N.; Sugiura, A.; Imokawa, G., Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: an implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* **2012**, *68* (1), 25-35.
20. Hatano, Y.; Terashi, H.; Arakawa, S.; Katagiri, K., Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* **2005**, *124* (4), 786-92.
21. Uchida, Y., The role of fatty acid elongation in epidermal structure and function. *Dermato-endocrinology* **2011**, *3* (2), 65-9.
22. Haemmerle, G.; Moustafa, T.; Woelkart, G.; Buttner, S.; Schmidt, A.; van de Weijer, T.; Hesselink, M.; Jaeger, D.; Kienesberger, P. C.; Zierler, K.; Schreiber, R.; Eichmann, T.; Kolb, D.; Kotzbeck, P.; Schweiger, M.; Kumari, M.; Eder, S.; Schoiswohl, G.; Wongsiriroj, N.; Pollak, N. M.; Radner, F. P.; Preiss-Landl, K.; Kolbe, T.; Rulicke, T.; Pieske, B.; Trauner, M.; Lass, A.; Zimmermann, R.; Hoefler, G.; Cinti, S.; Kershaw, E. E.; Schrauwen, P.; Madeo, F.; Mayer, B.; Zechner, R., ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nature medicine* **2011**, *17* (9), 1076-85.
23. Huet, F.; Severino-Freire, M.; Cheret, J.; Gouin, O.; Praneuf, J.; Pierre, O.; Misery, L.; Le Gall-Ianotto, C., Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *J Dermatol Sci* **2018**, *89* (3), 213-218.
24. Fowler, A. J.; Sheu, M. Y.; Schmuth, M.; Kao, J.; Fluhr, J. W.; Rhein, L.; Collins, J. L.; Willson, T. M.; Mangelsdorf, D. J.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol* **2003**, *120* (2), 246-55.
25. Man, M. Q.; Choi, E. H.; Schmuth, M.; Crumrine, D.; Uchida, Y.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Feingold, K. R., Basis for improved permeability barrier homeostasis induced by PPAR and LXR activators: liposensors stimulate lipid synthesis, lamellar body secretion, and post-secretory lipid processing. *J Invest Dermatol* **2006**, *126* (2), 386-92.
26. Mizutani, Y.; Sun, H.; Ohno, Y.; Sassa, T.; Wakashima, T.; Obara, M.; Yuyama, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Cooperative Synthesis of Ultra Long-Chain Fatty Acid and Ceramide during Keratinocyte
27. Rabionet, M., K. Gorgas, and R. Sandhoff, *Ceramide synthesis in the epidermis*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014. **1841**(3): p. 422-434

Th2 cytokines impact on ceramide sub-classes in Reconstructed Human Epidermis models.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli, Michel Salmon, Céline Lancelot, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli

À soumettre

Contexte : La maladie d'atopie est une maladie cutanée associée avec une inflammation chronique et une barrière cutanée perturbée. Le dysfonctionnement de la barrière est corrélé avec des anomalies au niveau des lipides comprenant une réduction de la teneur globale en lipides et des modifications au sein des sous-classes de céramides. Ces dernières années, plusieurs progrès ont été réalisés afin de développer des modèles de l'épiderme reconstruit qui miment des maladies cutanées telles que l'atopie. Dans cette étude nous sommes intéressés à comparer les modifications des lipides et particulièrement des sous-classes de céramides [NS] et [EOS] entre des modèles de RHE sain, altéré, et traité.

Méthodes : Dans ce travail, nous avons utilisé des modèles de RHE développés par les laboratoires StratiCELL: RHE sain, RHE altéré obtenu par ajout d'un cocktail de cytokines Th2 et RHE altéré et traité par ajout de la molécule GW3965. Les lipides de ces RHE ont été extraits, analysés et caractérisés en utilisant la méthode analytique développée en NP-HPLC/HR-MSⁿ.

Résultats : Nos résultats ont montré des modifications du profil lipidique de RHE altéré par comparaison avec le RHE sain. Ces modifications concernent la longueur de chaîne carbonée et son degré d'insaturation sur la partie « acide gras ». L'ajout de la molécule GW 3965 a conduit des modifications du profil lipidique par rapport au celui de RHE altéré mais la tendance de retour au RHE sain n'est pas démontrée certainement en lien avec un protocole plutôt adapté à l'étude de protéines.

Conclusion : Les modifications des sous-classes de céramides dans le RHE altéré sont comparables avec les données de la littérature sur les études des lipides de la peau atopique. Cette observation confirme la capacité de ces modèles à mimer les perturbations lipidiques proches de celles trouvées *in vivo*. Pour confirmer l'intérêt de ces modèles dans des méthodes alternatives aux tests sur animaux, il est nécessaire d'approfondir les protocoles d'études en lien avec la particularité de la biosynthèse lipidique et la fonction barrière cutanée. Bien que la molécule GW3965 a déjà montré son rôle au niveau de l'expression des gènes et de protéines, son intérêt vis à vis les lipides reste à confirmer.

Th2 cytokines impact on ceramide sub-classes in Reconstructed Human Epidermis models.

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Michel Salmon, Céline Lancelot, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli

Author(s):

- 1- Joudi Bakar : joudi.bakar@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 2- Rime Michael-Jubeli : **This author accept correspondance and proofs**, rime.michael-jubeli@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
Orcid ID : 0000-0002-2944-5295.
- 3- Michel Salmon: StratiCELL Laboratories, Research and Development, Isnes (Gembloux), Namur, Belgium. msalmon@Straticell.onmicrosoft.com
- 4- Céline Lancelot: StratiCELL Laboratories, Research and Development, Isnes (Gembloux), Namur, Belgium. clancelot@straticell.com
- 5- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.
- 6- Ali Tfayli : ali.tfayli@u-psud.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France.

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is associated with a chronic inflammation and an altered skin barrier. *Stratum Corneum* Lipids of AD patients known to differ substantially in composition from healthy subjects. Reconstructed Human Epidermis models have been developed *in vitro* in order to mimic the characteristics of atopic dermatitis. In this study, we are interested to compare the lipid profile modifications between healthy RHE, altered RHE using Th2 in order to mimic the AD and treated RHE with GW3965 after alteration to mimic AD. We are focusing particularly on the lipid profile of the ceramide subclasses [NS] and [EOS], which have been reported to be clearly modified in atopic skin. RHE lipids were extracted and analyzed using High Performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry. Lipid profile changes were observed in the altered RHE: i)- an increase in the ceramides [NS] which composed of an unsaturated fatty acid chain, ii) an increase in saturated ceramides [NS] presenting a small total carbon number (≤ 40 carbon atoms), whereas [NS] presenting a more important total carbon number (≥ 42 carbon atoms) were decreased, iii) a decrease in ceramides [EOS]. These results are in accordance with the lipid profile of human atopic skin. However, despite the ability of GW 3965 to restore proteins markers of the differentiation in the altered RHE, it is not able to limit Th2 induced effect in the levels of most ceramides except for unsaturated [NS]. Moreover, the *in vitro* models represent a useful tool for a better understanding of AD pathogenesis and for future screening of the new efficient treatments.

Key words: Reconstructed Human Epidermis, ceramide analysis, NP-LC/HR-MSⁿ, Atopic Dermatitis, GW 3965, Th2 cytokines.

Abbreviation

AD: Atopic Dermatitis

aSmase: acid-Sphingomyelinase

Cer: Ceramide

CERS3: Ceramide synthase 3

D: Maturation day

ELOVL: Elongase

FFAs: Free fatty acids

GBA: b-glucocerebrosidase

HR-MSⁿ: High Resolution Mass Spectrometry

NP-HPLC: Normal phase -High Performance Liquide Chromatography

RT: Retention Time

RHE: Reconstructed Human Epidermis

SCD: Stearoyl CoA Desaturase

Introduction

Atopic dermatitis (AD), also referred to as atopic eczema, is one of the most common chronic inflammatory skin diseases [1]. Patients with skin diseases such as AD have an impaired skin barrier function. Since a long time, several studies have reported that the reduced skin barrier function is associated with changes in the lipid composition which is characterized by decreased levels of ceramide and altered ceramide profiles [2], [3], [4], [5]. In addition, variations in FFAs chain length were also reported in AD. Recent reports have observed an increase in unsaturated FFAs levels including monounsaturated fatty acid species (MUFAs) in AD disease [6], [7]. Since FFAs participate in the formation of ceramides subclasses, it is important to investigate if also the ceramides subclasses composed of unsaturated FA were also increased in AD.

Since March 2013, it is no longer possible to carry out animal testing for cosmetics in the European Union. In this order different models of Reconstructed Human Epidermis (RHE) were developed to reproduce *in vitro* skin functions for research and evaluation purposes [8], [9]. In recent years, there has been significant attention regarding *in vitro* models reproducing important features of AD [1]. The mimic of AD conditions can be obtained *in vitro* by incubation with cocktails of interleukins overexpressed in the pathology or by silencing gene expression of components involved in development and structure of the barrier [10], [11], [12], [13]. In addition, keratinocytes, as well as other cells types isolated from AD patients, can also be used in these models [1]. The overexpression of Th2 cytokines are responsible of some deficiencies of atopic skin [14], they lead to reduce the expression of important proteins involved in the terminal differentiation of keratinocytes and the formation of cornified envelope in the *Stratum Corneum* such as filaggrin [14]. In addition, Th2 cytokines have been reported to affect the mRNA expression of enzymes involved in lipid biosynthesis [12], [13]. In human skin equivalent model cultured with IL-4, IL-13 and IL-31 in the culture medium, the expression of the lipid biosynthesis enzymes such as (SCD1, aSmase, ELOVL1, GBA, and CERS3) shown to be altered [12]. In a recent study, the primary human keratinocytes, differentiated in the presence of CaCl₂ and treated with IL-4/IL-13, it has been demonstrated that cytokines led to an increase in short-chain species (sphingoid bases N-acylated with C16–C20 fatty

acid) i.e. NS ceramides [13]. These results were correlated with another study in which the human keratinocytes treated with IL-4/IL-13 show a downregulation of ELOVL3/6 expression in differentiated keratinocytes [13]. ELOVL3, ELOVL6 account for the elongation of both saturated and monounsaturated VLCFA synthesis. ELVOL3 is responsible for the formation of long-chain (C18-C26) fatty acids from their short-chain precursors, while ELVOL6 forms short-chain fatty acids (C12-C18)[15] [13]. Downregulation of ELOVL3 and ELOVL6 expression by siRNA shifted the global fatty acid profile toward short-chain species and decreased the relative proportion of long-chain species in several lipid classes [13].

In addition, ABHD5/CGI-58 is a protein involved in the regulation of an epidermal-specific lipase that liberates linoleic acid from a pool of triglycerides that is enriched in linoleic acid, making it available for transesterification to generate acyl-ceramides (i.e. EOS ceramides) crucial to barrier formation. Mutation in the gene coding for ABHD5/CGI-58 results in Chanarin-Dorfman syndrome, characterized by dry scaly skin at birth similar to AD [16].

Epidermal lipid analysis is considerate one of the important elements in the research and diagnosis of skin diseases as well as the analysis of genes and proteins [17]. Thus we are interested in this study to compare the ceramide profiles between three types of RHE models (Straticell[®]): i) normal RHE, ii) altered RHE by incubation with Th2 cytokines in order to mimic of AD, and iii) treated RHE model with GW3965 after alteration with Th2 cytokines. RHE lipids were extracted and analyzed using High Performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (HPLC/HR-MSⁿ).

In this work, the alteration was induced by adding Th2 cytokines into the RHE culture medium. Thus, we are focusing to compare especially ceramides [NS] and [EOS] which have been reported to be clearly modified in atopic dermatitis [18], [19] focusing on the fine structure of these ceramides including the total number of carbons, the chain length and the unsaturation on its fatty acid moiety. Thus, we investigated the ability of altered RHE to reproduce a lipid profile comparable to that obtained from human atopic skin. We evaluated the useful of these models as an alternative *in vitro* models to a better understanding AD pathogenesis and to screen new treatment in this field.

Materials and methods

Chemicals

Solvents for extraction and for normal phase liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (NP-LC/HR-MSⁿ) of HPLC grade and the internal standard (1-Eicosanol), were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Artificial Skin samples

- **Normal Reconstructed Human Epidermis models (RHE) “StratiCELL®”**: are three dimensional models of normal human epidermal keratinocytes. The tissues are seeded on polycarbonate filters, grown at the air-liquid interface with an appropriate cell culture medium, free of animal serum.
- **Altered RHE models “StratiCELL®”**: in order to reproduce the morphological and functional aspects of AD, the RHE models were incubated with a cocktail of Th2 cytokines (IL-4, IL-13, and IL-25) at D14 until D16 of keratinocytes maturation day [20].
- **Treated RHE “StratiCELL®”**: in this model the RHEs were incubated with a cocktail of Th2 cytokines (IL-4, IL-13, and IL-25) at D14 then the molecule GW3965 (10 μ M) was added. GW3965 is one of LXR activators, it is known as a novel molecule for topical therapy for AD [20].

All these models were developed by StratiCELL laboratory (Belgium). A triplicate of each (RHE) conditions were received at D16 of keratinocytes maturation. In addition, for the healthy RHE another triplicate samples were also received at D14.

Validation method of RHE tissue

For all RHE samples and each condition, morphological study, measurement of the gene expression levels and protein content associated with AD were done by StratiCELL laboratory (Belgium) as described in details in their latest work [20].

Lipid extraction procedure

Total lipids of RHE cultures were extracted by the modified method of Folch [21, 22] and Bligh and Dyer [23]. The epidermis was cutted using a scalpel and placed into a 300 μ L of trypsin-EDTA solution and

incubated for 2 min at 37 °C. A 500 µL of PBS was added. The whole mixture was centrifuged at 1200 rpm for 5 min at 20°C in order to eliminate the trypsin and PBS solution. Then a 1mL of distilled water was added and mixed for 30 minutes at room temperature using a magnetic agitator. The internal standard (25 µL of Eicosanol solution at 0.3 mg / mL of chloroform) was added. A 4 mL of Folch mixture (chloroform: methanol 2:1) were added and vortexed for 2 minutes. The agitation of the whole volume was done at room temperature during 15 min in the dark. Centrifugation at 1000 g (2500 rpm) for 10 minutes at 20 ° C was done. Recovery for the organic phase was achieved. Two milliliters of chloroform was added on the aqueous phase (H₂O + methanol + RHE) as a washing phase and the whole mixture was vortexed and centrifuged for 10 min at 2500 rpm and at 20 °C. The organic phase was collected and evaporated under a stream of nitrogen until dryness. The lipid residue was taken up with 100 µL of chloroform.

Instrumentation and analytical method NP-LC/HR-MSⁿ for biomarkers analysis

The analysis of the extracted lipids was done by HPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). Separation of lipids occurred in NPLC using (PVA)-Sil column (PVA-bonded column; 5 µm particle size, 150 × 4.6 mm) purchased from YMC (Kyoto, Japan). A solvent gradient of Heptane/ethyl acetate (99.8: 0.2 v/v) (Solvent A), acetone and ethyl acetate (2: 1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v) (Solvent B) and 2-propanol/ water (85:15v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v) (solvent C) were used. A flow rate of 1 mL/min was done. The injected volume was 10 µL. Detection was performed using two detectors simultaneously: a Corona CAD® and a hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) source. APPI positive ion mode was used to analysis the extracted lipids. The mass scan range was 220-1800 atomic mass units (amu). A full scan detection mode and fragmentation was performed by the orbital trap at a resolution of 100 000. The analytical conditions were detailed in a previous work [24].

Results

Validation of the RHE samples

For each RHE condition (healthy, altered and treated), a morphological study and measurement of the genes expression levels and proteins content associated with AD were done [20]. First, the RHE models have been compared at two days of differentiation. The healthy RHE (control) at D14 of differentiation seems to be less satisfied compared to that at D16. The protein content and gene expression levels at D14 were lower than that at D16 (figure 2). Then, we compared the three studied models healthy, altered and treated RHE at D16. The results obtained after 48h of RHE exposure to Th2 cytokines confirm a morphological change in RHE tissues compared to the control (figure 1). This observation was confirmed by the levels of proteins that involved in the terminal differentiation such as (filaggrin, and loricrin) which were reduced after Th2 cytokines incubation. In addition, the expression levels of two genes ABCA1 (mediates cholesterol efflux from cells) and ABCA12 (facilitates the delivery of lipids to lamellar bodies in keratinocytes) were also reduced [20]. However, the expression level of CA2 gene which involved in the cellular pH, water transport, and ion homeostasis [25] was increased after Th2 cytokines incubation (figure 2). The novel molecule for AD topical therapy, GW3965, was able to restore the altered RHE to the near-normal state (healthy RHE). This observation was confirmed in both morphological aspects, proteins content and gene expression levels with the exception of CA2 gene expression, which was slightly increased following the addition of GW3965 (figures1 and 2).

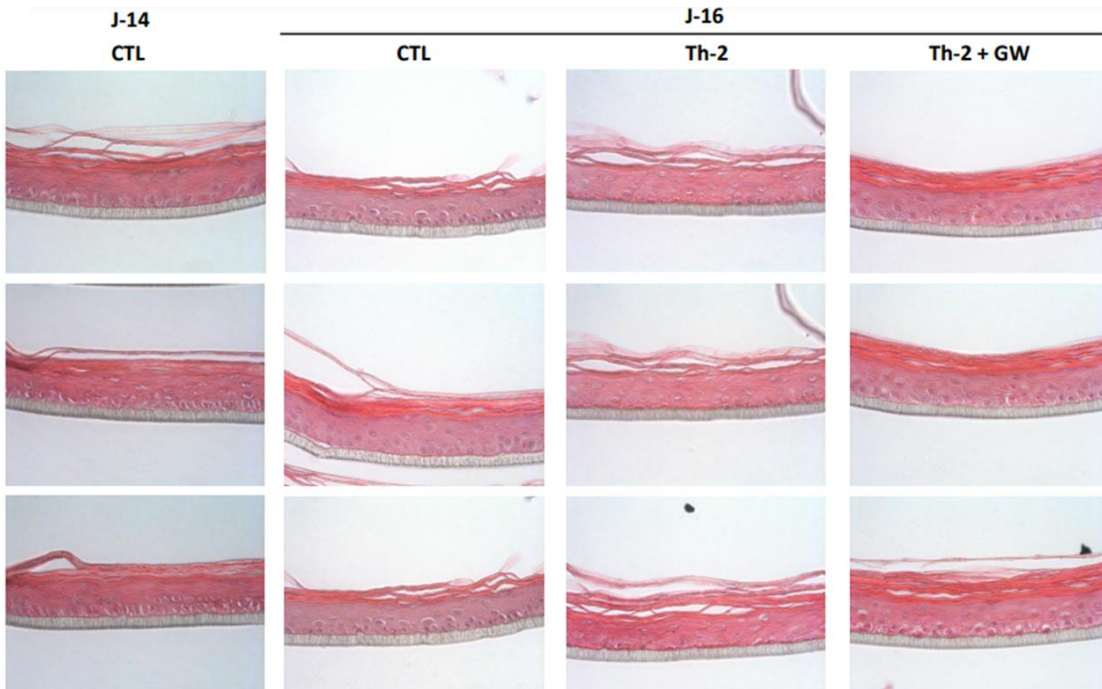


Figure 1: Histology and immunofluorescence staining of RHE tissues. Column 1: healthy RHE (control) at day 14 of maturation. Column 2: healthy RHE (control) at day 16 of maturation. Column 3: altered RHE, obtained after 48 h exposure to Th2 cytokines. Column 4: treated RHE, obtained after 48 h exposure to Th2 cytokines and in the presence of the LXR agonist GW3965. CTL = control, J= maturation day.

