



HAL
open science

Microspectroscopies vibrationnelles, outils de caractérisation moléculaire et supramoléculaire ex vivo et in vivo du stress oxydatif cutané après irradiations

UV

Ali Assi

► **To cite this version:**

Ali Assi. Microspectroscopies vibrationnelles, outils de caractérisation moléculaire et supramoléculaire ex vivo et in vivo du stress oxydatif cutané après irradiations UV. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF081 . tel-04162671

HAL Id: tel-04162671

<https://theses.hal.science/tel-04162671>

Submitted on 16 Jul 2023

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.

Microspectroscopies vibrationnelles, outils de caractérisation moléculaire et supramoléculaire ex vivo et in vivo du stress oxydatif cutané après irradiations UV

Vibrational microspectroscopies, a tool for molecular and supramolecular characterization of the cutaneous ex vivo and in vivo oxidative stress after UV radiation

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571, Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Graduate School : Chimie. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Lipides : Systèmes analytiques et biologiques (Université Paris-Saclay)** sous la direction de **Ali TFAYLI**, Professeur des universités et le co-encadrement de **Rime MICHAEL-JUBELI**, maîtresse de conférences des universités.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 05 décembre 2022, par

Ali ASSI

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

| | |
|--|---------------------------|
| Olivier PIOT Professeur, Université de Reims | Président & Rapporteur |
| Emelie MUNNIER Professeure, Université de Tours | Rapporteur & Examinatrice |
| Luc EVELEIGH Maître de conférences, AgroParisTech | Examineur |
| Carine JACQUES-JAMIN Docteure, Entreprise Pierre Fabre | Examinatrice |
| Roger LTEIF Professeur, Université Saint Joseph | Examineur |

Titre : Microspectroscopies vibrationnelles, outils de caractérisation moléculaire et supramoléculaire ex vivo et in vivo du stress oxydatif cutané après irradiations UV

Mots clés : Rayonnements solaires, Peau, Lipide Cutanés de Surface, Spectroscopie vibrationnelle.

Résumé : La peau, le plus grand organe du corps, remplit plusieurs fonctions physiologiques, notamment celle de barrière protectrice. Le Stratum Corneum (SC), la couche la plus externe de la peau, est composé de cornéocytes, de cornéodesmosomes et d'une matrice lipidique intercellulaire. Il constitue la première barrière contre les agressions chimiques et biologiques externes et régule la perte d'eau. En outre, elle joue un rôle important dans la protection de la peau contre les agressions environnementales telles que les radiations solaires.

La surface de la couche cornée (SC) est recouverte d'un film hydrolipidique composé de deux phases, aqueuse et lipidique. La phase lipidique appelée : « lipides cutanés de surface (LCS) » est un mélange de sébum et de lipides épidermiques. LCS sont composés d'un complexe de lipides qui proviennent soit de la sécrétion sébacée comme les triglycérides, les esters de cire et le squalène, soit de la desquamation comme les cholestérols libres et estérifiés, soit des deux, comme les acides gras libres (AGL).

La pénétration des rayons UV à travers la peau peut entraîner la formation de radicaux libres, qui interagissent immédiatement avec les cellules vivantes. Les radicaux libres générés peuvent provoquer l'oxydation des protéines épidermiques, des lipides et de l'ADN épidermique.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet des radiations solaires sur les lipides cutanés de surface et leur rôle dans la protection de la peau.

La première partie de ce travail vise à mettre en place différents descripteurs vibrationnels pour suivre les modifications structurales au cours du processus de photo-oxydation des lipides présents dans les LCS. Dans cette partie, l'utilisation des spectroscopies Raman et IR a permis de suivre, étape par étape, le processus de photo-oxydation. Ce travail est le premier à rassembler différents descripteurs spectraux permettant de suivre les différentes modifications structurales au cours de ce processus, c'est-à-dire l'abstraction d'hydrogène, la formation d'hydroperoxydes et de radicaux peroxydes comme produits primaires d'oxydation, et la formation d'aldéhydes, de cétones, et d'alcool comme produits secondaires.

La deuxième partie vise d'abord à évaluer l'effet des rayonnements solaires sur l'hydratation du SC et à explorer le rôle des LCS dans la protection de l'équilibre hydrique dans le SC. Nous avons par la suite évalué les limites de la capacité de protection des LCS, et exploré l'action protectrice des filtres solaires à la fois sur la composition des LCS et sur la cinétique d'hydratation et de déshydratation dans le SC.

La dernière partie de ce travail vise à étudier l'impact de doses sous-érythémateuses d'UVA et d'UVB sur la structure moléculaire, l'organisation et la fonction barrière du SC humain à l'aide de la spectroscopie Raman confocale in vivo en suivant différents descripteurs Raman

Les résultats de cette partie ont montré que les UVA ont provoqué un relâchement de l'organisation intermoléculaire des lipides immédiatement après l'irradiation. En revanche, un impact retardé a démontré une réorganisation de cette barrière lipidique. De même, une augmentation de la teneur en eau a été observée- principalement pour la fraction d'eau non liée et une augmentation relative de feuillet β dans les protéines du SC.

L'ensemble des travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'impact des rayonnements solaires sur le SC et les LCS au niveau moléculaire et fonctionnel. En particulier, ils ont permis d'éclaircir le rôle protecteur des LCS contre ces rayons permettant de préserver la fonction barrière du SC. Ces résultats représentent un grand intérêt dans le domaine dermatologique et permettent l'ouverture de nouvelles perspectives dans les stratégies de protection de la peau.

Title: Vibrational microspectroscopies, a tool for molecular and supramolecular characterization of the cutaneous ex vivo and in vivo oxidative stress after UV radiation

Keywords : Solar radiation , Skin, Skin Surface Lipids, Vibrational spectroscopy .

Abstract: The Skin, the largest organ of the body, plays several physiological functions such as a protective barrier against exogenous insults. The stratum corneum (SC), the outermost layer of the skin, is composed of corneocytes, corneodesmosomes and an intercellular lipid matrix. It provides the primary barrier against external chemical and biological aggressions and regulates water loss. In addition, it plays an important role in protecting the skin against environmental stresses such as solar radiations.

Skin surface lipids (SSLs) film is a mixture of sebum and epidermal lipids. It covers the surface of the stratum corneum (SC) and thus participates to its barrier function. SSLs are composed of a complex of lipids that come either from sebaceous secretion such as triglycerides, wax esters, and squalene, from desquamation such as free and esterified cholesterols, or from both, like free fatty acids (FFAs).

The penetration of UV light through the skin leads to the formation of free radicals, which immediately interact with living cells. The generated free radicals can cause oxidation of epidermal proteins, lipids, and epidermal DNA.

Lipid peroxidation (LPO) has been widely studied for several decades. It is implicated in the development of many chronic diseases such as cardiovascular disease, cancer, neurodegenerative diseases, and aging.

The aim of this work is to evaluate the effect of solar radiations on skin surface lipids and their role in the protection of the underlying skin.

The first part of this work aims to put together different descriptors to follow the different structural modifications during the photo-oxidation process of lipids present in the SSLs using vibrational spectroscopy.

In this part, the use of Raman and IR spectroscopies enabled to monitor the photo-oxidation process of skin surface lipids. This work is the first to put together different spectral descriptors enabling to follow the different structural modifications during the photo-oxidation process, i.e., the hydrogen abstraction, the formation of hydroperoxides and peroxy radicals as

primary oxidation products, and the formation of aldehydes, ketones, and alcohols as secondary products.

The second part of this work aims to firstly evaluate the effect of solar radiations on the SC hydration and to explore the role of skin surface lipids in the protection of water homeostasis in the SC against solar radiations. Then, it evaluates the limits of the protection capacity of skin surface lipids, and explore the protective action of sun filters on both SSLs composition and the hydration and dehydration kinetics in the SC.

The last part of this work aims to study the impact of sub-erythemal doses of UVA and UVB exposure on the molecular structure, organization, and barrier function of the human SC by following different Raman descriptors using in vivo confocal Raman spectroscopy.

The results of this part showed that UVA induced a loosening of the lateral packing of lipids immediately after irradiation. In contrast, delayed impact caused a tightening of the lipid barrier, an increase in water content -mainly in the unbound water fraction and a higher relative amount of β -sheets in SC proteins.

These studies have made it possible to highlight the impact of solar radiation on the SC and the SSLs at the molecular and functional levels. In particular, they have shed the light on the protective role of the SSLs, allowing the barrier function of the SC to be preserved. These results are of great interest in the dermatological field and open up new perspectives in skin protection strategies.

Remerciements

Plus de quatre ans au sein de ce laboratoire, plus de quatre ans entouré par une équipe très aimable qui m'a soutenu 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.

C'est avant tout à ces chercheurs passionnés, sur lesquels le temps n'a pas de prise, qui m'ont formé et qui ont eu confiance en moi pendant toutes ces années que j'adresse mes plus sincères remerciements.

A vous les membres du jury,

Pr. Emilie MUNNIER, Pr. Olivier PIOT, merci d'avoir accepté d'évaluer et de rapporter mon travail de thèse. **Dr Carine JACQUES-JAMIN, Dr Luc EVELEIGH et Pr. Roger LTEIF**, merci d'avoir accepté d'examiner ces travaux et de participer au jury de ma thèse.

A mes encadrants,

Tout d'abord un grand merci à mon directeur de thèse **Pr. Ali TFAYLI**. Ce travail ne serait rien sans toi. Merci d'avoir dirigé cette thèse, merci de t'être tant investi, et de m'avoir fait partager ton savoir, ta rigueur et ton goût pour la recherche. Je te remercie infiniment pour ta disponibilité; aucun doctorant ne peut rêver mieux. Tu as toujours été à l'écoute de mes nombreuses questions, et tu t'es toujours intéressé à l'avancée de mes travaux. Merci de m'avoir accompagné dans tous les problèmes que j'ai rencontrés depuis mon arrivé en France. Tu as été plus qu'un directeur. Je t'en serais éternellement reconnaissant.

Dr Rime MICHAEL-JUBELI, un merci tout particulier. Mes remerciements ne pourront jamais suffire pour exprimer tout ce que tu m'as apporté. Merci d'avoir encadré cette thèse, j'ai appris énormément à tes côtés. Je ne peux pas oublier tout ce que tu as fait pour moi et pour mener à bien ma thèse. Merci de m'avoir accompagné dans tous les aléas rencontrés que ça soit durant la thèse ou dans ma vie personnelle. Tu es devenue bien plus qu'une encadrante et je ne saurai te remercier suffisamment pour tout ce que tu as fait.

Je tiens à remercier de tout mon cœur **Pr Arlette BAILLET-GUFFROY**. 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.

Dr Carine JACQUES-JAMIN, merci pour l'accompagnement de cette thèse avec rigueur scientifique, tout le temps consacré aux discussions, nos échanges toujours passionnants et un merci particulier de m'avoir fait confiance et confié ce sujet de thèse.

A Madame Hélène DUPLAN,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre du comité de suivi de cette thèse. Merci d'avoir toujours pris le temps d'apporter votre regard critique, votre très grande expertise, de proposer et d'échanger avec nous sur ces travaux.

Je remercie évidemment le centre de recherche sur la peau **Pierre Fabre Dermo-Cosmétiques (PFDC)** pour avoir financé ma thèse.