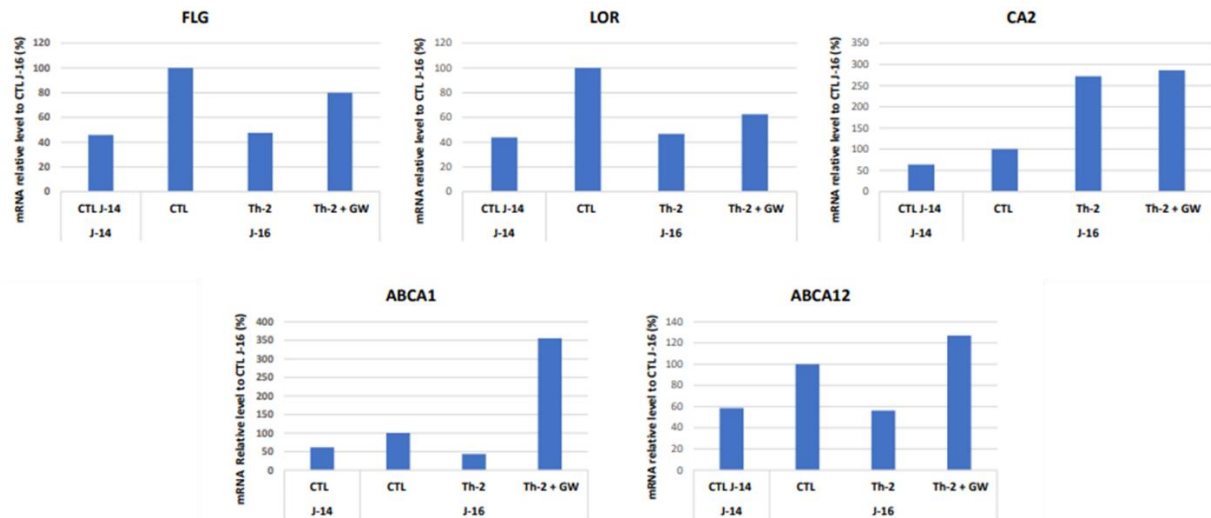


Figure 2: qPCR analysis of mRNA expression. The protein levels involved in the terminal differentiation (Filaggrin (FLG) and Loricrin (LOR)) and the expression of genes ABCA1 (mediates cholesterol efflux from cells), ABCA12 (facilitates the delivery of lipids to lamellar bodies in keratinocytes) and CA2: carbonic anhydrase II (metalloenzymes involved in the cellular pH, water transport, and ion homeostasis[25]) were compared between control (healthy RHE), after 48 h exposure to Th2 cytokines (altered RHE) and after 48 h exposure to Th2 cytokines and in the presence of the LXR agonist GW3965 (treated RHE). CTL = control, J=maturation day.

Lipid composition

For each RHE condition (healthy, altered and treated), the lipids of 3 samples (n = 3) were extracted and analyzed using NP-LC/ HR-MSⁿ. The lipid profile obtained was shown in (figure 3). The chromatographic zone between 16 and 29 min of RT covers all the ceramides subclasses, starting with the less polar ceramides (RT=16 min) towards the more polar ceramides (RT=29 min).

In this study, we are particularly interested in following the evolution of ceramide subclasses [NS] and [EOS], which are known to be disturbed in atopic skin. Figure 4 presents the chromatographic area corresponding to the [NS] ceramides between 21.9 and 23.2 min and to the [EOS] ceramides 21.5 and 22.2 min of RT.

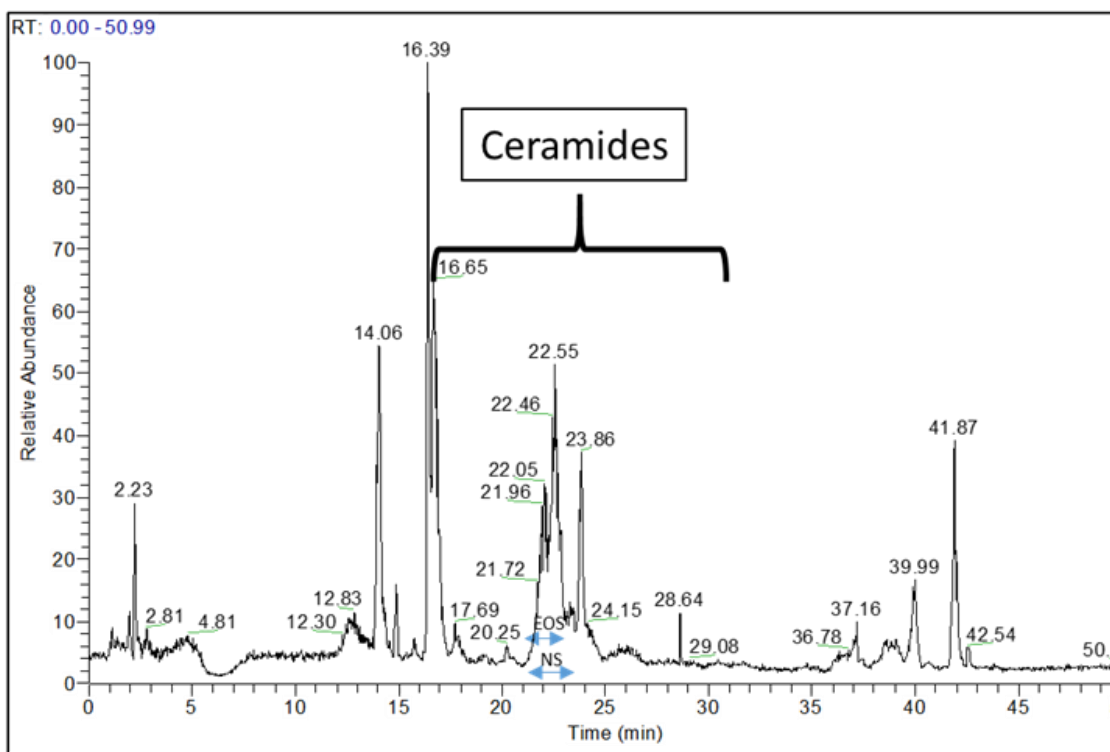


Figure 3: lipid chromatographic profile obtained for the healthy RHE (control) using NP-HPLC/ HR-MSⁿ, APPI+. The ceramides subclasses were eluted between RT (16-29) min.

RT: 20.67 - 23.62

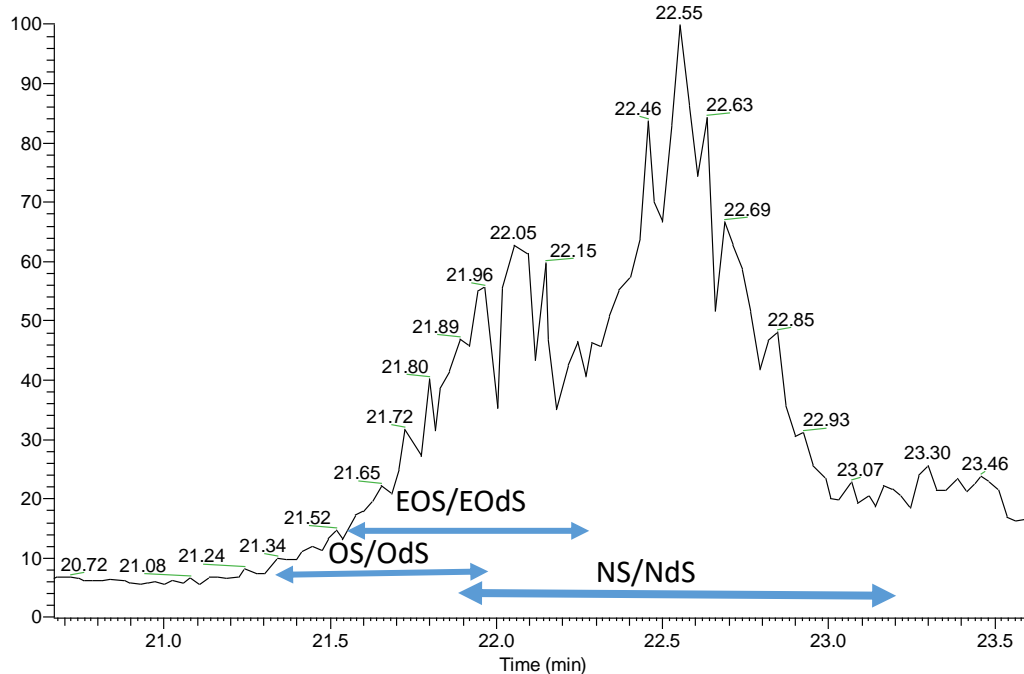


Figure 4: the chromatographic area between 21.3 and 23.2 min of RT. The ceramides subclasses of this zone are well identified including the ceramides [NS] and [EOS].

In order to characterize the fine structure of these lipids, all detected ceramides in this chromatographic area (RT=21.3-23.2 min) were studied using the identification and characterization method previously developed by our group [24]. As shown in (Figure 5), a high number of ceramide molecules was detected in RHE samples. For each one, the chemical formula of the $[M+H-H_2O]^+$ ion, the retention time (RT) and the intensity were determined (Table1). In addition, based on MSⁿ fragmentation method, the identification of each compound was performed as shown in Table (1).

Thus, within the RT area between 21.3-23.2 min, we identified the most intense molecules of ceramides, which represents 42 ceramides. These molecules present a total carbon number between C36-C74 with saturated or unsaturated fatty acid moiety, and they are divided into 6 ceramides subclasses: [NS], [NdS], [OS], [OdS], [EOS], [EOdS] (Table 1).

Table 1: in healthy RHE models (control), for each ceramide: the detected parent ion (m/z) (column 1), the chemical formula of [M+H-H₂O]⁺ ion (column 2), the RT(column 3), the intensity (column 4) and the identified ceramide subclass, the total carbon number and the degree of insaturation (column 5) were determined. For example: NS (52:2): ceramide NS with total carbon number: 52 and double insaturation on its fatty acid moiety.

m/z	Chemical Formula of [M+H-H ₂ O] ⁺	RT	Intensity	Identified Ceramide subclasses
548.54	C36 H70 O2 N	23.19	1.05 x10 ⁷	NS (36:0)
576.57	C38 H74 O2 N	23.07	1.05 x10 ⁷	NS (38:0)
604.6	C40 H78 O2 N	22.85	3.34 x10 ⁷	NS (40:0)
630.62	C42 H80 O2 N	22.85	1.78 x10 ⁷	NS (42:1)
632.63	C42 H82 O2 N	22.69	6.69 x10 ⁷	NS (42:0)
658.65	C44 H84 O2 N	22.69	1.36 x10 ⁷	NS (44:01)
660.66	C44 H86 O2 N	22.55	8.52 x10 ⁷	NS (44:0)
686.68	C46 H88 O2 N	22.55	1.07 x10 ⁷	NdS (46:2) / NS(46:1)
688.69	C46 H90 O2 N	22.37	2.83 x10 ⁷	NS (46:0)
714.71	C48 H92 O2 N	22.46	9.79 x10 ⁷	NdS (48:2) / NS (48:1)
716.73	C48 H94 O2 N	22.24	1.36 x10 ⁷	NdS (48:1) / NS (48:0)
740.73	C50 H94 O2 N	22.05	3.05 x10 ⁵	NS (50 :2)
742.74	C50 H96 O2 N	22.29	5.22 x10 ⁶	NdS (50:2)/ NS (50 :1)
744.76	C50 H98 O2 N	22.1	4.90 x10 ⁶	NdS (50:1) / NS (50:0)
756.72	C50 H94 O3 N	21.94	1.36 x10 ⁵	OS (50:2)
758.74	C50 H96 O3 N	22.05	2.35 x10 ⁶	OdS (50:2) / OS (50:1)
760.75	C50 H98 O3 N	21.89	3.82 x10 ⁵	OdS (50:1) / OS (50:0)
762.77	C50 H100 O3 N	22.02	5.23 x10 ⁵	OdS (50:0)
768.76	C52 H98 O2 N	22.29	2.64 x10 ⁵	NS (52:2)
770.77	C52 H100 O2 N	22.15	3.72 x10 ⁶	NdS (52:2) / NS (52:1)
772.79	C52 H102 O2 N	21.96	1.07 x10 ⁶	NdS (52:1) / NS (52:0)
784.75	C52 H98 O3 N	21.96	1.60 x10 ⁵	OS (52:2)
786.77	C52 H100 O3 N	21.94	1.57 x10 ⁶	OdS (52:2)/ OS (52:1)
790.8	C52 H104 O3 N	21.86	2.24 x10 ⁵	OdS (52:0)
798.8	C54 H104 O2 N	22.05	1.01 x10 ⁶	NdS (54:2) / NS (54:1)
812.78	C54 H102 O3 N	21.89	5.99 x10 ⁴	OS (54:2)
814.8	C54 H104 O3 N	21.8	5.75 x10 ⁵	OdS (54:2) / OS (54:1)
842.83	C56 H108 O3 N	21.45	1.03 x10 ⁵	OdS (56:2) / OS(56:1)
844.85	C56 H110 O3 N	21.34	4.99 x10 ⁴	OdS (56:1) /OS (56:0)
940.9	C62 H118 O4 N	22.24	9.08 x10 ⁵	EOdS (62:0)
966.92	C64 H120 O4 N	22.22	2.24 x10 ⁶	EOdS (64:1) / EOS (64:0)
968.93	C64 H122 O4 N	22.15	5.26 x10 ⁶	EOdS (64:0)
992.93	C66 H122 O4 N	22.24	6.02 x10 ⁵	EOdS (66:2) / EOS (66:1)
994.95	C66 H124 O4 N	22.15	1.79 x10 ⁷	EOS (66:0)
996.96	C66 H126 O4 N	22.05	1.30 x10 ⁷	EOdS (66:0)
1020.96	C68 H126 O4 N	22.15	2.03 x10 ⁷	EOdS (68:2) / EOS (68:1)
1022.98	C68 H128 O4 N	22.05	2.93 x10 ⁷	EOS (68:0)
1025	C68 H130 O4 N	21.72	5.16 x10 ⁶	EOdS (68:0)
1051.01	C70 H132 O4 N	21.96	2.24 x10 ⁷	EOS (70:0)
1079.04	C72 H136 O4 N	21.8	7.74 x10 ⁶	EOS (72:0)
1105.06	C74 H138 O4 N	21.72	1.39 x10 ⁵	EOdS (74:2) / EOS (74 :1)
1107.08	C74 H140 O4 N	21.57	1.31 x10 ⁶	EOdS (74:1) / EOS (74:0)

Ceramide profile comparison between the RHE samples

In order to follow the change in ceramide profiles between the different RHE models (healthy, altered and treated), the ratio %“ceramide peak area / total ceramides peak area” was calculated for each ceramide eluted between 21.3 and 23.2 minutes. The ceramide peak areas were determined using the signal corresponding to m/z of the ion $[M+H-H_2O]^+$ of this ceramide. The results demonstrated that whatever the RHE model (healthy, altered and treated), there are two ceramides that are present in the all RHE models at higher quantities compared to the other ceramides. According to the (Table 1) we can observe that these two ceramides are NS (44:0) and NS (42:0) corresponding to ions at m/z 660.66 and m/z 632.63 respectively, their calculated ratio were about 8% and 10% respectively, while for others ceramides the ratios were less than 6% (figure 5). In general, the cartography of ceramide profiles intergroups seems to be not clearly modified between the different RHE conditions. However, the standard deviation calculated for (n=3) of healthy RHE (control) at D14 seems to be more important compared to that at D16.

To better understand how each of these ceramides evolves after 48h incubation with Th2 cytokines and in order to investigate if the GW 3965 treatment is able to restore the altered ceramides, we compared the average ratios of “ceramide peak area /total ceramides peak area” between the healthy, altered and treated RHE as shown in (figure 7). Results demonstrated several observations as cited below.

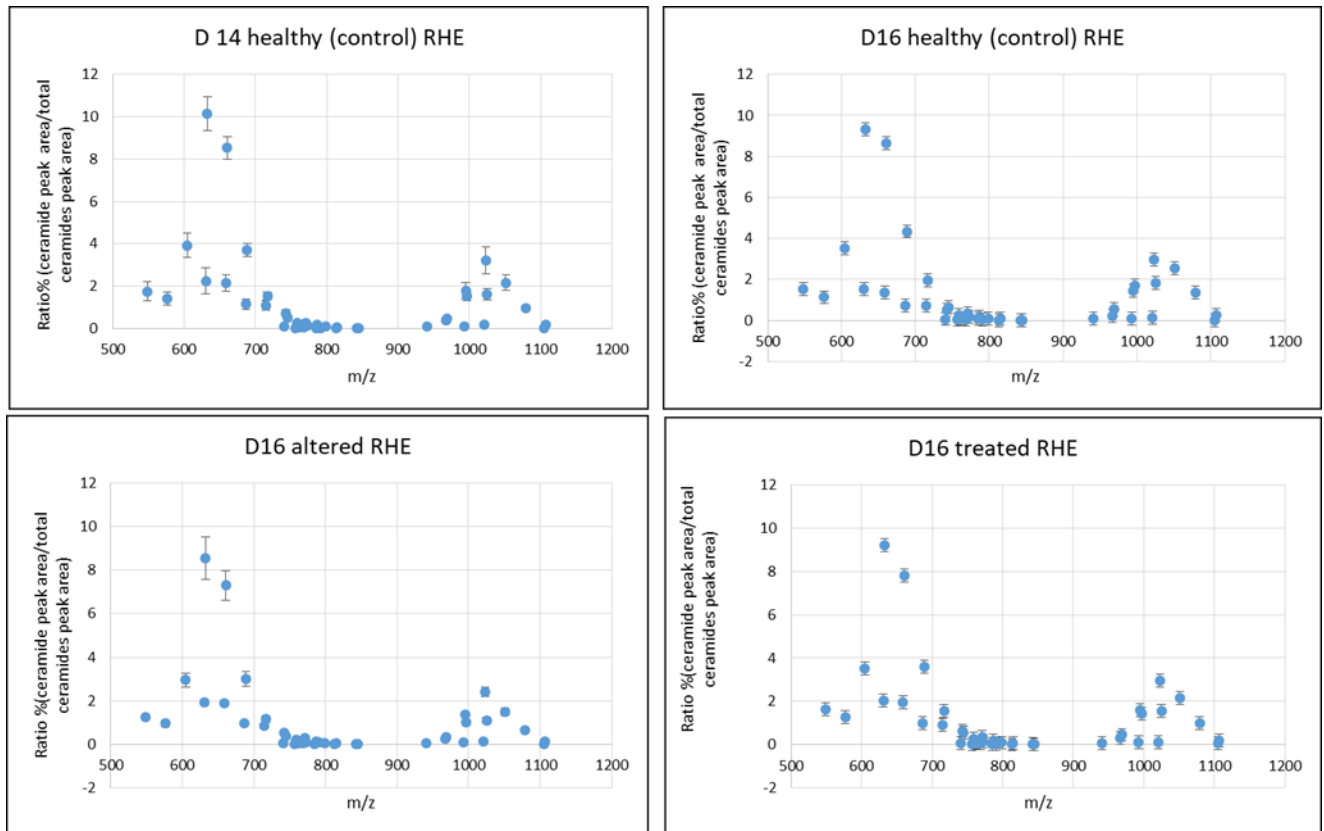


Figure 5: for each of RHE condition (healthy, altered and treated), the distribution of all m/z was determined. The average ratio% between: the peak area of each m/z and the total ceramides peak area was calculated. This ratio% reflects the abundance of each m/z in the RHE sample. The standard deviation was calculated for 3 samples of each condition ($n=3$).