Aux membres du laboratoires Lip(Sys)²,

Mes remerciements s'adressent tout d'abord au Monsieur le **Pr. Pierre CHAMINADE**, directeur de laboratoire de chimie analytique pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Lip(Sys)². Merci à tous les membres de l'équipe pour nos échanges, votre présence et votre bienveillance. Merci à **Sonia, Danielle, Juliette** et **Martin**.

Un merci particulier à **Dr Sana TFAILI**, merci pour tes conseils et ton aide scientifique et personnelle. Ton optimisme et tes mots adressés à moi tout au long de ma thèse m'ont encouragé fortement à traverser toutes les difficultés rencontrées. Merci pour ta bonne humeur, ta bienveillance et pour tout ce que nous avons partagé.

Je remercie mes collègues de laboratoire, **Aline, Kodjo, Léa, Lucrezia** et **Hélène** qui étaient autour de moi durant cette thèse.

Merci à notre nouvelle Maîtresse de conférences **Joudi BAKAR**, mon amie, ma sœur et mon encadrante durant mon stage de master 2. Merci pour ton soutien à chaque épreuve, ta présence et tes encouragements permanents.

Je tiens à remercier **Hani DAKROUB**, t'avoir en tant qu'ami est une excellente chance. Ton aide, ton soutien et tous les services que tu m'as offerts sont des gestes généreux qui me touchent et que je n'oublierai jamais.

Aux membres de la plateforme SAMM,

Merci à Audrey Solgadi et à Bastien Prost pour leur aide, leur accompagnement et leurs conseils scientifiques.

A mes très chers amis,

Je tiens à remercier, Diana, Afif, Almar, Nadine, Fatima, Melissa, Abdullah, Maria, Raya, Tara, Mary-lynn, EzzRim, Georges, Stephanie, et tous mes amis avec qui j'ai passé de bons moments

Enfin, je termine ces remerciements en dédiant ce travail à ma famille. Un grand merci à mon père **Ahmad Nasser**, ma mère **Joumana**, mes sœurs **Sahar** et **Hiba** et mon frère **Ibrahim**; qui ont sacrifié ce qui est le plus cher à leur cœur pour que je puisse devenir la personne que je suis aujourd'hui. Je vous en suis extrêmement reconnaissant. Merci pour votre amour sans limite, et votre confiance sans faille.

Sommaire

| | |
|--|-----|
| Résumé..... | i |
| Abstract | ii |
| Remerciements | iii |
| Introduction générale..... | 1 |
| Partie 1 : Etude bibliographique..... | 4 |
| I) Structure générale de la peau | 5 |
| 1) Epiderme | 6 |
| 2) Derme..... | 9 |
| 3) Hypoderme..... | 9 |
| 4) Annexes Cutanées | 9 |
| a) Glandes sudoripares..... | 9 |
| b) Glandes sébacées | 10 |
| c) Follicules pileux..... | 10 |
| 5) Fonctions générales de la peau | 10 |
| II) Film hydrolipidique..... | 12 |
| 1) Origine | 12 |
| 2) Composition des LCS | 13 |
| a) Acides gras..... | 14 |
| b) Squalène..... | 15 |
| c) Cires | 15 |
| d) Glycérides | 16 |
| e) Stérols..... | 17 |
| 3) Rôle du film hydrolipidique | 18 |
| III) Stratum corneum | 19 |
| 1) Structure du Stratum Corneum..... | 19 |
| 2) Composition lipidique du <i>Stratum Corneum</i> | 20 |
| a) Acides gras libres | 20 |
| b) Cholestérol | 21 |
| c) Céramides | 21 |
| 4) Hydratation cutanée et fonction barrière..... | 23 |
| a) Absorption d'eau dans le <i>stratum corneum</i> | 23 |
| b) Barrière à la diffusion de l'eau | 24 |
| IV) Rayonnement solaire et ses effets sur la peau | 25 |

| | |
|---|----|
| 1) Le rayonnement solaire..... | 25 |
| a) Les ondes électromagnétiques et le spectre solaire | 25 |
| i) Les ondes électromagnétiques..... | 25 |
| ii) Le spectre solaire..... | 26 |
| b) Les facteurs influençant le rayonnement reçu sur la Terre | 27 |
| i) L'atmosphère terrestre | 27 |
| ii) La nature du sol | 30 |
| 2) Les effets bénéfiques du soleil | 30 |
| a) La synthèse de vitamine D..... | 30 |
| b) Effets bénéfiques sur l'humeur..... | 30 |
| c) Le bronzage et la photo-protection..... | 30 |
| d) La photothérapie..... | 31 |
| e) Épaississement de l'épiderme..... | 31 |
| 3) Peau et soleil | 32 |
| a) Pénétration du rayonnement solaire dans la peau..... | 32 |
| b) Le phototype | 33 |
| c) La dose érythémateuse minimale ou DEM..... | 34 |
| d) Le stress oxydatif : Les Espèces Réactives de l'Oxygène..... | 34 |
| e) Les risques des rayonnements UVA sur la peau | 36 |
| f) Les risques des rayonnements UVB sur la peau | 37 |
| V) La peroxydation lipidique..... | 38 |
| 1) Mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides polyinsaturés | 39 |
| a) L'initiation ou l'amorçage..... | 39 |
| b) La propagation | 40 |
| c) La terminaison | 40 |
| 2) Produits formés au cours de l'oxydation des lipides | 41 |
| 3) Effets du rayonnement solaire sur les lipides cutanés de surface (LCS) | 43 |
| VI) La photoprotection | 46 |
| 1) La photoprotection naturelle | 46 |
| a) Le stratum corneum | 46 |
| b) Le système pigmentaire | 46 |
| c) Les pigments caroténoïdes..... | 47 |
| d) La défense anti-oxydante..... | 47 |
| e) Les systèmes de réparation enzymatique de l'ADN..... | 47 |
| f) L'acide urocanique | 47 |
| 2) La photoprotection artificielle..... | 48 |