The effect of Th2 cytokines on the lipid profile (healthy RHE/ altered RHE)

- 1- [NS] ceramides composed of a saturated fatty acid moiety and presenting a small total carbon number (≤ 40 carbon atoms) are increased, as the ceramides NS (36:0), NS (38:0) and NS (40:0). On the other hand, decreased levels were observed for saturated [NS] ceramides presenting an important total carbon number (≥ 42 carbon atoms): NS (42:0), NS (44:0), NS (46:0), NS (48:0), NS (50:0) and NS (52:0).
- 2- [NS/NdS] ceramides which have an unsaturation on their fatty acid moiety (mono or poly-unsaturations) as in the case of ceramides: NS (42:1), NS (44:1), NdS (46:2)/NS (46:1),

NdS(48:2)/(NS (48:1), NdS(50:2)/NS (50:1) ,NS (52:2), NdS(52:2)/NS (52:1) and NdS(54:2)/NS (54:1) seems to be increased in the presence of Th2 cytokines.

- 3- The esterified ceramides which have an ultra-long carbon chain such [EOS], [EOdS], are less abundant in the RHE samples compared to [NS] ceramide. The presence of Th2 cytokines induced a decrease in the esterified ceramides except for EOS (64:0) /EOdS (64:1) and EOS (66:0).
- 4- A significant decrease of ceramide OS (52:2) has been observed in altered RHE compared to healthy RHE (control).

The effect of the GW3965 on the lipid profile (altered RHE/ treated RHE)

- 1- Saturated [NS] ceramide subclass: despite the addition of the GW3965 treatment, the decrease of this subclass seems to be continued compared to that obtained in the presence of Th2 cytokines only. The impact of GW3965 is not enough to counteract the Th2 cytokine activity
- 2- Unsaturated [NS/NdS] ceramide subclasses: The presence of the GW3965 treatment induced a slightly decrease of these ceramides compared to that obtained in the presence of Th2 cytokines only.
- 3- [EOS/EOdS] ceramide subclasses: despite the addition of the GW3965 treatment, the decrease of these ceramides seems to continue compared to that obtained in the presence of Th2 only.

All these results are resumed in Figure 6, Figure 7 and Table 2.

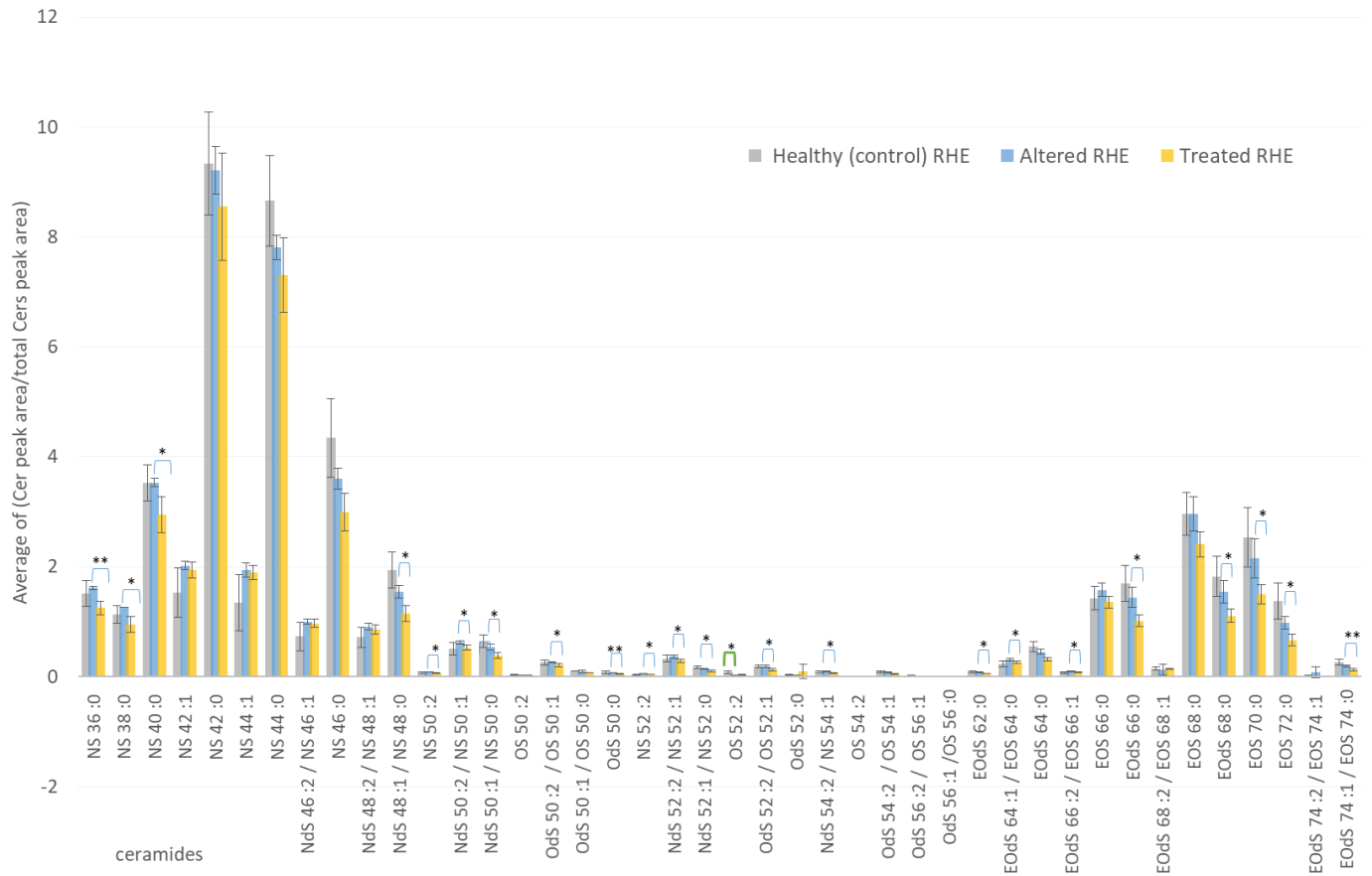


Figure 6: Evolution of each ceramides between the RHE models. The average ($n=3$) of ratio (ceramide peak area/total ceramides peak area) was calculated and compared between healthy RHE (control), altered RHE (after 48h exposure to Th2 cytokines) and treated RHE (altered after 48h exposure to Th2 cytokines and in the presence of the LXR agonist GW3965). The P value was calculated between (healthy RHE vs altered RHE) represented by a green arc, and between (altered RHE vs treated RHE) represented by a blue arc. *: P value <0.05, **: P value <0.01.

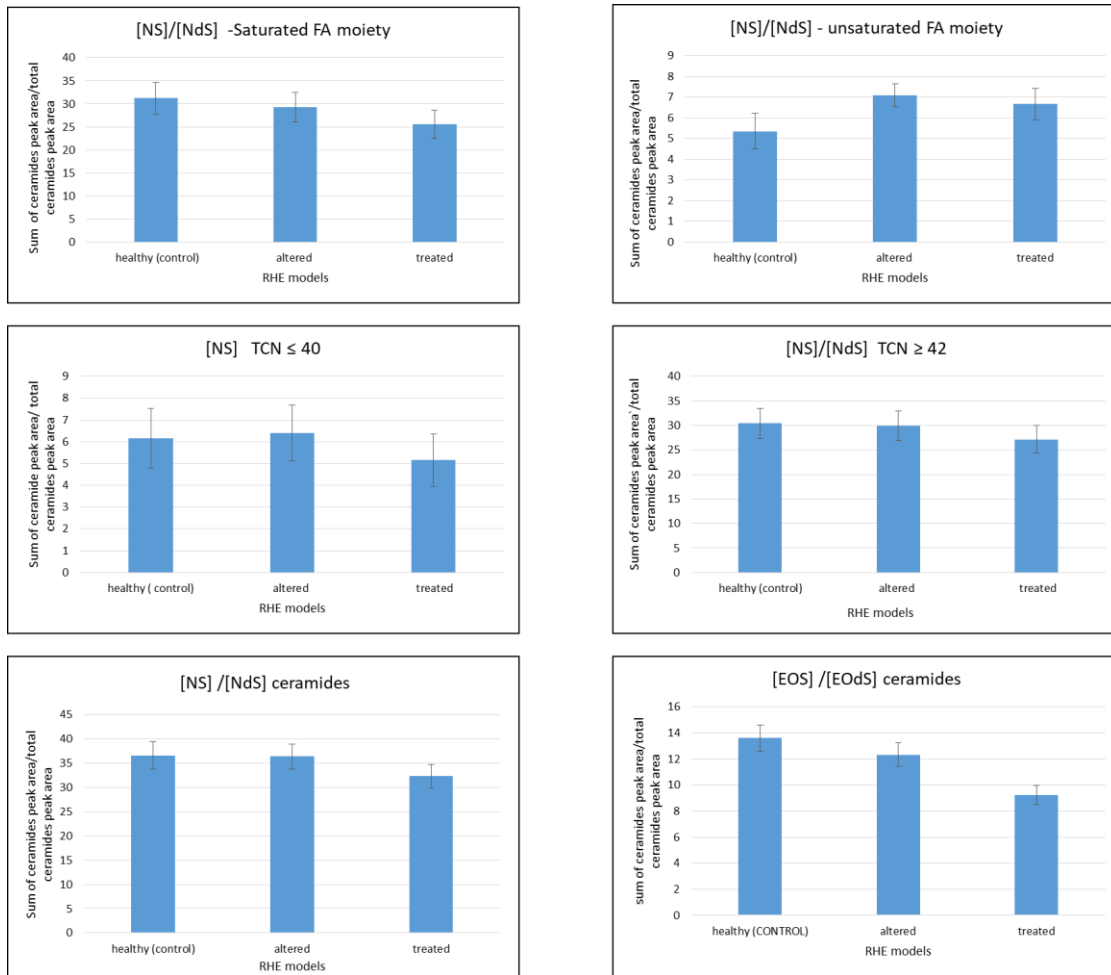


Figure 7: Evolution of [EOS]/[EOdS] and [NS]/[NdS] ceramides between the RHE models. The ratios (ceramide peak area/total ceramides peak area) were compared between healthy RHE (control), altered RHE and treated RHE. TCN: Total Carbon Number.

Table 2: overview on ceramide subclass modification between the healthy, altered and treated RHE. TCN*: Total Carbon Number, FA: fatty acid chain.

Ceramides subclass	Healthy RHE ⇒ Altered RHE	Altered RHE ⇒ Treated RHE
[NS]: TCN ≤ 40 saturated FA moiety	↑	↓
[NS and NdS]: TCN ≥ 42 saturated FA moiety	↓	↓↓
[NS and NdS]: TCN ≥ 42 Unsaturated FA moiety	↑	↓
[EOS-EOdS]	↓ (except for C(64:0) and C(66:0))	↓↓

Discussion

Atopic dermatitis is an inflammatory skin disease characterized by a broad spectrum of clinical manifestations. There is increasing evidence that the impaired skin barrier function is responsible for AD. Reconstructed Human Epidermis models (RHE) offer a new tool for investigation of therapeutic agents. In this study, we used a RHE *in vitro* models developed and validated by StratiCELL[®] laboratory (Isnes, Belgium) in order to evaluate the ceramide profile modifications between healthy (control), altered and treated RHE models. We focused particularly on the CER [NS] and [EOS] which are known to be altered in AD. Before lipid analysis, StratiCELL[®] laboratory has validated these RHE tissues by the histology and immunofluorescence staining of RHE and the mRNA expression of genes and proteins involved in AD as shown in (figure 1 and 2). Then the RHE lipids were extracted and analyzed using HPLC/HR-MSⁿ. It's important to note that the healthy RHE at D16 of keratinocytes maturation seems to be better than the control at D14. Indeed, the RHE control at D14 shows a slight desquamation in certain areas, and the expression of all genes and proteins was lower than that for D16. In addition, the analysis of lipid profiles showed a high standard deviation at D14, indicating that the lipid profiles were not yet stable at D14 compared to those at D16. Thus, we choose not to take into account this control at D14 in order to avoid generating errors during interpretation.

Lipid analysis results showed several modifications in ceramide profiles between the healthy, altered and treated RHEs at D16. Several observations can be discussed:

Th2 cytokine effect on carbon chain unsaturation

An increase in [NS/NdS] ceramides containing in their fatty acid chain one or two unsaturation(s) was observed in altered RHE (Figure 7). Bouwstra et al have demonstrated in a previously study a clearly increase of unsaturated FFAs in AD [7]. This observation may explain the increase of ceramide subclasses which have unsaturated fatty acid chain in altered RHE. This increase may be caused by an increase of stearoyl CoA desaturases (SCDs) activity under the effect Th2 cytokines, which involved in the synthesis of unsaturated fatty acids [6].

Th2 cytokines effect on carbon chain length

In [NS] ceramides that have a saturated FA chain, an increase in [NS] ceramides which have ≤ 40 carbon atoms was observed in altered RHE, in contrast [NS/NdS] ceramides ≥ 42 carbon was decreased under Th2 cytokines effect (Figure 7). These results were in concordance with that previously reported on human atopic skin in which the ceramides [NS] tended to be expressed in high or low levels according to their total carbon chain length [5], [13], [18]. In addition, esterified ceramides such as [EOS/EOdS], which present an ultra-long-chain on their fatty acid moiety, was decreased in altered RHE, except two molecules EOS (64:0), EOS (66:0). [EOS/EOdS] CER subclass plays a key role in skin barrier function. A decreased levels of these subclasses was also reported in human atopic skin [5].

The effect of GW 3965 on ceramide profile

GW 3965 is a LXR agonist, it's known as a novel molecule to treat the atopic disease. The morphological and the qPCR validation results obtained by StratiCELL laboratory confirm the ability of this molecule to restoring a similar model to healthy RHE (as shown in figures 1 and 2) [20]. In this study, after the addition of GW 3965 in culture medium of altered RHE, we expected to obtain also a lipid profile close to that obtained with the healthy RHE. However, compared to altered RHE, the addition of GW3965 induced an enhancement in the decrease of saturated [NS with $TCN \geq 42$] and [EOS/EOdS] ceramides. However, the GW3965 seems to induce a slightly decrease of unsaturated [NS/NdS] ceramides, which were increased after the addition of Th2 cytokines. Despite the potential role of LXR agonists to treat AD, and their clear role in improving the expression of proteins such as Filaggrin, Loricrin and ABCA1, their mechanisms of action within the epidermis are not yet fully understood [20]. It has been reported that the LXR is one of the key regulators of the epidermal lipid synthesis, it is mainly considered as intracellular cholesterol “sensor”. The function of LXR is to remove excess of cholesterol via ABCA1 receptor, the LXR activators can regulate the cholesterol and fatty acids metabolism [26], [27], [28]. The effect of GW3965, as a LXR activator, on the ceramide metabolism in epidermis was not fully investigated. In 2020, a recent study has demonstrated that the LXR agonist T0901317 induces a reduction in overall chain length. This observation may explain the enhancement decrease of ceramides [NS] and [NdS] presenting $TCN \geq 42$ and [EOS] and

[EOdS] after the addition of GW 3965. However, the light effect of GW3965 on unsaturated ceramides (which were increased after the addition of Th2 cytokines), may be due to the ability of LXR to activate the monounsaturated lipid synthesis via SCD1 and subsequently to increase the unsaturated ceramides [26]. Thus, we suppose that the GW3965 addition may prevent a strong decrease of unsaturated ceramides via SCD1. Moreover, in this study, the GW3965 was added in the RHE culture medium simultaneously with the Th2 cytokines. The Th2 cytokines effect could be more predominant compared to GW3965. We suggest a successive addition of the Th2 cytokines at first (at D14 for example) and then of GW3965 (at D16 for example). Thus, the lipids extraction could be realized 2 day after GW3965 application (at D18 for example). However, another theory could be tested, that the addition of GW3965 at earlier stage of epidermis maturation could have a positive impact since the first steps of lipid biosynthesis. This suggestion could be efficient to develop our approach in order to propose it as a performance tool for the proof of concept establishment in dermatological treatment field.

Conclusion

Since several years, it has been reported that there is a relationship between the disruption of the skin barrier and the inflammatory response. The overexpression of Th2 cytokines represent a key marker of atopic skin. According to the morphological, qPCR results (figure 1 and 2) and lipids analysis of altered RHE models, one can confirm that the addition of cocktails of Th2 cytokines induce a decrease in protein involved in terminal differentiation and lipid transport and it seems to induce an alteration in ceramides profile. This may result to the effect of Th2 cytokines on the expression of enzymes involved in lipid biosynthesis such as free fatty acids and ceramides [12]. In addition, the qPCR and morphological results obtained after the addition of GW3965 demonstrated its ability to restore the altered epidermis. In contrast this molecule induced an increase of the ceramides which contain unsaturation on their fatty acid moiety and a significant decrease on esterified ceramides which have a long carbon chain length. Based on these results, the optimization of treatment protocol using GW3965 seems to be envisaged in order to detect its potential effect on lipids. Given the usefulness of these in vitro RHE models, and our analytical method to screen therapeutic molecules effect on epidermis lipids, we suggest to test treatment able to reproduce a lipid profile comparable of

human normal skin in order to validate our approach. Thus, to propose an efficient proof of concept in dermatological treatment.

Acknowledgements

Financial support: The authors would like to thank the SILAB - Jean PAUFIQUE Corporate Foundation of the financial support for this work.

Compliance with ethical standards Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. De Vuyst, E., et al., *Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 119.
2. Imokawa, G., et al., *Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?* J Invest Dermatol, 1991. **96**(4): p. 523-6.
3. Luczaj, W., et al., *Lipidomic Analysis Reveals Specific Differences between Fibroblast and Keratinocyte Ceramide Profile of Patients with Psoriasis Vulgaris*. Molecules, 2020. **25**(3).
4. Choi, M.J. and H.I. Maibach, *Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin*. Am J Clin Dermatol, 2005. **6**(4): p. 215-23.
5. Ishikawa, J., et al., *Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(10): p. 2511-4.
6. Bhattacharya, N., et al., *Epidermal Lipids: Key Mediators of Atopic Dermatitis Pathogenesis*. Trends Mol Med, 2019. **25**(6): p. 551-562.
7. van Smeden, J., et al., *The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients*. Exp Dermatol, 2014. **23**(1): p. 45-52.
8. Pedrosa, T.D.N., et al., *A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing*. Toxicol In Vitro, 2017. **42**: p. 31-37.
9. Bataillon, M., et al., *Characterization of a New Reconstructed Full Thickness Skin Model, T-Skin, and its Application for Investigations of Anti-Aging Compounds*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
10. Sawada, E., et al., *Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: an implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 2012. **68**(1): p. 25-35.
11. Hatano, Y., et al., *Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(4): p. 786-92.
12. Danso, M., et al., *Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition*. J Dermatol Sci, 2017. **88**(1): p. 57-66.

13. Berdyshev, E., et al., *Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines*. JCI Insight, 2018. **3**(4).
14. Howell, M.D., et al., *Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(3 Suppl 2): p. R7-R12.
15. Uchida, Y., *The role of fatty acid elongation in epidermal structure and function*. Dermatoendocrinol, 2011. **3**(2): p. 65-9.
16. Haemmerle, G., et al., *ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1076-85.
17. Svoboda, M., et al., *Comparison of suction blistering and tape stripping for analysis of epidermal genes, proteins and lipids*. Arch Dermatol Res, 2017. **309**(9): p. 757-765.
18. van Smeden, J. and J.A. Bouwstra, *Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients*. Curr Probl Dermatol, 2016. **49**: p. 8-26.
19. Berkers, T., et al., *Topically Applied Ceramides Interact with the Stratum Corneum Lipid Matrix in Compromised Ex Vivo Skin*. Pharm Res, 2018. **35**(3): p. 48.
20. Hubaux, R., C. Bastin, and M. Salmon, *On the relevance of an in vitro reconstructed human epidermis model for drug screening in atopic dermatitis*. Experimental Dermatology, 2018. **27**(12): p. 1403-1407.
21. Folch, J., et al., *Preparation of lipide extracts from brain tissue*. J Biol Chem, 1951. **191**(2): p. 833-41.
22. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
23. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959. **37**(8): p. 911-917.
24. Assi, A., et al., *Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MS(n): 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass*. Anal Bioanal Chem, 2019.
25. Kamsteeg, M., et al., *Increased expression of carbonic anhydrase II (CA II) in lesional skin of atopic dermatitis: regulation by Th2 cytokines*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(7): p. 1786-9.
26. Helder, R.W.J., et al., *The effects of LXR agonist T0901317 and LXR antagonist GSK2033 on morphogenesis and lipid properties in full thickness skin models*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020. **1865**(2): p. 158546.
27. Viennois, E., et al., *Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health?* Mol Cell Endocrinol, 2012. **351**(2): p. 129-41.
28. Schmuth, M., et al., *Role of PPAR, LXR, and PXR in epidermal homeostasis and inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 463-73.

Conclusion générale

La structure de base d'un céramide résulte de la combinaison d'un acide gras avec une base sphingoïde par une liaison amide. La biosynthèse des céramides épidermiques se produit principalement dans le réticulum endoplasmique des kératinocytes de la couche granuleuse (SG). Puis au niveau de l'appareil de Golgi, ces céramides subissent des modifications pour former les glucosylcéramides et les sphingomyélines. À l'interface du SG et SC ces derniers vont régénérer les céramides lors de l'exocytose. Ces céramides libérés vont s'organiser sous forme de ciment lipidique intercornéocytaire dans le SC pour contribuer de manière essentielle à la fonction de la barrière cutanée. Ce phénomène évolutif de la morphologie et du contenu lipidique moléculaire des kératinocytes de la couche basale au *Stratum Corneum* se nomme la différenciation. Selon ce schéma, les céramides peuvent être considérés comme des marqueurs du SC tandis que les glucosylcéramides et les sphingomyélines comme des marqueurs du SG.

Pour étudier l'évolution des lipides au cours de la différenciation des kératinocytes, il est nécessaire de développer tout d'abord une méthode analytique séparative performante capable de fournir des informations très complètes à l'échelle moléculaire. Ces trois classes lipidiques présentent une grande microhétérogénéité structurale liée à la longueur de(s) chaînes alkyles, au nombre de fonctions hydroxyle, au degré d'insaturation et à l'isomérisation. Les glucosylcéramides et les sphingomyélines possèdent une unité céramide. Cependant, la polarité majeure des glucosylcéramides est portée par le résidu glucose et celle des sphingomyélines par le résidu de choline relié par une liaison phosphodiester. La polarité principale des céramides quant à elle est liée à celle de leur « tête polaire » caractérisée par un nombre de fonctions hydroxylées comprises entre 2 et 6. C'est l'origine principale de leur séparation analytique en chromatographie liquide de partage à polarité de phase normale (NP-HPLC), plus complexe pour les céramides qui sont élués sous forme de plusieurs massifs chromatographiques en fonction de leur « tête polaire » tandis que les glucosylcéramides et les sphingomyélines sont élués plus tardivement, chacune des classes sous forme d'un seul pic chromatographique. Tout le développement analytique en NP-HPLC a eu pour objectif de choisir la composition des phases mobiles et le profil d'un gradient d'éluion capables d'optimiser la séparation chromatographique des classes et sous-classes lipidiques d'intérêt. Une sélectivité globale de l'ensemble des molécules de chaque sous-classe lipidique est impossible à atteindre compte tenu du nombre considérable d'entités chimiques présentes. Par contre, le couplage du système chromatographique avec un spectromètre de masse à haute résolution HR-MSⁿ et un protocole élaboré de décodage des schémas de fragmentation a permis d'accéder sans ambiguïté à la caractérisation structurale

fine de chaque entité chimique présente dans chacune des trois classes lipidiques, et surtout dans chaque sous-classe de céramides dont l'importance est reconnue dans la qualité du ciment intercornéocytaire et la qualité de la barrière cutanée.

Les premiers développements analytiques ont été réalisés avec un nombre limité de substances de référence, toutes les entités chimiques d'intérêt ne pouvant être disponibles commercialement. Mais très vite, il est apparu indispensable de poursuivre les investigations avec des échantillons plus représentatifs de la micro-hétérogénéité naturelle de ces lipides. C'est une des raisons pour lesquelles nous nous sommes orientés sur des échantillons issus de cultures cellulaires.

Une deuxième approche analytique a résidé dans l'exploitation de la microspectroscopie Raman afin d'obtenir des informations complémentaires relatives à la localisation cellulaire des lipides au sein des kératinocytes, à la mise en évidence des différentes couches épidermiques et à l'organisation des lipides du ciment intercornéocytaire.

C'est l'utilisation conjointe de ces approches multiples qui nous a permis d'apporter une contribution à la connaissance de ces classes de lipides épidermiques si importants dans la mise en place de la fonction de la barrière cutanée.

La démarche du choix de la culture cellulaire n'a pas été seulement fondée sur l'intérêt d'utiliser des échantillons biologiques pour le développement analytique, mais aussi pour constituer un modèle de la différenciation des kératinocytes en vue d'une caractérisation étape par étape de la biosynthèse lipidique.

La culture en 2D de la lignée cellulaire HaCat a permis de suivre la différenciation dès les étapes précoces (dès la couche basale). Ce modèle a pu fournir des résultats préliminaires concernant les modifications biomoléculaires survenues au cours de la différenciation au niveau d'une cellule unique en utilisant la microspectroscopie Raman. Le suivi de la différenciation *in vitro* de ces cellules pour une durée importante (13 jours) a montré des modifications morphologiques accompagnées de modifications moléculaires importantes et surtout entre 9^{ème} et 13^{ème} jour. En utilisant la microspectroscopie Raman, nous avons observé en particulier une augmentation très forte et significative des taux de lipides et de kératines, une diminution de l'ADN survenue au 13^{ème} jour (liée à la perte du noyau des cornéocytes). De plus, les images spectrales en pseudo-couleurs ont permis de fournir des informations complémentaires sur la localisation et l'évolution des lipides et de l'ADN tout au long de la différenciation. Par ailleurs, l'analyse des biomarqueurs lipidiques en NP-HPLC-Corona et NP-HPLC/HR-MS a montré une diminution des ratios glucosylcéramides/céramides et sphingomyélines/céramides après le 9^{ème} jour. L'ensemble de ces résultats a pu confirmer le passage de ces cellules de la couche granuleuse (9^{ème} jour) vers la couche cornée (13^{ème}

jour). Malgré la capacité de ces cellules à se différencier sous l'effet d'un taux de calcium élevé, ces cellules ont montré leur limite à former un *Stratum Corneum* complètement stratifié contrairement à certains modèles en 3D.

Bien que les modèles en 3D soient coûteux, ils miment l'environnement biologique *in vivo* mieux que les modèles en 2D. La caractérisation approfondie des lipides a été réalisée sur des échantillons issus de culture en 3D d'épiderme humain reconstruit (RHE). L'analyse par MS/MSⁿ a permis de caractériser les structures fines des entités lipidiques et plus particulièrement de distinguer la micro-hétérogénéité structurale des différentes sous-classes de céramides. Grâce à une méthodologie élaborée d'identification, nous avons détecté dans le modèle RHE, deux nouvelles sous-classes de céramides doublement estérifiés (1-O-E (EO) Cer) et (A-1-O-E (EO) Cer). Il s'agit de céramides doublement estérifiés avec un acide gras supplémentaire lié à la base sphingoïde en position 1-O via une liaison ester. Cette partie acide gras supplémentaire est non hydroxylée dans la sous-classe (1-O-E (EO) Cer) tandis qu'elle est hydroxylée en position α dans la sous-classe (A-1-O-E (EO) Cer). Compte tenu de leur hydrophobicité importante, ces sous-classes sont susceptibles de jouer un rôle important dans la fonction de la barrière cutanée. L'analyse MS²/MS³ ciblée nous a permis de vérifier l'existence de ces deux sous-classes dans le SC humain.

Sur ces modèles RHE, un lien entre fonction barrière cutanée et structure/composition lipidique du *Stratum Corneum* a été établi en utilisant une approche multimodale qui offre des informations complémentaires. L'évolution temporelle de certains biomarqueurs lipidiques a été suivie tout au long de la différenciation (12-24 jours). Les résultats ont montré une augmentation de la quantité totale de céramides et une relation inverse entre les niveaux de céramides et de leurs précurseurs (glucosylcéramides et sphingomyélines) au cours du processus de différenciation. Un comportement différent entre plusieurs sous-classes de céramides est mis en évidence et dépend de l'étape de la différenciation. La génération des céramides les plus importants pour la fonction barrière (céramides estérifiés) a été suivie de près. Parallèlement, l'étude de la cinétique de pénétration de la caféine a montré la diminution progressive de cette dernière au cours du processus de différenciation attestant de la mise en place de la fonction barrière cutanée à partir du 15^{ème} jour. Les images Raman en profondeur ont mis en évidence un épaissement progressif global du RHE avec l'apparition du *Stratum Corneum*, accompagné d'une évolution de l'organisation lipidique. En groupant ces trois approches, nos données analytiques ont permis de déterminer 3 groupes de jours de maturation: avant le jour 15, entre les jours 15 et 19 et après le jour 19. Cette approche multimodale a pu confirmer que la fonction barrière du *Stratum Corneum* n'est pas seulement déterminée par sa formation et son épaisseur mais aussi par la composition de ses lipides intercornéocytaires et l'homogénéité de leur organisation. Ces éléments permettent aux chercheurs de déterminer la période de maturation qui correspond au ciblage de leur étude.

Enfin, nous avons appliqué les outils méthodologiques développés au cours de cette thèse sur un modèle RHE altéré (mimant l'atopie) pour mettre en exergue les perturbations de la biosynthèse des lipides épidermiques lors d'une maladie cutanée telle que la dermatite atopique

Le profil lipidique obtenu à partir de ces RHE altérés est comparable à celui trouvé dans la peau de patients souffrant de dermatite atopique: i) une augmentation des céramides [NS] qui ont une chaîne d'acide gras insaturée, ii) une augmentation des céramides saturés [NS] ≤ 40 atomes de carbone, alors que [NS] ≥ 42 atomes de carbone sont diminués, iii) une diminution de céramides [EOS].

De plus, nous avons testé l'effet d'une nouvelle molécule GW 3965 pour traiter l'atopie. Bien que cette molécule a montré son intérêt à restaurer l'expression des gènes et protéines d'une façon comparable au RHE normal, l'analyse du profil lipidique ne montre pas sa capacité à améliorer le taux des céramides perturbés.

Au final, quelques points essentiels à retenir à partir de cette thèse:

- La microspectroscopie Raman appliquée aux cultures cellulaires est une méthode de diagnostic très performante pour suivre les changements moléculaires d'une façon rapide et sans besoin de colorations.
- L'analyse des lipides extraits à partir du SC humain et des RHE confirme la pertinence de la méthode analytique NP-HPLC/HR-MSⁿ développée durant cette thèse à cartographier l'ensemble du lipidome épidermique et à caractériser les structures fines des lipides.
- La découverte de deux nouvelles sous-classes de céramides, potentiellement très impliquées dans la fonction de barrière cutanée, peut constituer une piste très intéressante pour les domaines de cosmétologie et de dermatologie.
- L'approche multimodale appliquée sur des RHE permettra aux chercheurs de déterminer la période de maturation qui correspond à leur objectif d'étude (études de cytotoxicité, de l'irritation cutanée, de corrosion, études impliquant la fonction barrière et étude de l'impact d'un principe actif sur une longue durée d'application).
- L'ensemble des approches développées durant cette thèse permet de vérifier l'aptitude des modèles cellulaires de RHE sains et/ou altérés à reproduire un profil lipidique comparable à celui trouvé *in vivo* pour confirmer leur intérêt dans des méthodes alternatives aux tests sur animaux.

Perspectives

La fonction de barrière cutanée située au niveau du SC est reliée à plusieurs paramètres parmi lesquels, la composition du ciment lipidique intercornéocytaire et l'organisation tridimensionnelle de ces lipides qui sont les résultats terminaux de la biosynthèse lipidique keratinocytaire.

La méthodologie analytique que nous avons développée, associant, sur modèles cellulaires en 3D, une caractérisation moléculaire approfondie des lipides épidermiques par NP-HPLC/HR-MSⁿ et une détermination de leur organisation spatiale par microspectroscopie Raman a montré son efficacité dans l'apport d'information au cours de la différenciation des kératinocytes.

Bien que durant cette thèse, les études ont été concentrées sur 3 classes lipidiques (céramides, glucosylcéramides et sphingomyélines), néanmoins la méthode analytique développée permet d'étudier simultanément l'ensemble du lipidome épidermique notamment les acides gras libres, le cholestérol et les triglycérides ; ce qui pourrait être un complément très intéressant pour étudier les interactions entre les classes et à des différentes étapes de la biosynthèse lipidique.

Après une connaissance approfondie de ce mélange très complexe acquise durant la thèse, nous possédons un recul scientifique suffisant pour se projeter dans une transposition de la méthode en Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance (UHPLC) et en évaluer les apports potentiels.

La caractérisation approfondie et fine de la matrice lipidique du SC est issue de l'exploitation d'un nombre très important de données analytiques générées lors de nos études sur un nombre limité d'échantillons. Afin de pouvoir exporter notre approche à des études sur une taille plus large de population et d'échantillons, il va être nécessaire de développer des approches chimiométriques de traitement de données plus élaborées. Ces traitements permettront de mettre en exergue les informations pertinentes et discriminantes entre les différentes populations étudiées et de déterminer par la suite des biomarqueurs lipidiques liés à des problématiques cutanées ciblées.

Nos perspectives sont orientées vers l'étude de modèles RHE altérés, simulant des perturbations lipidiques associées à une maladie cutanée. Nous avons initié ce type d'investigation à partir d'un modèle cellulaire en 3D altéré mimant l'épiderme atopique par ajout de cytokines Th2. Dans le but de mieux caractériser ce modèle RHE altéré, nous avons suivi la composition des lipides au sein de ce modèle pour le comparer avec

le modèle RHE sain. En parallèle de la composition fine en lipides établie en NP-HPLC/HR-MSⁿ, des altérations liées à l'organisation des lipides seront étudiées par microspectroscopie Raman qui permettra également de fournir des informations moléculaires pour la mise en place de descripteurs spectroscopiques liés à cette maladie. Par ailleurs, ce triptyque « modèles cellulaires en 3D / NP-HPLC/HR-MSⁿ / microspectroscopie Raman » apparaît tout à fait adapté à l'établissement de preuve de concept d'activité pour des molécules candidates pour corriger des déficiences de la barrière cutanée.

Suite aux premiers résultats que nous avons obtenus sur un modèle RHE altéré, nous avons compris l'importance d'optimiser le design des études, notamment le protocole d'introduction des molécules testées, afin d'aboutir à des conclusions sans ambiguïté sur leur mécanisme d'action et leur effet sur le profil lipidique épidermique.

Ainsi nous espérons apporter une contribution significative pour montrer l'intérêt de ces modèles en remplacement des tests sur animaux.

Présentation de la soutenance de thèse



université
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences Chimiques: Molécules,
Matériaux, Instrumentation
et Biosystèmes (2M10)

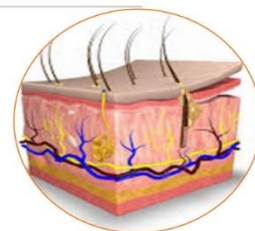


Etude de la biosynthèse lipidique au cours de la différenciation kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée

Thèse
présentée en vue de l'obtention du grade de
docteur de l'université Paris-Saclay
par

Joudi Bakar

Sous la direction :
Pr. Arlette Baillet-Guffroy (Directrice de thèse)
Dr. Rime Michael-Jubeli (Co-Directrice de thèse)



Université Paris-Saclay, Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. Le 22/04/2021

Sommaire



Introduction générale

Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

NP-HPLC/HR-MSⁿ

Spectroscopie Raman

Développement de méthodes
analytiques sur un modèle cellulaire
en 2D :
Lignée cellulaire (**HaCaT**).

Développement de méthodes
analytiques sur un modèle cellulaire
en 3D :
Épiderme Reconstitué Humain (**RHE**)

Application à l'analyse d'un modèle
de **RHE (atopique)**
Preuve de concept d'un actif
«correcteur»

Article 1

Biomolecular modifications during
the keratinocytes differentiation:
Raman spectroscopy and
chromatographic techniques

Article 2

Comprehensive characterization and
simultaneous analysis of overall
lipids in Reconstructed Human
Epidermis using NP/PLC/HR-MSⁿ: 1-O-
E (EO) Cer, a new ceramide subclass

Article 3

Stratum Corneum lipid profiles, in
vitro, ex vivo and in vivo:
Characterization of the α -hydroxy
double esterified ceramides

Article 4

Assessment of the skin barrier
function in Reconstructed Human
Epidermis using a multimodal
approach at molecular, tissue and
functional level

Article 5

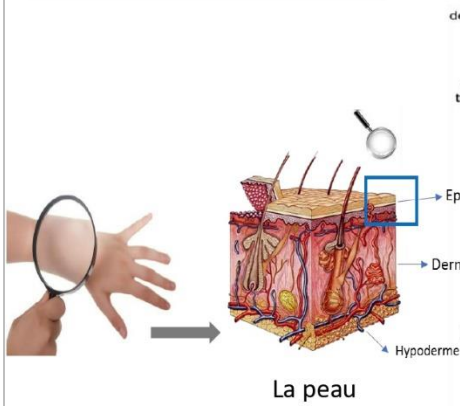
Th2 cytokines impact on ceramide
sub-classes in Reconstructed
Human Epidermis models

Introduction générale

Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

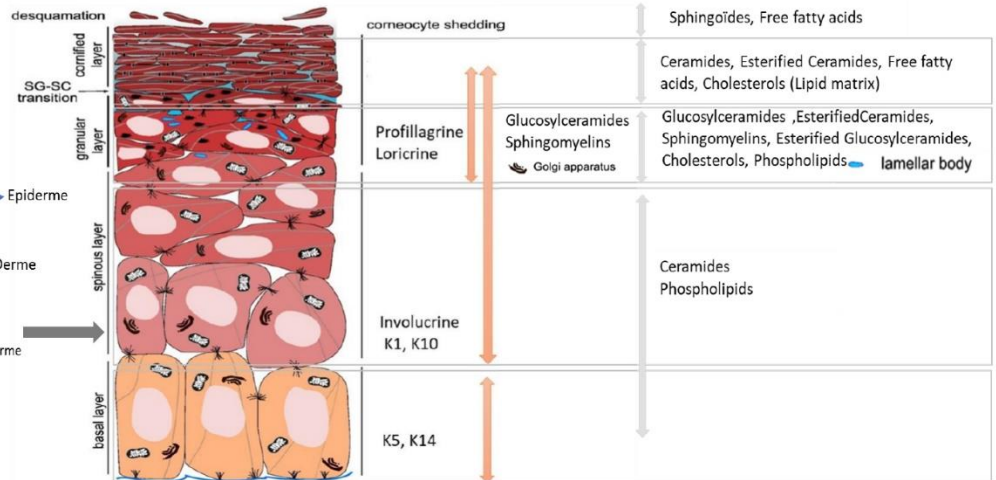
Structure de la peau humaine



Morphological biomarkers

Proteins biomarkers

Lipids biomarkers



- keratin
- lamellar body
- Golgi apparatus
- hemidesmosome
- mitochondrion
- desmosome
- basement membrane
- corneodesmosome
- tight junction

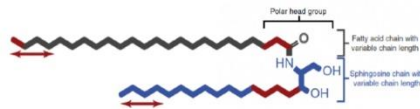
Figure reprise d'Eshkart et al, 2013 et modifiée

Introduction générale

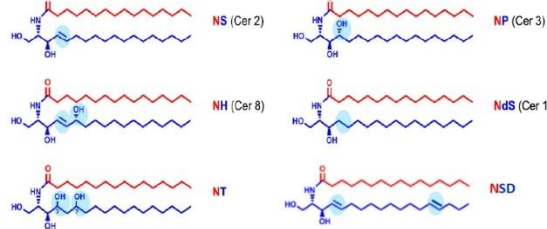
Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

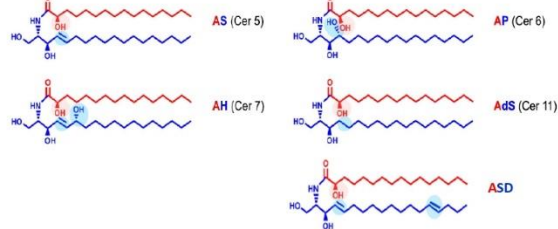
Les sous-classes de Céramides (micro-hétérogénéité)



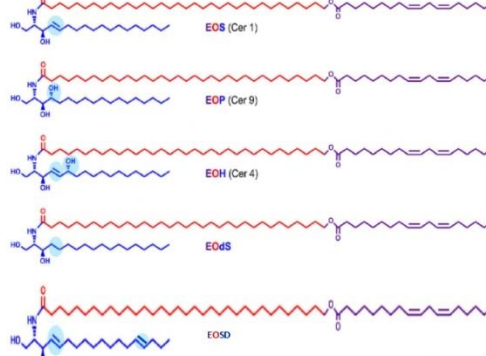
Non-Hydroxylated Ceramides



α-Hydroxylated Ceramides



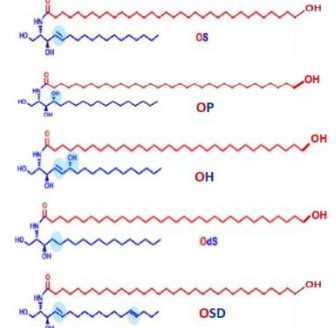
ω-Esterified Ceramides



1-O-Acyl Ceramides



ω-Hydroxylated Ceramides



- 1- Longueur de chaîne alkyle
- 2- Nombre de fonctions hydroxyle
- 3- Nombre d'insaturation
- 4- Isomérisation

Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. Bouwstra et al, 2012.