| | |
|--|----|
| a) La photoprotection physique : la photoprotection vestimentaire | 48 |
| b) La photoprotection chimique : les Produits de Protection Solaire (PPS)..... | 49 |
| i) La composition des PPS..... | 50 |
| ii) Les propriétés physico-chimiques des PPS..... | 52 |
| VII) Méthodes d'analyse et de caractérisation..... | 54 |
| 1) La spectroscopie vibrationnelle : Principe et instrumentation | 54 |
| 2) La spectroscopie Raman..... | 55 |
| a) Principe de l'effet Raman | 55 |
| b) Appareillage Raman | 56 |
| c) Micro-sonde Raman | 59 |
| d) Interprétation du spectre Raman..... | 61 |
| 3) La spectroscopie infrarouge | 66 |
| a) Principe de la spectroscopie infrarouge : Absorption infrarouge | 66 |
| b) La spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)..... | 67 |
| c) Modes d'analyses en spectroscopie IR..... | 68 |
| d) Imagerie par ATR-FTIR..... | 70 |
| e) Spectres infrarouge de la peau | 70 |
| 4) Analyse des LCS par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse..... | 71 |
| Partie 2 : Méthodologies expérimentales | 74 |
| I) Mise en place du système d'irradiation : | 75 |
| 1) Simulateur de soleil : Solar Light | 75 |
| 2) Mesure de la dose d'irradiation du simulateur solaire : | 76 |
| a) Pyranomètre :..... | 76 |
| b) Radiomètre UV-A UV-B : Vilber..... | 76 |
| 3) Simulateur fibré :..... | 77 |
| II) Mise en place des analyses des effets du rayonnement solaire sur les LCS : | 79 |
| 1) Les analyses par spectroscopie vibrationnelle : | 79 |
| a) Analyse par spectroscopie Raman : | 80 |
| b) Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FT-IR) : | 81 |
| 2) Les analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS) : | 81 |
| a) Préparation des échantillons :..... | 81 |
| i) Préparation des échantillons LCS pour l'analyse en HT-GC/MS avant irradiation :..... | 81 |
| ii) Préparation des échantillons LCS pour l'analyse en HT-GC/MS après irradiation :..... | 82 |
| b) Analyses en HT-GC/MS:..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| III) Mise en place de l'étude des effets du rayonnement solaire sur la cinétique de déshydratation du SC : analyses par spectroscopie Raman | 85 |
| 1) Conception et mise en place d'un protocole optimisé de préparation de l'échantillon, hydratation et irradiation du SC..... | 85 |
| a) Préparation de l'échantillon :..... | 85 |
| b) Stabilisation du SC à humidité relative (HR) élevée : | 85 |
| c) Temps de stabilisation du SC à humidité relative (HR) élevée : | 85 |
| d) Choix de la dose : | 86 |
| e) Irradiation du SC à humidité relative (HR) élevée :..... | 87 |
| 2) Analyses des effets du rayonnement solaire sur l'homéostasie de l'eau du SC : Rôle protecteur des LCS et efficacité des écrans solaires | 90 |
| a) Rôle protecteur des LCS : | 90 |
| i) Préparation des LCS :..... | 90 |
| ii) Irradiation en présence des LCS : | 90 |
| b) Efficacité des écrans solaires :..... | 93 |
| i) Préparation des écrans solaires : | 93 |
| ii) Irradiation en présence des écrans solaires :..... | 93 |
| iii) Préparation des échantillons LCS pour l'analyse en HT-GC/MS après irradiation à travers des écrans solaires :..... | 94 |
| c) Analyse Raman de la cinétique de déshydratation : | 96 |
| i) Microspectromètre Raman : | 96 |
| ii) Spectroscopie Raman de la perte d'eau du SC :..... | 97 |
| IV) Mise en place des analyses par spectroscopie Raman <i>in vivo</i> :..... | 98 |
| Partie 3 : Travaux expérimentaux | 100 |
| Chapitre 1 : Caractérisation de la photo-oxydation des lipides cutanés de surface (LCS) sous rayonnements solaires par spectroscopie vibrationnelle..... | 101 |
| Article 1 : " Characterization of free fatty acids photo-oxidation under UV radiations: A stepwise Raman study" | 104 |
| Article 2 : " Characterization of triglycerides photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman study " | 131 |
| Article 3 : " Skin Surface Lipids photo-oxidation : a vibrational spectroscopy study" | 152 |
| Chapitre 2 :Effets des rayonnements solaires sur l'hydratation du <i>Stratum Corneum</i> : Rôle protecteur des lipides cutanés de surface et efficacité des filtres solaires | 180 |
| Article 4 : " Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration: part I, protective role of Skin surface lipids" | 183 |
| Article 5 : "Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration: Part II, protective action of solar filters" | 206 |
| Chapitre 3 : Etude des effets de doses UV sous érythémateuses sur le SC humain par spectroscopie Raman confocale <i>in vivo</i> | 226 |

| | |
|---|-----|
| Article 6 : “Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy” | 227 |
| Conclusion générale | 251 |
| Perspectives..... | 254 |
| Références..... | 256 |
| Productions scientifiques | 268 |
| Annexes | 270 |

Liste des abréviations

SC : *Stratum Corneum*

LCS : Lipides Cutanés de Surface

AGL : Acides Gras Libres

UV : Ultraviolet

ERO : Espèces Réactives d'Oxygène

MDA : Malondialdéhyde

DEM : Dose Erythémateuse Minimale

FT-IR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

HT-GS/MS : Chromatographie gazeuse à haute température, couplée à la spectrométrie de masse