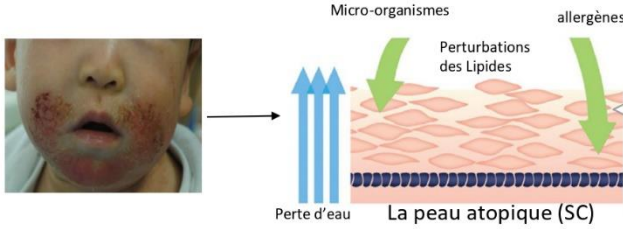
Ceramide synthesis in the epidermis. Rabionet et al, 2013. Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. Kawana et al 2020

Introduction générale

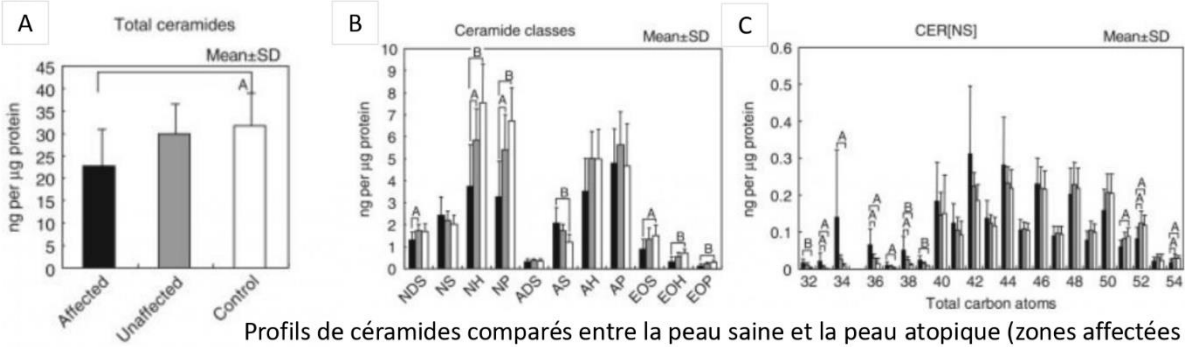
Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

Les perturbations des sous-classes céramidiques dans la peau atopique



- A) Diminution du taux total des céramides
- B) Perturbation selon les sous-classes céramidiques
- C) Perturbation selon la longueur de chaîne alkyle



Profils de céramides comparés entre la peau saine et la peau atopique (zones affectées et non-affectées)

Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. Ishikawa et al, 2010
Overview of atopic dermatitis. Kyu Han Kim 2013. <https://www.epiceramrx.com/patients.html>

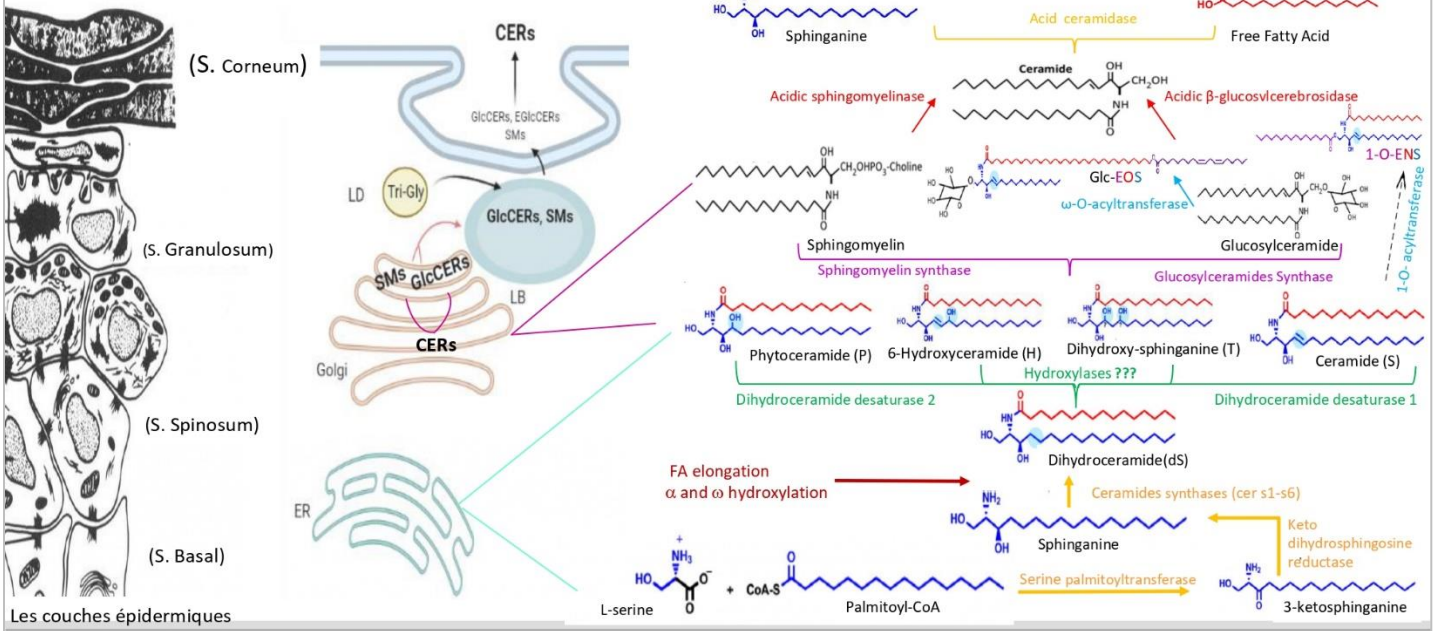
5

Introduction générale

Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

La biosynthèse des céramides épidermiques



Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation. Eckert et al, 1989
Ceramide synthesis in the epidermis. Rabionet et al, 2013

6

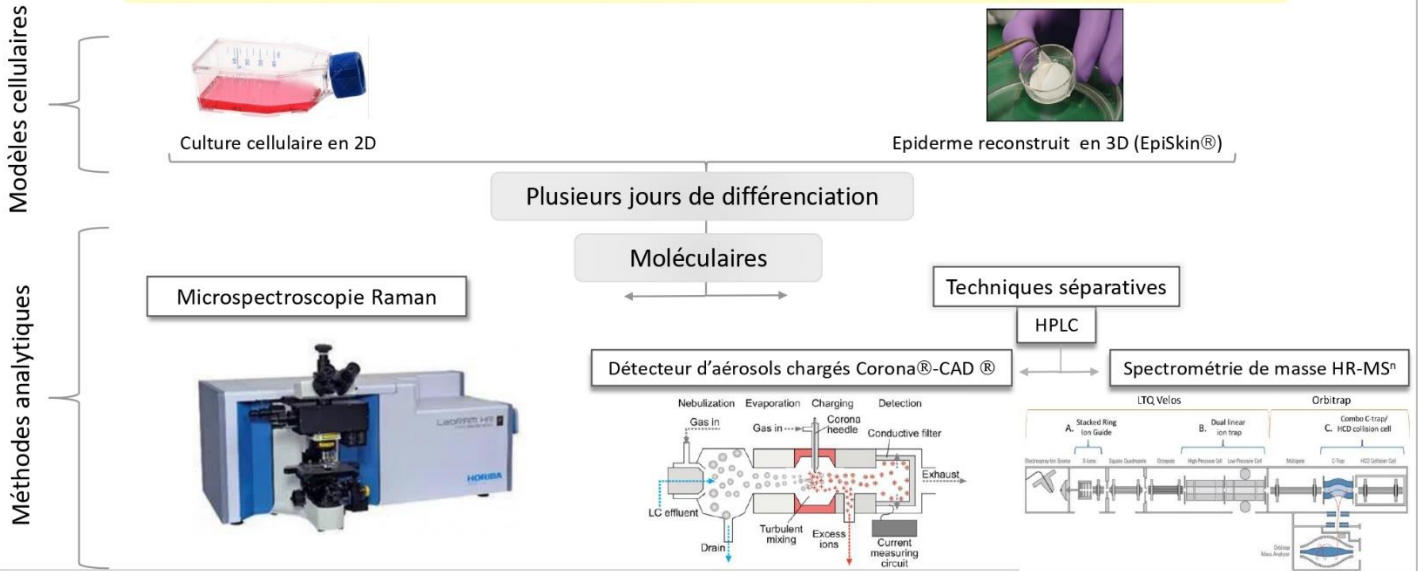
Introduction générale

Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

Objectif / méthodologies

Étude de l'évolution des lipides au cours des étapes successives de la différenciation des kératinocytes



<https://www.dreamstime.com/photos-images/tissue-culture-flask.html>, <https://www.medicaexpo.fr/prod/horiba-scientific/product-104260-678288.html>
 A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. Olsen et al, 2009, Aerosol-based detectors for liquid chromatography. Magnusson et al 2015

Introduction générale

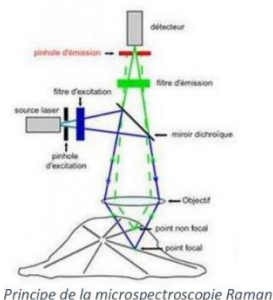
Travaux expérimentaux

Conclusion et perspectives

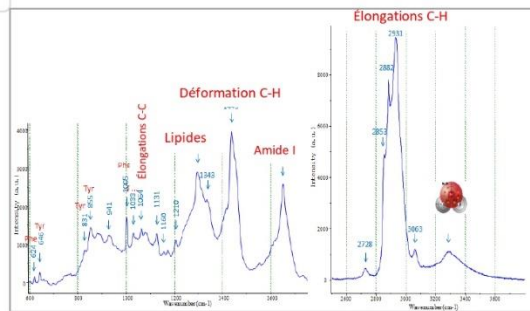
Méthodes d'analyse des lipides épidermiques

Descripteurs spectroscopiques

1- Analyse par spectroscopie vibrationnelle



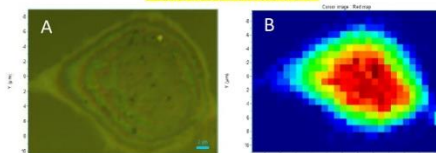
Principe de la microspectroscopie Raman



Spectre Raman d'un kératinocyte issu d'une culture cellulaire en 2D

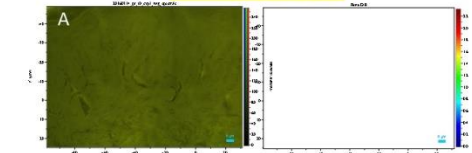
- $\nu(\text{CH}_2)$ asym / $\nu(\text{CH}_2)$ sym: 2882 cm^{-1} / 2853 cm^{-1}
 - Organisation des lipides
- Lipides/Protéines : $2800-2870 \text{ cm}^{-1}$ / $2900-2970 \text{ cm}^{-1}$
 - Descripteurs d'altération de la matrice lipidique (peau atopique)
 - Evolution et localisation des lipides
- ADN: $773-799 \text{ cm}^{-1}$
 - Stade de la différenciation
- Kératine: 960 cm^{-1}
 - Stade de la différenciation

Echelle cellulaire



A) Image de lumière blanche d'un kératinocyte
 B) Image spectrale en pseudo-couleurs d'un kératinocyte

Echelle tissulaire



A) Image de lumière blanche de la peau
 B) Image spectrale en pseudo-couleurs de la peau (rapport Lipides/Protéines)

- CLS fitting avec des spectres de référence
- Quantité relative et localisation des molécules
- Répartition des différentes couches au sein de l'épiderme.
- Mesure de l'épaisseur d'un échantillon

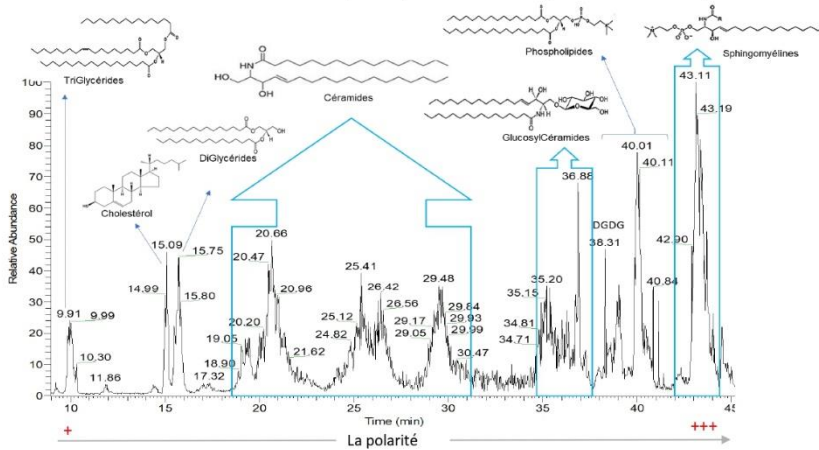
<https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-spectroscopie-raman-4159/>

Méthodes d'analyse des lipides épidermiques

2- Séparation chromatographique et caractérisation structurale des lipides épidermiques

Développer une méthode analytique capable de:

- Séparer en un seul run tous les lipides de l'épiderme avec une bonne sélectivité
- Caractériser les structure fines des lipides (la micro-hétérogénéité structurale)



Chromatogramme NP-LC/HR-MS obtenu en mode APPI+ en full scan de l'analyse d'un échantillon RHE à j 22 de maturation, couvrant l'ensemble des classes lipidiques de différentes polarités

Conditions chromatographiques

- Phase stationnaire :

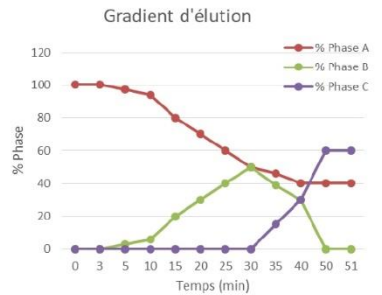
PolyVinyl Alcohol (5 µm, 150 x 4,6 mm)

- Phase mobile- Gradient d'éluion :

A : n-heptane : acétate d'éthyle (99,8: 0,2, v/v)

B : acétone : acétate d'éthyle (2:1, v/v) + acide acétique (0,02% (v/v))

C : 2-propanol : eau (85:15, v/v) + acide acétique 0,025% (v/v) + éthanolamine 0,025% (v/v)



9

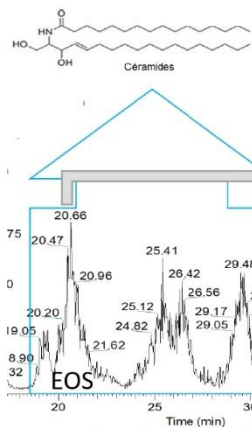
Article 2

Méthodes d'analyse des lipides épidermiques

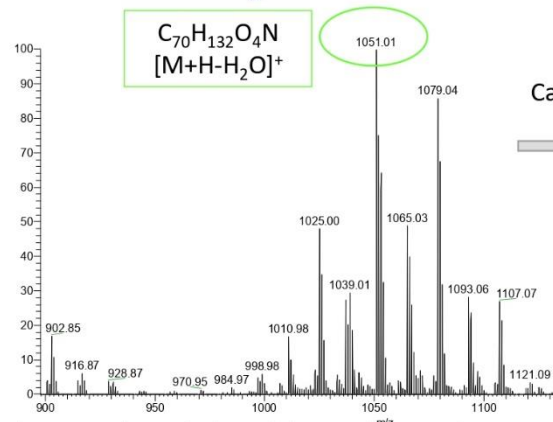
2- Séparation chromatographique et caractérisation structurale des lipides épidermiques

Développer une méthode analytique capable de:

- Séparer en un seul run tous les lipides de l'épiderme avec une bonne sélectivité
- Caractériser les structure fines des lipides (la micro-hétérogénéité structurale)



Zoom sur le TR de la classe de céramide éluée sous plusieurs massifs chromatographiques.



Spectre de masse en haute résolution de la sous-classe EOS obtenu en mode APPI+ en Full scan

Caractérisation de la structure fine

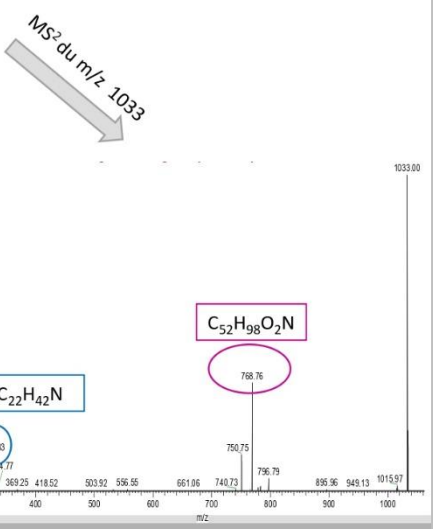
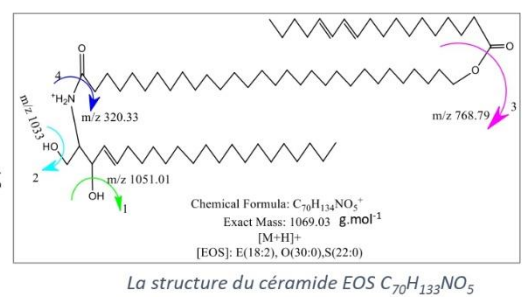
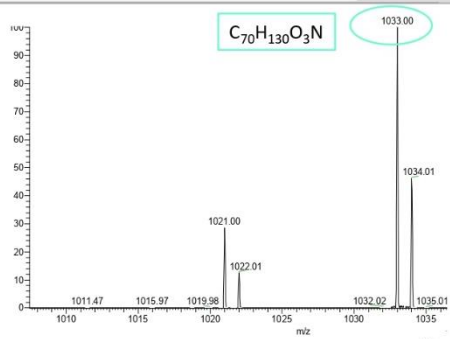
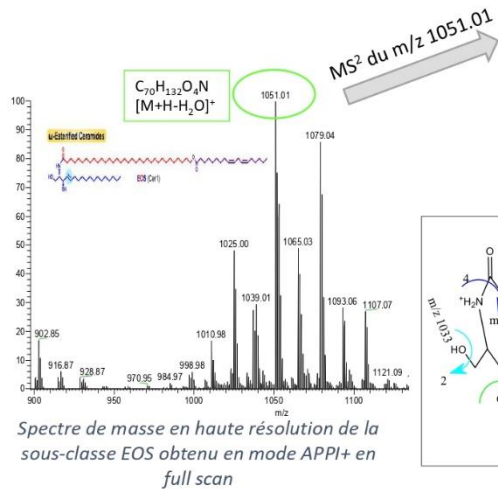
Analyse en MSⁿ

10

Article 2

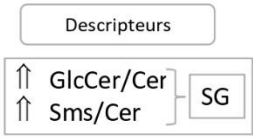
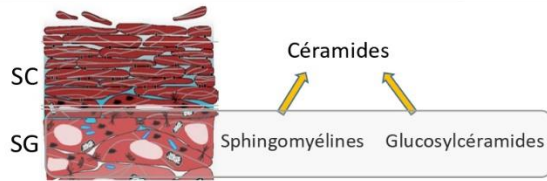
Méthodes d'analyse des lipides épidermiques

2- Séparation chromatographique et caractérisation structurale des lipides épidermiques

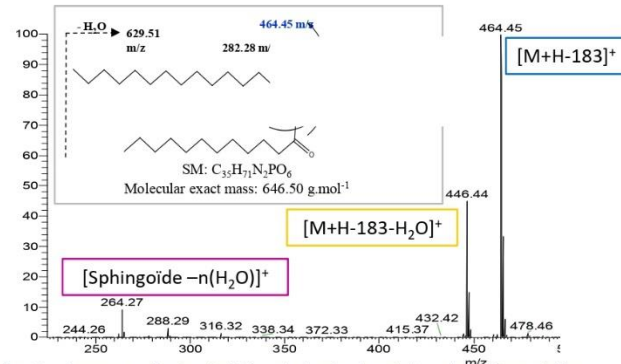


Méthodes d'analyse des lipides épidermiques

2- Séparation chromatographique et caractérisation structurale des lipides épidermiques

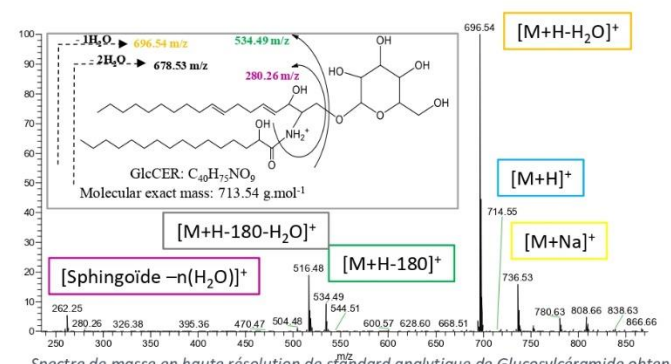


Fragmentation des Sphingomyélines (Sms)



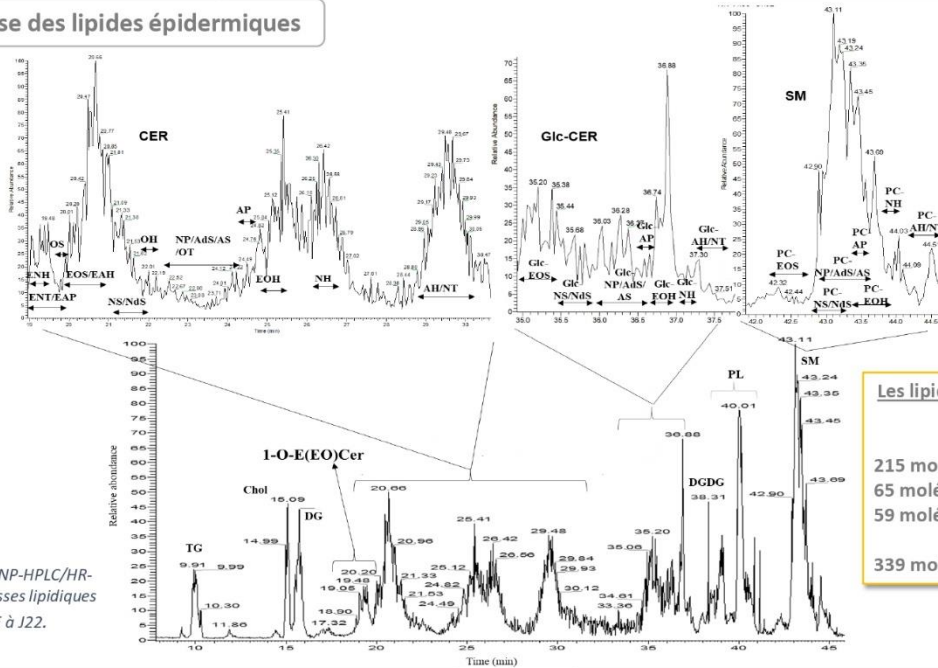
Spectre de masse en haute résolution de standard analytique de Sphingomyéline obtenu en mode APPI+ en Full scan

Fragmentation des Glucosylcéramides (Glc-Cer)



Spectre de masse en haute résolution de standard analytique de Glucosylcéramide obtenu en mode APPI+ en Full scan

Méthodes d'analyse des lipides épidermiques



Profil chromatographique (NP-HPLC/HR-MSⁿ) des classes et sous-classes lipidiques obtenues pour la RHE à J22.

Les lipides les plus abondants dans l'échantillon RHE

215 molécules de céramides
65 molécules de glucosylcéramides
59 molécules de sphingomyélines
↓
339 molécules ont été identifiées

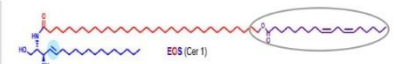
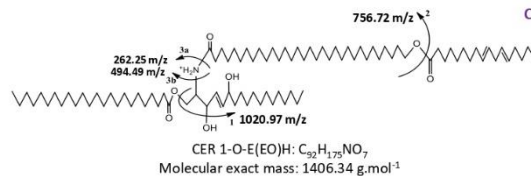
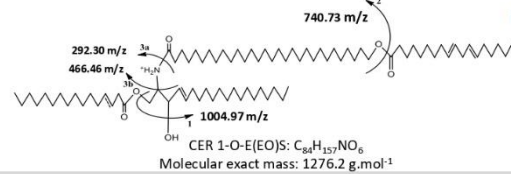
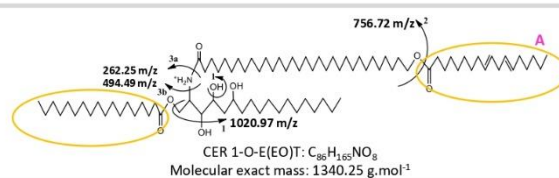
13

Article 2

1-O-E(EO) Cer, une nouvelle sous-classe de céramides identifiée dans le RHE et le SC humain



Céramides estérifiés sur la position 1-O de la base sphingioïde avec une longue à très longue chaîne acyle (1-O-E)



Céramides estérifiés sur la position ω de l'acide gras avec l'acide linoléique (EO)

85 molécules de la sous-classe de céramides 1-O-E(EO) Cer ont été identifiées dans le RHE et le SC humain.

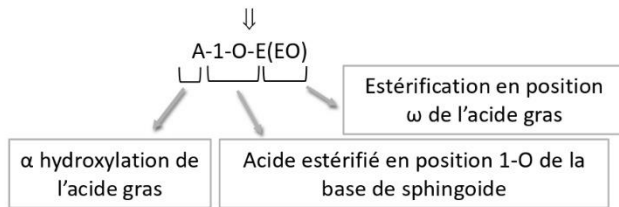
Les trois bases sphingioïdes de la sous-classe 1-O-E(EO) identifiées par HR-MSⁿ en full scan et MS²/MS³

14

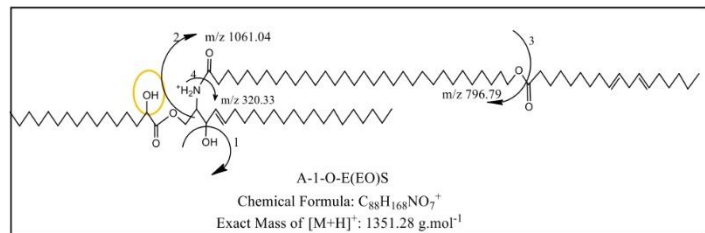
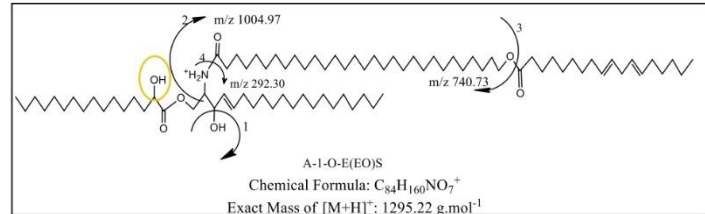
Article 2

Une deuxième nouvelle sous-classe de céramides: A-1-O-E(EO) Cer, identifiée dans le RHE et le SC humain

L'acide gras lié à la base sphingoïde en position 1-O via une liaison ester est hydroxylé (OH) en position α



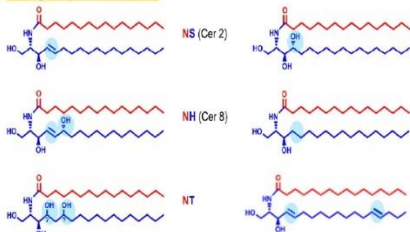
21 molécules ont été identifiées dans le RHE et le SC humain.



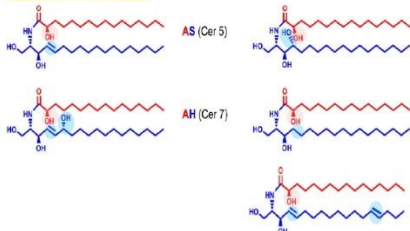
Les fragments caractéristiques détectés en HR-MSⁿ en full scan et MS²/MS³ de la nouvelle sous-classe A-1-O-E(EO)

Nouvelles sous-classes de Céramides 1-O-Acyl ceramides

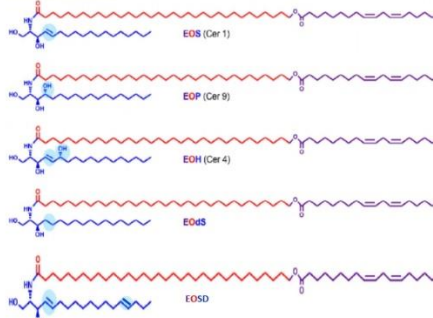
Non-Hydroxylated Ceramides



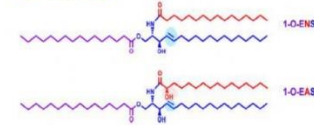
α -Hydroxylated Ceramides



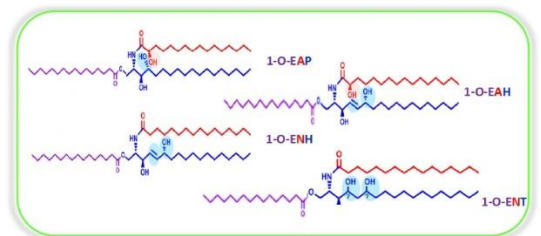
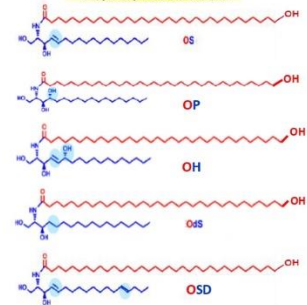
ω -Esterified Ceramides



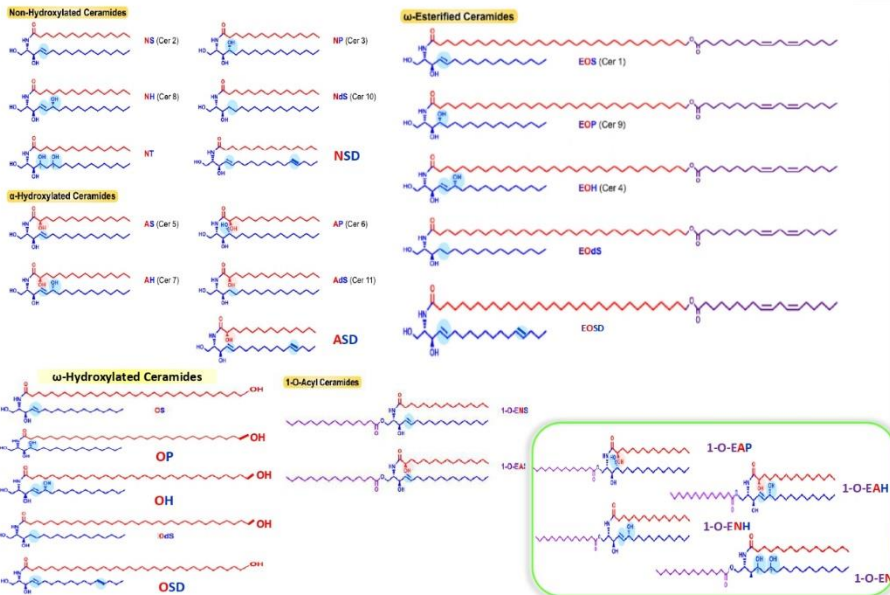
1-O-Acyl Ceramides



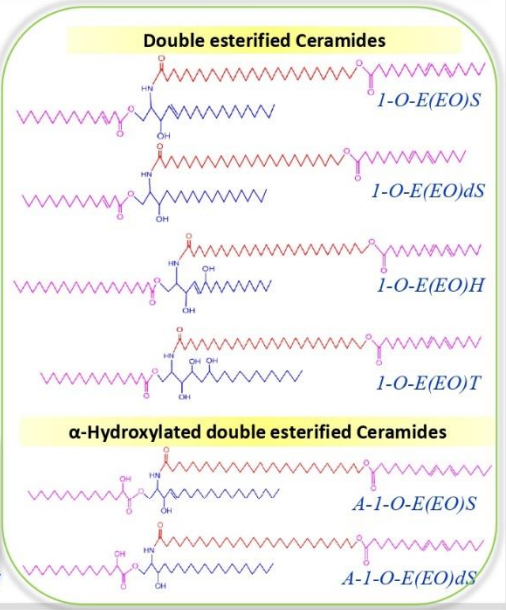
ω -Hydroxylated Ceramides



Nouvelles sous- classes de Céramides doublement estérifiés



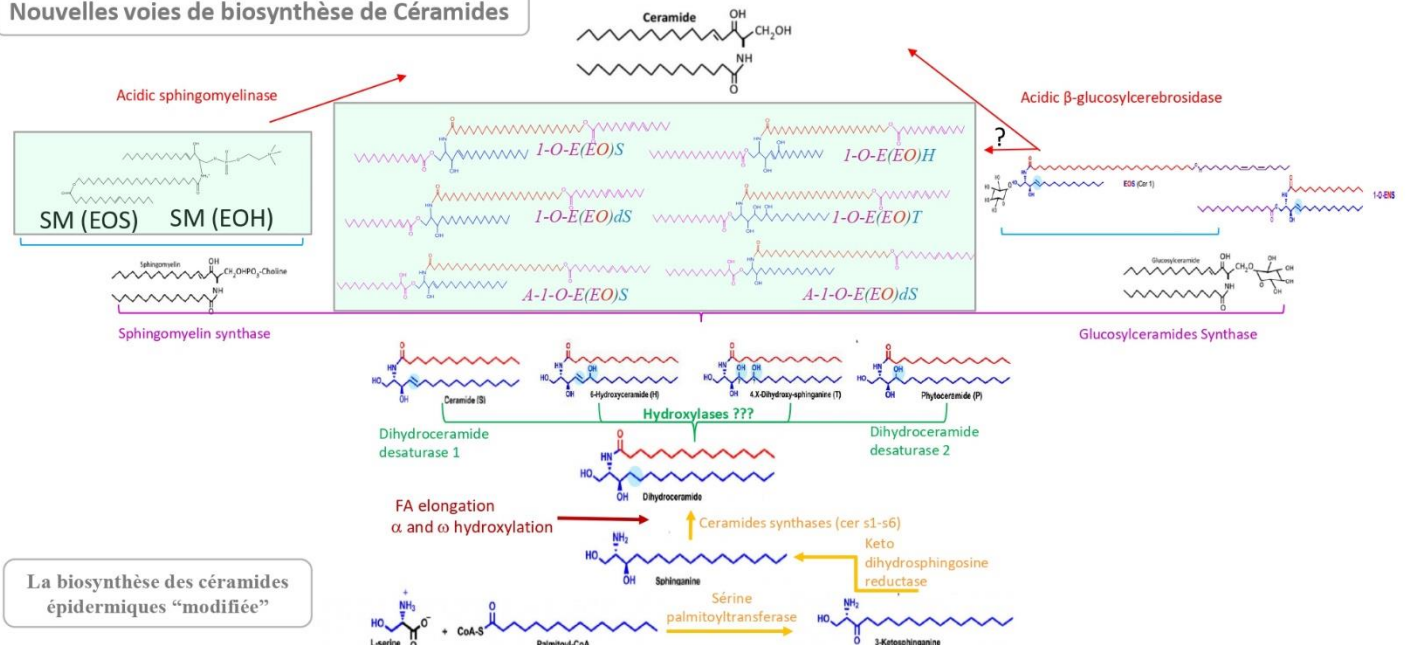
Très impliquées dans la fonction de barrière cutanée



Ceramide synthesis in the epidermis. Rabionet et al, 2013.

Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS[S].Kawana et al 2020

Nouvelles voies de biosynthèse de Céramides



La biosynthèse des céramides épidermiques "modifiée"

Ceramide synthesis in the epidermis. Rabionet et al, 2013.