RHE : Epiderme Humain Reconstituit

PIE : Perte Insensible en Eau

NPLC/HR-MSⁿ : Chromatographie liquide en phase normale, couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution

NMF : Facteurs naturels d'hydratation

UCA : Acide urocanique

TG : triglycérides

DG : Diglycérides

MG : Monoglycérides

SQ : Squalène

SQOOH : Squalène monohydroperoxide

SQO : 2,3-oxidosqualène

OCT : Tomographie en Cohérence Optique

IE : Impact électronique

IC : Ionisation chimique

PPS : Produits de Protection Solaire

SPF : Facteur de Protection Solaire

FPUVA : Facteur de Protection UVA

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Schéma de la structure générale de la peau [9]. | 6 |
| Figure 2 : Structure de l'épiderme [13]. | 7 |
| Figure 3 : Etapes de la différenciation sébocytaire [29]. | 13 |
| Figure 4 : Structure et répartition des différentes classes de lipides cutanés de surface [18]. | 13 |
| Figure 5 : Structure générale des triglycérides, diglycérides et monoglycérides [56]. | 17 |
| Figure 6 : Structure et répartition des principales classes lipidiques du Stratum Corneum. | 20 |
| Figure 7 : Structure chimique du cholestérol et de ses dérivés, contenus dans le SC humain [56]. | 21 |
| Figure 8 : Formule chimique générale des céramides [83]. | 22 |
| Figure 9 : représentation du spectre solaire [14]. | 27 |
| Figure 10 : Représentation des rayonnements solaires arrivant sur Terre [14]. | 28 |
| Figure 11 : Mécanisme de formation d'Ozone [90]. | 29 |
| Figure 12 : Composition du rayonnement solaire et son interaction avec la peau [101]. | 33 |
| Figure 13 : Facteurs endogènes et exogènes conduisant à la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). La chaîne respiratoire mitochondriale et diverses enzymes intracellulaires sont les principaux générateurs endogènes des ERO. La pollution environnementale, les radiations, le tabagisme, certains aliments et les médicaments sont les principales sources exogènes des ERO [109]. | 36 |
| Figure 14 : Schéma général de l'oxydation des lipides [116]. | 39 |
| Figure 15 : Illustration des positions mono-allyliques et bis-allyliques. | 40 |
| Figure 16 : Schématisation de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés [116]. | 41 |
| Figure 17 : Pictogramme apposé sur le vêtement qu'ils sont conforme aux exigences de la norme européenne relative aux vêtements de protection solaire [164]. | 49 |
| Figure 18 : Différents modes de vibration : nombre d'onde. Les modes de vibration des molécules pourraient être classés en deux types : un mode de vibration de valence ou d'élongation (symétriques ou antisymétriques), dont les angles formés entre les liaisons restent constants avec une variation de longueur de ces liaisons et un mode de vibration de déformation où les angles entre les liaisons qui varient. | 54 |
| Figure 19 : Diagramme des niveaux d'énergie impliqués dans la spectroscopie infrarouge, la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman. L'épaisseur des lignes indique qualitativement l'intensité des signaux de chaque transition [18]. | 56 |
| Figure 20 : Schéma du microspectromètre Raman Labram [84]. | 56 |
| Figure 21 : Rendement quantique des détecteurs (CCD et InGaAs) en fonction de la longueur d'onde. Étendue en nm de la gamme spectrale ($100-3000\text{ cm}^{-1}$) en fonction de l'excitatrice [172]. | 59 |
| Figure 22 : Système micro-sonde Raman : (a) source laser, (b) charged coupled device (CCD), (c) Micro-HR, (d1 et d2) shutter laser et shutter spectromètre respectivement, (f) fibre permettant une confocalité de $5\text{ }\mu\text{m}$ et (e) micro-sonde confocale [175]. | 60 |
| Figure 23 : Organisation moléculaire latérale des lipides du SC [72]. | 64 |
| Figure 24 : Schéma de l'interféromètre de Michelson. | 68 |
| Figure 25 : Les principaux modes d'acquisition en spectroscopie FT-IR : (a) mode transmission, (b) mode réflexion et (c) mode réflexion totale atténuée ou ATR [195]. | 69 |
| Figure 26 : Représentation schématique du cristal ATR [18]. | 70 |
| Figure 27 : Profil chromatographique obtenu après analyse en HT-GC/MS, impact électronique, des lipides cutanés de surface [213]. | 73 |
| Figure 28 : Solar Light 16S-300. | 75 |
| Figure 29 : Pyranomètre (Glenside, USA). | 76 |
| Figure 30 : Radiomètre Vilber VLX-3W. | 76 |

Figure 31 : Ocean Optics – DH-2000. 77

Figure 32 : Spectromètre Ocean Optics. 78

Figure 33 : Irradiation cumulée des lipides. 80

Figure 34 : Protocole d'analyse des LCS en HT-GC/MS avant irradiation. 82

Figure 35 : Protocole d'analyse des LCS en HT-GC/MS après irradiation. 83

Figure 36 : Profil chromatographique des LCS obtenu en HT-GC/MS, avec gradient de température.
EI : Etalon Interne (1-eicosanol) [18, 36]. 84

Figure 37 : Boîte de stabilisation du SC 85

Figure 38 : Aire sous la courbe de la bande ν_{OH} ($3100 - 3700 \text{ cm}^{-1}$) du spectre Raman du SC ($n=3$) en fonction de temps de stabilisation. 86

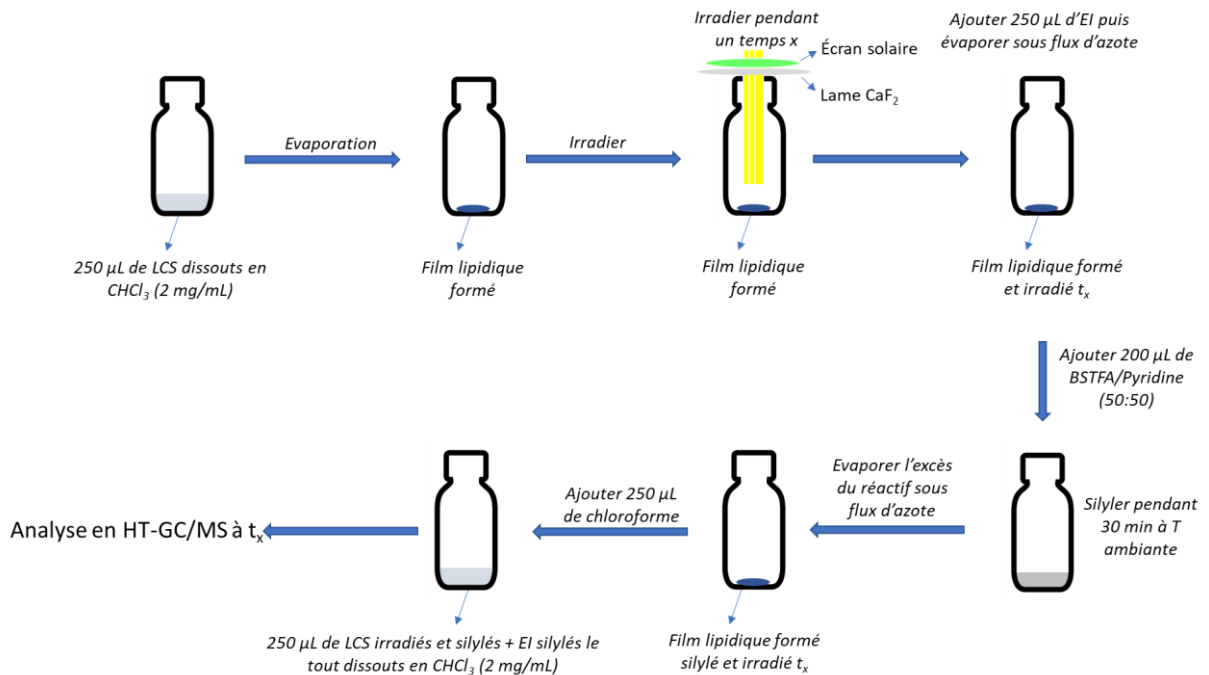
Figure 39 : Irradiation du SC à humidité élevée. 87

Figure 40 : Protocole d'irradiation du SC à humidité relative élevée. 89

Figure 41 : Protocole d'irradiation du SC couvert par des lipides cutanés de surface à humidité relative élevée. 91

Figure 42 : Protocole d'irradiation du SC à travers les lipides cutanés de surface (déposés sur la lame CaF_2) à humidité relative élevée. 92

Figure 43 : Protocole d'irradiation du SC à travers des lipides cutanés de surface et des écrans solaires à humidité relative élevée. 95



..... 95

Figure 44 : Protocole d'analyse des LCS en HT-GC/MS après irradiation à travers des écrans solaires. 96

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Les différents phototypes selon La classification de Fitzpatrick [102]. | 34 |
| Tableau 2 : Caractéristiques de principaux lasers utilisées en spectroscopie Raman [84, 172]. | 57 |
| Tableau 3 : Attribution des bandes et marqueurs Raman in-vivo d'intérêt [84, 177, 178, 186, 191-194]. | 65 |
| Tableau 4 : Détermination de la structure secondaire des protéines [18]. | 71 |
| Tableau 5 : Puissance en mW/cm^2 d'UV-A, d'UV-B et du spectre solaire total. | 77 |
| Tableau 6 : Les doses d'irradiations utilisées. | 87 |
| Tableau 7 : Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses Raman in vivo. | 98 |

Introduction générale

La peau, est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme. Elle possède de nombreuses fonctions : fonction de protection, fonction de thermorégulation, fonction sensorielle, fonction d'échanges et fonctions métaboliques.

Le *Stratum Corneum (SC)* correspondant à la couche la plus superficielle de la peau et dont le compartiment intercellulaire est très riche en lipides, joue un rôle majeur de barrière cutanée, en garantissant une perméabilité suffisante, tout en maintenant l'hydratation nécessaire à la peau. En outre, il joue un rôle important dans la protection de la peau contre les agressions environnementales telles que les rayonnements solaires.

Le film hydrolipidique, recouvrant l'épiderme, constitue l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement. Il contribue à la protection et la propriété barrière de la peau. Les lipides cutanés de surface (LCS) qui le constituent sont un mélange des lipides sébacés et épidermiques et représentent la première barrière aux rayonnements solaires. En effet, ces rayonnements entraînent une photo-oxydation indirecte considérée comme l'effet le plus important de l'irradiation UV sur les LCS. Les produits d'oxydation des lipides sont observés dans la peau humaine et peuvent induire plusieurs pathologies.

Par ailleurs, les LCS jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du SC et par conséquent de l'hydratation de la peau et de la qualité de sa fonction barrière.

In fine, les LCS constituent un élément important à étudier et à analyser afin d'obtenir une meilleure compréhension des phénomènes cutanés physiologiques et pathologiques.

L'objectif de ce travail de recherche est de développer des méthodes analytiques permettant d'étudier l'impact des irradiations solaires sur les LCS ainsi que d'évaluer le rôle de ces lipides dans la protection de la peau contre ces rayonnements. En outre, la protection supplémentaire apportée par les filtres solaires en interaction avec les LCS a été explorée.

Les travaux expérimentaux de cette thèse se découlent en 3 phases successives :

A. Phase 1 :

- Evaluer l'impact des irradiations solaires sur les principales classes lipidiques des LCS :

L'objectif de cette étude consiste à étudier le comportement de chacune des classes lipidiques afin de comprendre l'impact des rayonnements solaires au niveau moléculaire en utilisant les techniques de spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge.