1-O-E(EO) Cer, une nouvelle sous-classe de céramides
identifiée dans le RHE et le SC humain

Article 2

Analytical and Bioanalytical Chemistry
https://doi.org/10.1007/s00216-019-02301-3

RESEARCH PAPER



Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MSⁿ: 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass

Ali Assi¹ • Joudi Bakar¹ • Danielle Libong¹ • Elie Sarkees¹ • Audrey Solgadi² • Arlette Baillet-Guffroy¹ • Rime Michael-Jubeli¹ • Ali Tfayli¹

Une deuxième nouvelle sous-classe de céramides: A-1-O-E(EO) Cer, identifiée dans le RHE et le SC humain

Article 3



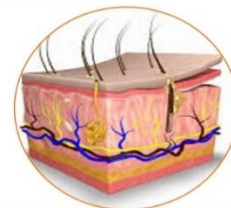
Stratum Corneum lipid profiles In vitro, Ex vivo and In vivo: characterization of the α -Hydroxy double esterified ceramides

Journal:	Analytical and Bioanalytical Chemistry
Manuscript ID:	Draft
Type of Paper:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bakar, Joudi; Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay Michael-Jubeli, Rime; Université Paris-Sud, Paris-Sud university Libong, Danielle; Faculté de Pharmacie Université Paris Sud, Chimie Analytique Baillet-Guffroy, Arlette; Faculty of Pharmacy, Tfayli, Ali; Faculty of Pharmacy,
Keywords:	A-1-O-E (EO) Cer, 1-O-E (EO) Cer, Reconstructed Human Epidermis, Human Stratum Corneum, NP-LC/HR-MSn, Ceramides

19

Problématiques biologiques

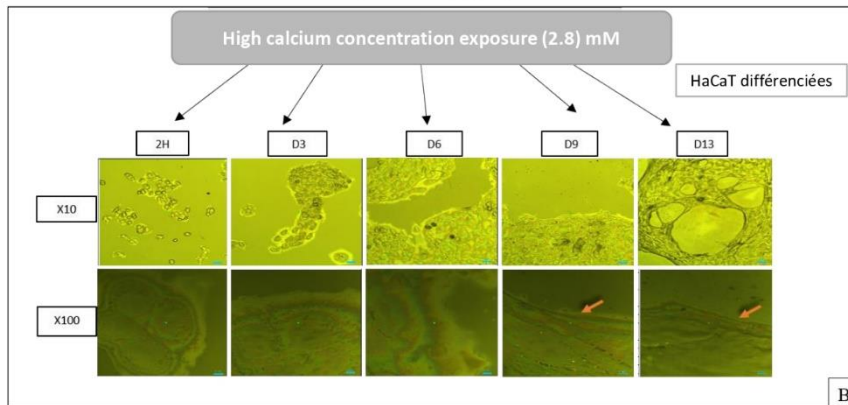
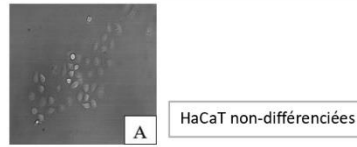
- Étudier la différenciation des kératinocytes dès les étapes précoces (couche basale)
- Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
- Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC
- Comprendre la dermatite atopique au niveau moléculaire



20

Étudier la différenciation des kératinocytes dès les étapes précoces (couche basale)

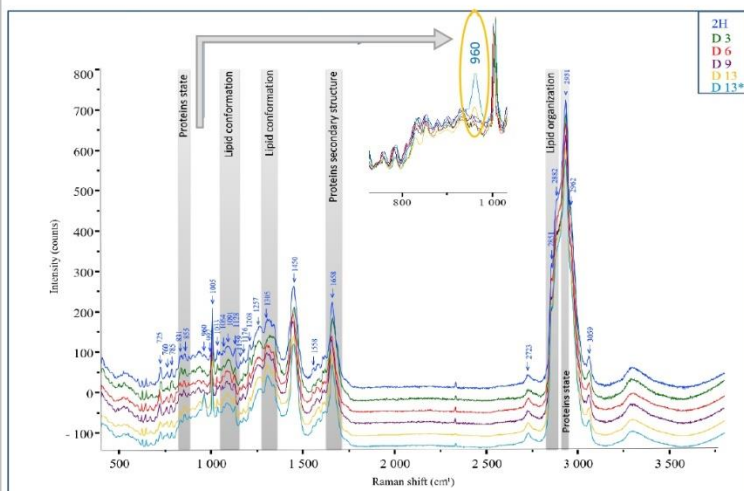
Matériels et méthodes



L'évolution morphologique des cellules HaCaT durant le processus de la différenciation. A) Image microscopique B) Images de lumière blanche (x10 et x100), h: heure, D: jour.

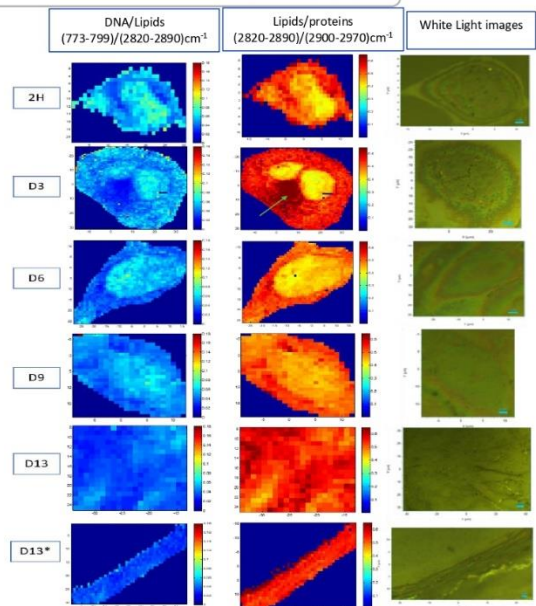
Étudier la différenciation des kératinocytes dès les étapes précoces (couche basale)

Apport de la microspectroscopie Raman



Les spectres moyens « cytoplasmiques » des cellules HaCaT (n = 12) obtenus par microspectroscopie Raman.

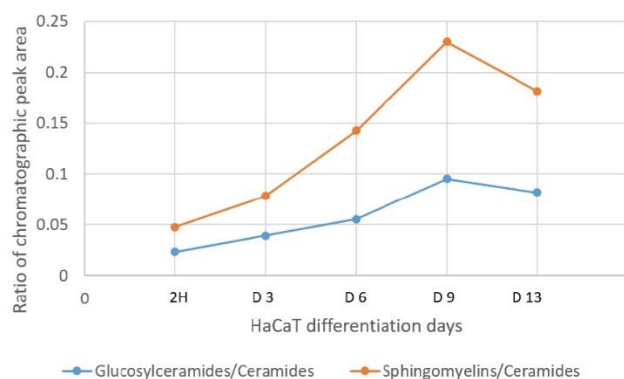
* Spectre moyen de HaCaT à J13, obtenu à partir d'état stratifié.



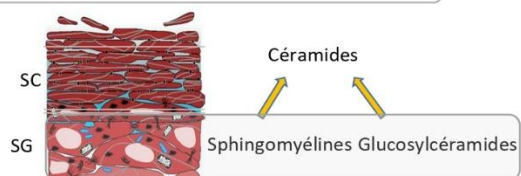
Images spectrales (en pseudo-couleurs) des cellules HaCaT *: état stratifié.

Étudier la différenciation des kératinocytes dès les étapes précoces (couche basale)

Apport de l'analyse des biomarqueurs lipidiques en NP-HPLC/Corona et NP-HPLC/HR-MS



Évolution des biomarqueurs lipidiques au cours de la différenciation des kératinocytes étudiée en HPLC/HR-MS et HPLC/Corona.



Conclusion :

- Entre les 9^{ème} et 13^{ème} jours, les cellules HaCaT **évoluent** d'un état granuleux (9^{ème} jour) vers un état corné (13^{ème} jour)
- La **microspectroscopie Raman** se révèle être une méthode de **caractérisation** avec une grande capacité de suivre les modifications moléculaires qui surviennent lors de la différenciation des kératinocytes
- Les cellules HaCaT sont capables de se différencier *in vitro* sous l'effet de taux de calcium élevé **mais sans former des couches** complètement stratifiées permettant une organisation lipidique

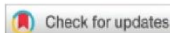
Étudier la différenciation des kératinocytes dès les étapes précoces (couche basale)

Article 1

Analyst



PAPER

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/d1an00231g

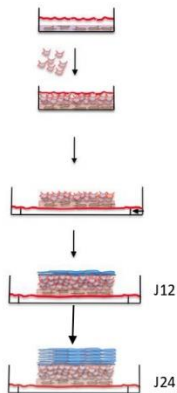
Biomolecular modifications during keratinocyte differentiation: Raman spectroscopy and chromatographic techniques†

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli,* Sana Tfaili, * Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy and Ali Tfayli

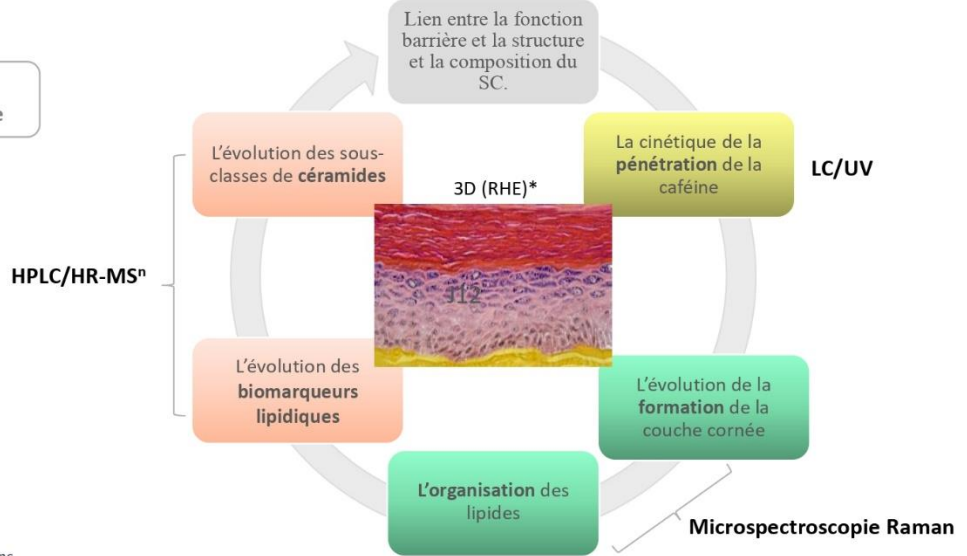
Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC

Approche multimodale

Niveaux
Fonctionnel, Tissulaire, Moléculaire



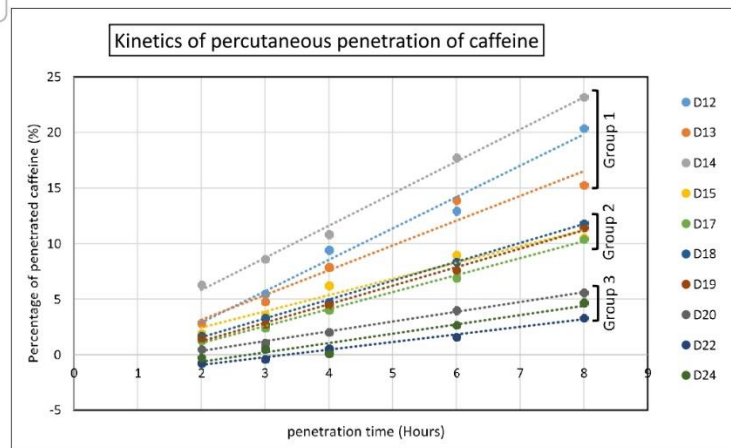
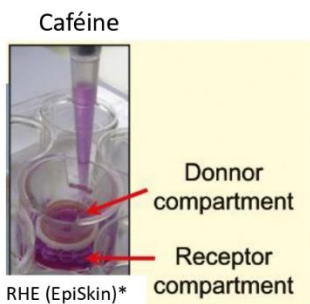
Génération du RHE à partir des kératinocytes humains



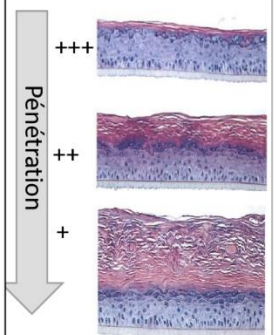
HPLC/HR-MSⁿ : Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution. RHE : modèle de l'épiderme reconstruit humain « sain » (EpiSkin)* , Génération des culture organotypiques de Raft kératinocytes humains primaires. Anacker et al. 2012

Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC

Étude fonctionnelle de la barrière



La cinétique de la pénétration percutanée de la caféine à travers le modèle de l'épiderme humain reconstruit (RHE). *D: jour de maturation



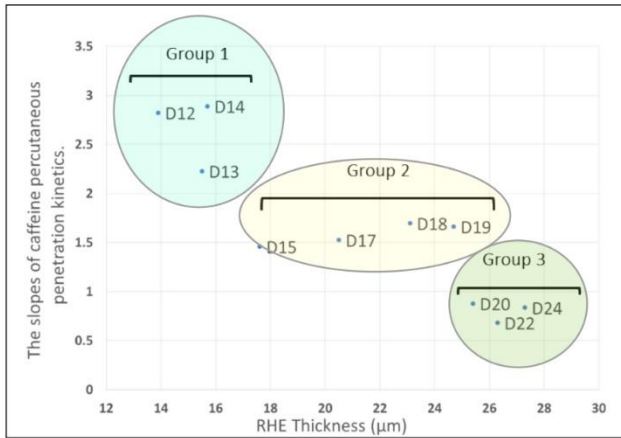
Introduction générale

Travaux expérimentaux

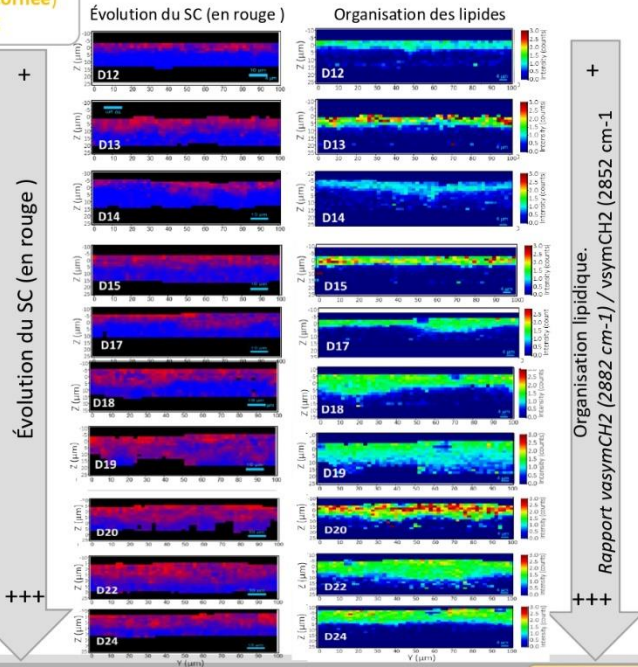
Conclusion et perspectives

Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC

Étude tissulaire par microspectroscopie Raman



La corrélation entre les pentes de la cinétique de pénétration percutanée de la caféine et l'épaisseur de l'épiderme pendant les jours de maturation RHE



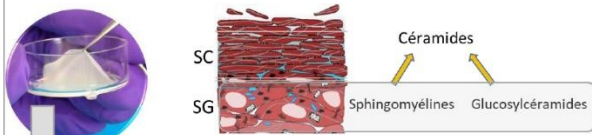
Introduction générale

Travaux expérimentaux

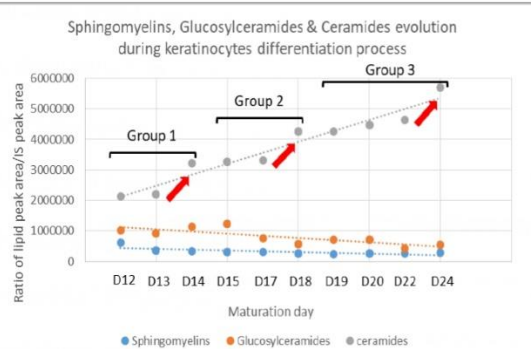
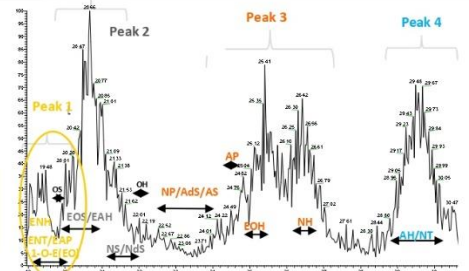
Conclusion et perspectives

Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC

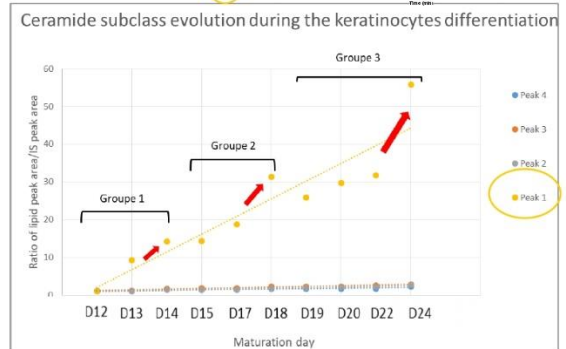
Étude moléculaire



Les céramides estérifiés sont générés au cours des étapes tardives de la différenciation



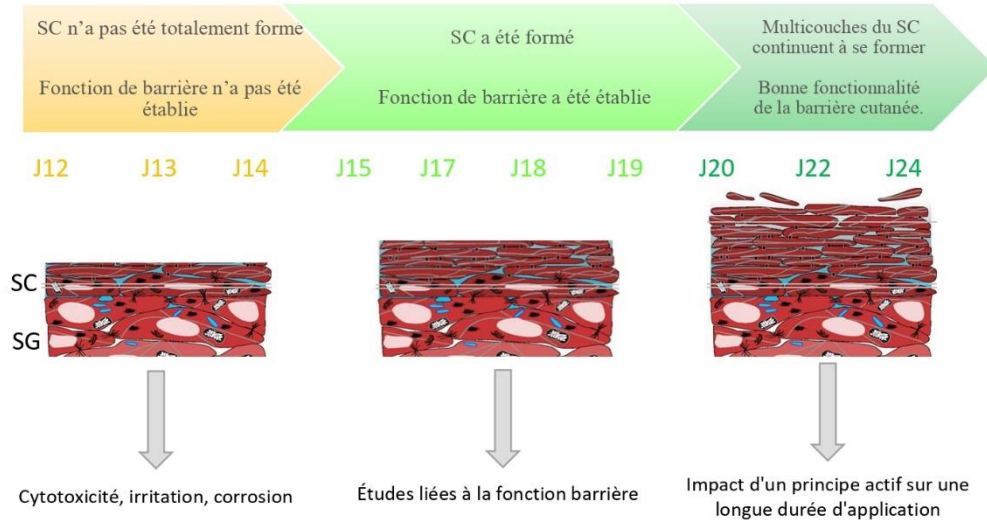
Évolution des céramides, glucosylcéramides et sphingomyélines au cours du processus de différenciation des kératinocytes.



L'évolution des sous-classes de céramides au cours du processus de différenciation des kératinocytes

Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC

Conclusion



Suivre la différenciation des kératinocytes aux étapes tardives (couches: granuleuse et cornée)
Expliquer le lien entre la fonction barrière et la structure et la composition du SC

Article 4



Analyst

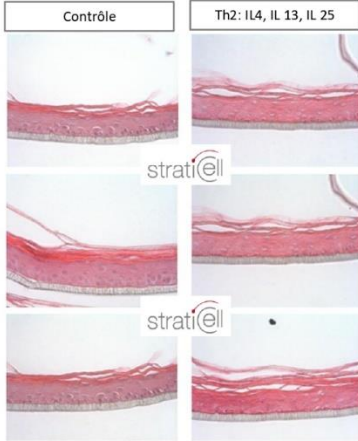
Assessment of the Skin Barrier Function in the Reconstructed Human Epidermis using a Multimodal Approach at molecular, tissue and functional levels

Journal:	Analyst
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	bakar, Joudi; Paris-Saclay University, Lipides : systèmes analytiques et biologiques Michael-Jubell, Rime; Paris-Saclay University El Khoury , Rindala; Université Paris-Saclay Hamla, Sabrina; Paris-Saclay University ASSI, Ali; Université Paris-Saclay Faculté de Pharmacie, Tour D2; University paris saclay Baillet-Guffroy, Arlette; Paris-Saclay University, Pharmacy Tfayll, Ali; Paris-Saclay University, Pharmacy

Le triptyque « épiderme reconstruit altéré (RHE)/ NP-HPLC/HR-MSⁿ / microspectroscopie Raman » constitue un outil pertinent dans la compréhension de la dermatite atopique?