- Evaluer l'impact des irradiations solaires sur les LCS d'origine humaine :
Après avoir caractérisé l'impact de ces irradiations sur chaque classe lipidique individuellement, il est important de déterminer le comportement de ces molécules au sein de la globalité du mélange lipidique des LCS. Les techniques spectroscopiques (Raman et infrarouge) et séparatives (HT-GC/MS) ont été utilisées pour cet objectif.

B. Phase 2 :

- Evaluer l'impact des irradiations solaires sur l'hydratation du SC :
Pour explorer les effets des UV sur le SC, 3 modèles peuvent-être utilisés :
 - Des études réalisées *in vivo* chez l'homme : dans le respect de l'éthique, les doses employées sont de l'ordre de plusieurs Doses Erythémateuses Minimales (DEM). Cependant, la majorité des études s'appuient sur des mesures indirectes de l'état de la barrière cutanée.
 - Des investigations effectuées sur les modèles d'Epiderme Humain Reconstitué (RHE) : jusqu'à présent ces modèles ont été exploités afin d'étudier l'effet des doses modérées (plusieurs DEM) essentiellement sur le matériel génétique et la viabilité des cellules épidermiques.
 - A notre connaissance, une seule étude [1] dans la littérature a mis en avant des effets sur le SC isolé mais cela a été possible en utilisant des doses UV 5000 fois supérieures à la DEM, ce qui rend difficile l'extrapolation des résultats au niveau *in vivo*.

Durant cette thèse, nous avons œuvré pour mettre en place une nouvelle approche afin d'évaluer les effets des rayonnements solaires sur le SC isolé notamment sur l'équilibre hydrique (hydratation et déshydratation) tout en appliquant des doses modérées. L'état de l'hydratation des échantillons a été suivi à l'aide de la spectroscopie Raman.

- Evaluer le rôle des LCS à protéger l'hydratation du SC contre les rayonnements solaires :

Suite à la mise en évidence de l'impact des rayonnements solaires sur le SC, nous nous sommes intéressés à explorer le rôle protecteur des LCS permettant de réduire leurs effets nuisibles sur l'homéostasie de l'eau dans le SC.

- Evaluer le rôle protecteur et synergique de filtres solaires :

Le rôle protecteur des LCS étant limité à des faibles doses, nous avons évalué la capacité et l'efficacité des filtres solaires à protéger les propriétés d'hydratation du SC ainsi que la composition des LCS contre les rayonnements solaires :

La complémentarité entre les données analytiques obtenues par les techniques spectroscopiques (Raman) et séparatives (HT-GC/MS) a permis d'atteindre les objectifs des deux études citées ci-dessus.

B. Phase 3 :

- Etude *in vivo* des doses sous érythémateuses (UVA et UVB) sur le SC humain :

Les études *in vivo* dans la littérature appliquent des doses largement supérieures aux valeurs des DEM et observent l'impact sur la barrière cutanée en se basant sur des mesures indirectes comme la Perte Insensible en Eau (PIE) et la cornéométrie. Nous avons choisi de travailler avec des doses sous érythémateuses dont les effets ne sont pas encore bien élucidés en s'appuyant sur une mesure directe de l'hydratation cutanée et de l'état des lipides et des protéines dans le *Stratum Corneum* par spectroscopie confocale Raman.

Partie 1 : Etude bibliographique

I) Structure générale de la peau

La peau est l'organe le plus large du corps humain ayant une épaisseur allant de 0,5mm à 4-5mm selon la zone corporelle, et une surface d'environ 2m² qui couvre la totalité de la surface du corps humain pour former sa barrière physique, avec un poids qui atteint 5kg pour la totalité ainsi qu'une composition faite à 72% d'eau [2-6]. La peau possède de nombreuses fonctions de protection, de sensation, de circulation ainsi que des fonctions biomécaniques [6]. En effet, cet organe protège le corps humain des agressions extérieures, des contaminations, des rayonnements solaires et des changements climatiques. C'est une barrière physique, chimique et biologique. Afin d'assurer ces rôles, la peau est à la fois imperméable et perméable, propriétés lui conférant ainsi sa fonction de barrière tout en constituant une zone d'échange privilégiée en laissant passer des substances via différents mécanismes (diffusion simple, diffusion facilitée ou diffusion active).

La peau est également responsable d'un système sensoriel complexe impliquant la perception du toucher, de la température, de la douleur, de la démangeaison et du plaisir tactile [7].

La peau est un organe qui évolue naturellement avec le temps. Son évolution est fonction de plusieurs facteurs intrinsèques nommés « l'horloge biologique », et de plusieurs facteurs extrinsèques dont l'exposition aux ultraviolets (UV) [8].

Elle est constituée de trois couches. On trouve de la couche la plus profonde à la couche la plus superficielle : l'hypoderme, le derme et l'épiderme, lui-même recouvert d'un film hydrolipidique.

Chaque couche constitutive de la peau est elle-même constituée de différents types cellulaires, donnant à ces structures des fonctions bien distinctes.