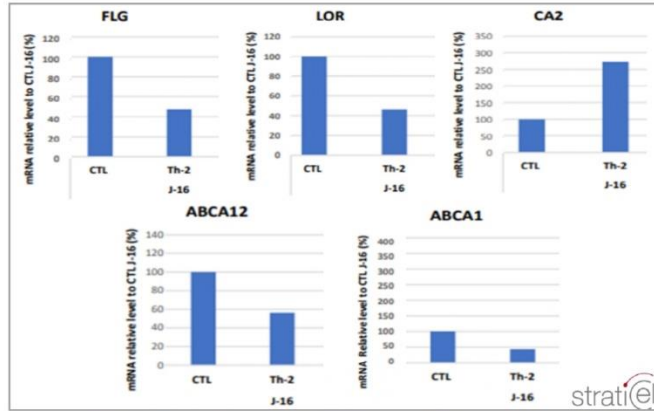
Matériels et méthodes

Validation morphologique



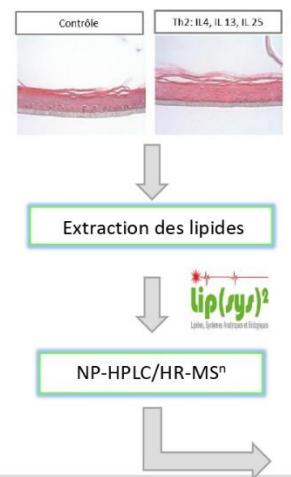
Histologie et coloration par immunofluorescence des tissus

Validation aux niveaux gènes et protéines



Analyse qPCR de l'expression de l'ARNm. Les protéines impliquées dans la différenciation terminale (Filaggrin (FLG) et Loricrin (LOR)), l'expression des gènes ABCA1 ABCA12 et les métalloenzymes CA2

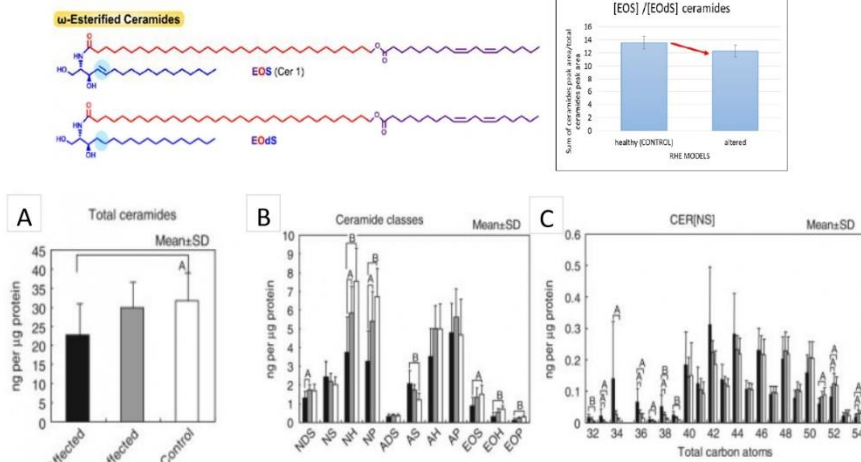
Analyse des lipides



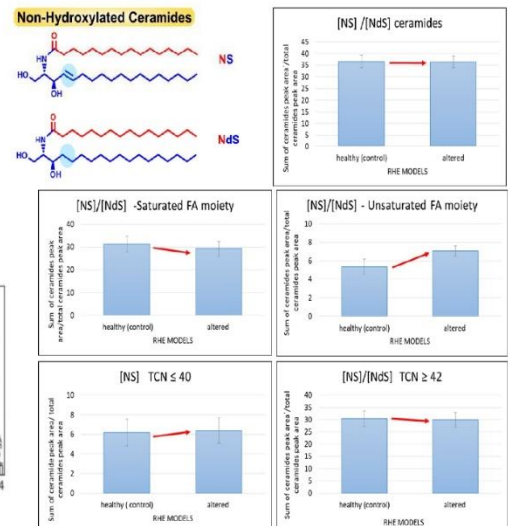
RHE (Modèle Dermatite Atopique) : modèle de l'épiderme reconstruit humain « malade (dermatite atopique) » (StratiCELL)[®]

Le triptyque « épiderme reconstruit altéré (RHE)/ NP-HPLC/HR-MSⁿ / microspectroscopie Raman » constitue un outil pertinent dans la compréhension de la dermatite atopique?

Marqueurs lipidiques de l'atopie



Profils de céramides comparés entre la peau humaine saine et la peau atopique (zones affectées et non-affectées)



Évolution des céramides [NS]/[Nds] entre les modèles RHE saine (témoin), RHE altérée. TCN: nombre total de carbone.

RHE (Modèle Dermatite Atopique)* : modèle de l'épiderme reconstruit humain « malade (dermatite atopique) » (StratiCELL)[®]

Le triptyque « épiderme reconstruit altéré (RHE)/ NP-HPLC/HR-MSⁿ / microspectroscopie Raman » constitue un outil pertinent dans la compréhension de la dermatite atopique?

Conclusion :

- Le modèle **RHE atopique** développé par **Straticell** représente un **modèle alternatif des testes sur animaux**
- La méthode **NP-HPLC/HR-MSⁿ** a permis de valider le profil lipidique d'un modèle RHE altéré en cohérence avec les données de la littérature
- La **microspectroscopie Raman** permettra de mettre en évidence des **descripteurs** liés à la peau atopique et des modèles RHE altérés

En cours de rédaction...

Pour une soumission dans EJD

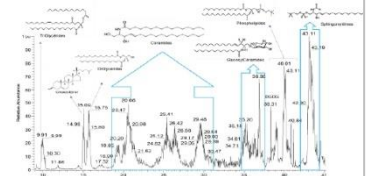
Article 5

Th2 cytokines impact on ceramide sub-classes in Reconstructed Human Epidermis models

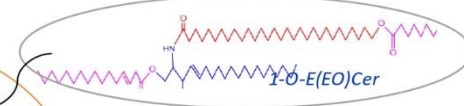
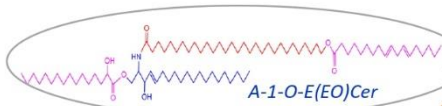
Conclusion générale

La méthode analytique **NP-HPLC/HR-MSⁿ** développée

Cartographier l'ensemble du lipidome épidermique
Caractériser les structures fines des lipides

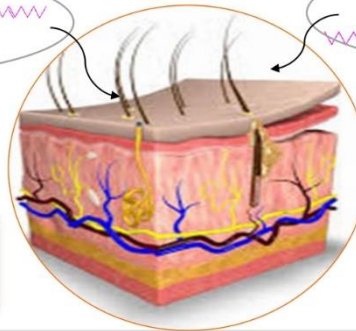


Découvrir deux nouvelles sous-classes de céramides, potentiellement **très impliquées** dans la fonction de barrière cutanée ⇒ **une piste très intéressante pour les domaines de cosmétologie et de dermatologie**



La microspectroscopie Raman

Suivre les changements moléculaires (cellulaires/tissulaires) d'une façon rapide et sans besoin de colorations.



Les modèles cellulaires de RHE (sains/altérés)

Reproduire un profil lipidique comparable à celui trouvé in vivo ce qui confirme leur intérêt dans des méthodes alternatives aux tests sur animaux

Introduction générale
Travaux expérimentaux
Conclusion et perspectives

Perspectives

1- Les Lipides épidermiques

Mono, Di, Tri, glycérides

Sphingomyélines

Phospholipides

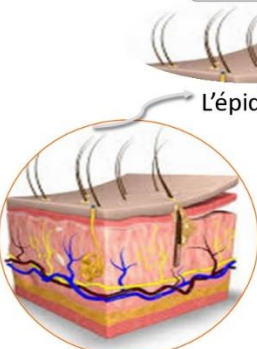
GlucosylCéramides

Céramides

Cholestérols

Acides gras

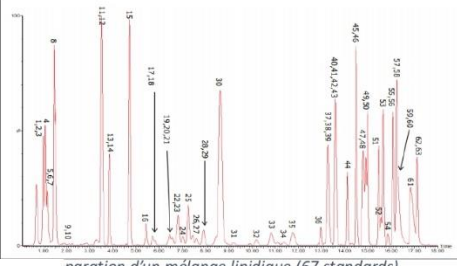
Responsables de la fonction barrière



L'épiderme


La peau

2- Chromatographie Liquide à Ultra Performance (UPLC)

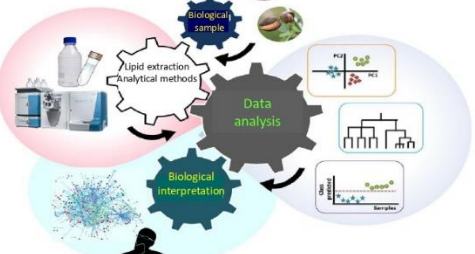


paration d'un mélange lipidique (67 standards)

4- Preuve de concept d'un actif



3- Approche chimiométrique



Lipid Separation using UPLC with Charged Surface Hybrid Technology.

Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. Checa et al. 2015

35

Introduction générale
Travaux expérimentaux
Conclusion et perspectives





Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques



Directrice
Pr. Arlette Baillet-Guffroy



CO-directrice
Dr Rime Michael-Jubeli



Responsable de l'équipe « MIC »
Pr. Ali Tfayli



FONDATION d'entreprise
Silab
PARFAUMÉRIE

Pour le financement de ces travaux de recherches



Productions scientifiques

Articles

- **Biomolecular modifications during the keratinocytes differentiation: Raman spectroscopy and chromatographic techniques.**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Sana Tfaily *, Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli. Analyst 2021. DOI: [10.1039/d1an00231g](https://doi.org/10.1039/d1an00231g)
- **Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in Reconstructed Human Epidermis using NPLC/HR-MSⁿ: 1-O-E (EO) Cer, a new ceramide subclass.**
Ali Assi, **Joudi Bakar**, Danielle Libong, Elie Sarkees, Audrey Solgadi, Arlette Baillet-Guffroy, Rime Michael-Jubeli, Ali Tfayli. Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC) 2019. Doi: [10.1007/s00216-019-02301-3](https://doi.org/10.1007/s00216-019-02301-3)
- **Stratum Corneum lipid profiles *In vitro*, *Ex vivo* and *In vivo*: characterization of the α -Hydroxy double esterified ceramides.**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli*, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli. Soumis à Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC)
- **Assessment of the Skin Barrier Function in the Reconstructed Human Epidermis using a Multimodal Approach at molecular, tissular and functional levels.**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli *, Rindala El Khoury, Sabrina Hamla, Ali Assi, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli. Accepté dans Analyst.
- **Th2 cytokines impact on ceramide sub-classes in Reconstructed Human Epidermis models**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli, Michel Salmon, Céline Lancelot, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli. A soumettre.

Communication orale

Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall epidermis layer lipids using LC/HR-MSⁿ.1-O-E(EO)Cer, a novel ceramides subclass

Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli.

LE STUDIUM, Decembre2019, Tours,France.

Communications affichées et prix

- **Lauréate 2018 de la fondation Sliab Jean PAUFIQUE:** https://www.fondation-entreprise-silab.fr/laureats_fr.html.
- **Poster 1: Morphological and molecular modifications during keratinocyte differentiation process**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli, Ali Tfayli, Arlette Baillet-Guffroy
Journée de l'école doctorale, 2MIB, 2018
- **Poster 2: Ceramide biosynthesis characterization on 2D keratinocyte cultures: a multimodal approach.**
J. Bakar, R. Michael-Jubeli, A. Tfayli, A. Baillet-Guffroy.
E2BRN, Toulouse, Septembre 2018.
- **Poster 3: Ceramide biosynthesis characterization on 2D keratinocyte cultures: a multimodal approach.**
J. Bakar, R. Michael-Jubeli, A. Tfayli, A. Baillet-Guffroy.
Journée de la recherche à la faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Décembre 2018.
- **Poster 4: Characterization of epidermal lipidome during the maturation of keratinocytes using LC/HRMSⁿ.**
J. Bakar, R. Michael-Jubeli, A. Tfayli, A. Baillet-Guffroy.
COMET, Février 2019, Cergy
Prix de jeune chercheur.
- **Poster 5: A new screening method for comprehensive mapping of lipid composition of human reconstructed epidermis: 1-O-E(E0)Cer, a novel ceramides subclass**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli, Arlette Baillet-GUFFROY, Ali Tfayli
LE STUDIUM, Décembre2019, Tours, France.
- **Poster 6: Comparison of keratinocyte differentiation between cell culture models: the spontaneously immortalized human keratinocyte cell line HaCaT (2D model) and Reconstructed Human Epidermis (RHE 3D model).**
Joudi Bakar, Rime Michael-Jubeli, Arlette Baillet-GUFFROY, Ali Tfayli
LE STUDIUM, Décembre2019, Tours, France.
Prix du meilleur poster

Titre : Étude de la biosynthèse lipidique au cours de la différenciation kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée

Mots clés : Lipides, Différenciation, Micro-hétérogénéité, NP-HPLC/HR-MSⁿ, Microspectroscopie Raman, Épiderme Reconstitué Humain.

Résumé : La différenciation des kératinocytes s'accompagne de profondes modifications de la composition lipidique du contenu cellulaire pour former à la fin le ciment intercornéocytaire responsable de la fonction de la barrière cutanée. Les céramides forment la classe lipidique majeure de l'épiderme. Cette classe est très complexe, elle-même se divise en sous-classes qui diffèrent par leur microhétérogénéité structurale. Le but de ce travail a été de développer une approche analytique permettant d'étudier la biosynthèse ces lipides épidermiques au cours de la différenciation kératinocytaire. A ce sujet, deux techniques analytiques ont été utilisées : 1) La Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase normale couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute Résolution NP-HPLC/HR-MSⁿ. Une méthode a été développée afin de séparer les classes lipides de différente polarité en une seule analyse et de caractériser les structures fines des lipides et notamment la micro-hétérogénéité structurale des céramides. 2) La Microspectroscopie Raman qui offre des informations à l'échelle moléculaire et « tissulaire ». Les images spectrales en pseudo-couleurs ont la capacité de mieux suivre l'évolution des lipides au cours de la différenciation et de renseigner sur l'organisation lipidique du *Stratum Corneum*. Trois modèles cellulaires ont été utilisés pour répondre aux objectifs fixés : 1) Un modèle cellulaire en 2D : pour le suivi de la différenciation dès les étapes précoces (couche basale). Ce modèle a permis de fournir des informations au niveau cellulaire par imagerie Raman. Il a également été utilisé pour mettre en place les premiers développements en NP-HPLC/HR-MSⁿ. 2) Un modèle d'épiderme reconstitué humain (en 3D) sain, mimant mieux l'environnement *in vivo* : pour le suivi de la différenciation à partir de *Stratum Granulosum* (SG) et jusqu'à la formation des multicouches de *Stratum Corneum* (SC).

Ce modèle a permis de fournir des informations au niveau tissulaire (couches épidermiques) et de réaliser toute la caractérisation approfondie des céramides, en tenant compte de l'ensemble des micro-hétérogénéités structurales. 3) Un modèle d'épiderme reconstitué humain (en 3D) altéré : pour illustrer l'adéquation de la méthode en NP-HPLC/HR-MSⁿ afin de mettre en évidence l'impact sur le profil lipidique d'un déficit enzymatique ciblé et d'appréhender l'effet potentiel d'une molécule active. Les résultats majeurs obtenus à partir des travaux expérimentaux sont les suivants : 1) Le développement d'outils analytiques pertinents dans l'élucidation de mélanges lipidiques complexes et leur évolution au niveau cellulaire ou tissulaire. 2) L'application innovante de la Microspectroscopie Raman au niveau de la cellule de kératinocyte (modèle cellulaire en 2D) : plusieurs modifications moléculaires au sein de la cellule ont été observées et notamment entre les jours 9 et 13 de la différenciation indiquant le passage entre SG et SC. 3) L'identification pour la première fois dans la littérature de deux nouvelles sous-classes de céramides (1-O-E (EO) Cer et A-1-O (EO) Cer) dans le modèle d'épiderme reconstitué humain sain mais également dans le SC humain, à partir des données fournies par la méthode développée en NP-HPLC/HR-MSⁿ. 4) La mise en évidence d'une perturbation du profil lipidique sur un modèle d'épiderme reconstitué humain altéré. L'ensemble de ces résultats a pu offrir une meilleure compréhension du métabolisme lipidique lors de la maturation des kératinocytes, de façon très détaillée au niveau moléculaire, qui permettrait d'appréhender de façon plus raisonnée les perturbations de la fonction barrière cutanée, physiologiques ou pathologiques.

Title : study of lipid biosynthesis during keratinocyte differentiation in relation to the integrity of the cutaneous barrier function

Keywords: Ceramides, Differentiation, Micro-heterogeneity, NP-HPLC/HR-MSⁿ, Raman Microspectroscopy, Reconstructed Human Epidermis.

Abstract: The keratinocytes differentiation is accompanied by profound modifications of the lipid composition of the cell contents to form at the terminal differentiation stage the intercorneocyte cement (lipid matrix) responsible for the skin barrier function. Ceramides are the major lipid class of the epidermis. This class is very complex, itself is divided into subclasses which differ in their structural micro-heterogeneity. The aim of this work was to develop an analytical approach to study the biosynthesis of these epidermal lipids during keratinocyte differentiation. On this subject, two analytical techniques were used: 1) Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry NP-HPLC/HR-MSⁿ. A method has been developed in order to separate the lipid classes of different polarity in a one single run and to characterize the fine structures of lipids in particular the structural micro-heterogeneity of ceramides. 2) Raman Microspectroscopy, which provides information at levels of molecules and of tissues. Pseudo-color spectral images have the ability to better follow the evolution of lipids during differentiation and to provide information on the lipid organization of the *Stratum Corneum*. Three cellular models were used to achieve our objectives: 1) A 2D cell model: for monitoring the differentiation from the early stages (basal layer). This model made it possible to provide information at the cellular level by Raman imaging. It was also used to establish the first developments in NP-HPLC/HR-MSⁿ. 2) A healthy 3D reconstructed human model of epidermis, better mimicking the environment *in vivo*: for monitoring differentiation from *Stratum Granulosum* (SG) and up to the formation of *Stratum Corneum* (SC) multilayers.

This model allowed to provide information at the tissue level (epidermal layers). In addition, it is on this model that all the in-depth characterization of ceramides was carried out, taking into account all the structural heterogeneities. 3) An altered 3D human reconstructed epidermis model: to illustrate the suitability of the NP-HPLC/HR-MSⁿ method in order to highlight the impact on the lipid profile of a targeted enzymatic deficit and to understand the potential effect of an active molecule. The major results obtained from the experimental work are as follows: 1) The development of relevant analytical tools in the elucidation of complex lipid mixtures and their evolution at the cellular or tissue level. 2) The innovative application of Raman Microspectroscopy at the level of the keratinocyte cell (2D cell model): several molecular modifications within the cell were observed and in particular between days 9 and 13 of differentiation indicating the passage between SG and SC. 3) The identification for the first time in the literature of two new subclasses of ceramides (1-OE (EO) Cer and A-1-O (EO) Cer) in the healthy human reconstructed epidermis model but also in the human SC, from data provided by the developed method in NP-HPLC/HR-MSⁿ. 4) Demonstration of a disruption of the lipid profile on an altered reconstructed human epidermis model. All of these results have been able to provide a better understanding of lipid metabolism during keratinocyte maturation, in very detail at the molecular level, which would allow a more reasoned understanding of the physiological or pathological disturbances of the skin barrier function.