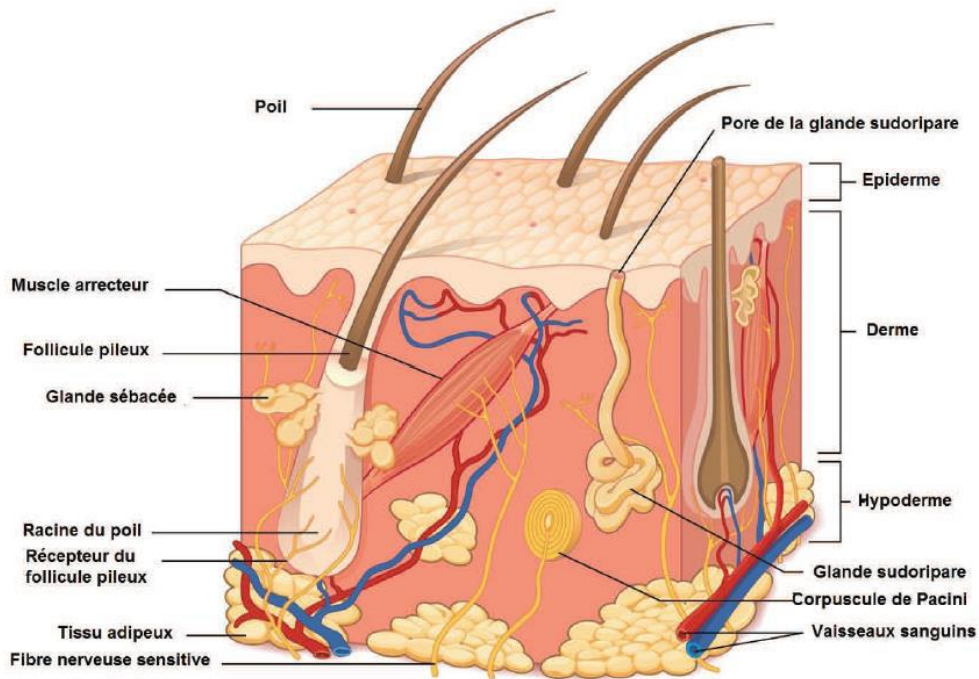


Figure 1 : Schéma de la structure générale de la peau [9].

1) Epiderme

L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau, très résistante, et la plus fine. Il assure le contact avec l'environnement extérieur avec une épaisseur qui 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 [10, 11]. C'est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé non vascularisé [12].

L'épiderme se subdivise en plusieurs couches (Figure 2). Dans la plupart des régions du corps, il en compte quatre, soit la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée, très mince. Aux endroits exposés à une friction intense, le bout des doigts, la paume des mains et la plante des pieds, par exemple, l'épiderme comprend une cinquième couche, la couche claire, située entre la couche granuleuse et la couche cornée.

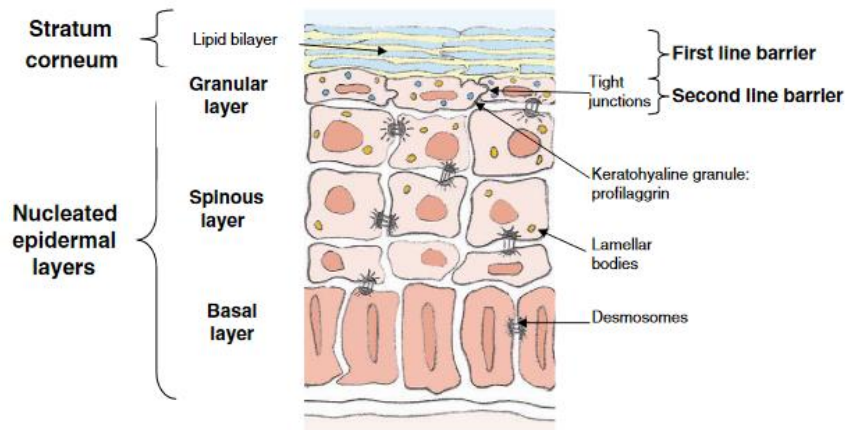


Figure 2 : Structure de l'épiderme [13].

L'épiderme est constitué de quatre ou cinq couches cellulaires (peau fine ou peau épaisse) dans lesquelles on trouve quatre types de cellules :

- **les kératinocytes** : cellules les plus nombreuses, elles représentent 80% de la population cellulaire de l'épiderme [14].
- **les mélanocytes** : cellules présentes seulement dans la couche basale de l'épiderme qui sont capables de synthétiser la mélanine (sous forme de granules appelés mélanosomes). La mélanine protège les cellules en absorbant les rayons ultraviolets du soleil qui pourraient endommager leur ADN [14].
- **les cellules de Langerhans** : cellules appartenant au système immunitaire qui défendent l'organisme contre les agressions extérieures.
- **les cellules de Merkel** : cellules nerveuses qui jouent le rôle de récepteur sensoriel (toucher) [15].

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. La couche basale est parfois appelée couche germinative, ou stratum germinativum. 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 [14, 16].

- La couche épineuse (*Stratum Spinosum*) :

Elle est située au-dessus de la couche basale dont les cellules s'attachent entre elles par des desmosomes. Ces cellules sont polygonales dans les couches inférieures puis s'aplatissent dans les couches supérieures et s'organisent d'une manière permettant la formation de plusieurs couches. Ce sont les cellules d'amplification transitoire des kératinocytes (ou « amplificatrices ») issues de leur migration de la couche basale. Elles sont nucléées et kératinisées [14].

- La couche granuleuse (*Stratum Granulosum*) :

Aussi appelée « stratum granulosum », elle comporte 3 assises de cellules granuleuses aplaties : les kératinocytes qui sont dans leur phase terminale de différenciation [14]. Ces cellules contiennent des grains de kératohyaline riches en protéines et des granules lamellaires (les kératinosomes (ou corps lamellaires d'Odland)) riches en lipides. Cette couche participe à la formation du ciment intercornéocytaire de la couche cornée [4].

- La couche claire (au niveau palmo-plantaire) :

Egalement appelée « stratum lucidum », cette couche cellulaire est retrouvée uniquement dans les épidermes épais. Elle est composée d'une seule strate de cellules translucides, d'où son appellation de « couche claire » Elle correspond à la phase de transition entre la couche granuleuse et la couche cornée [14].

-La couche cornée (*Stratum Corneum*) :

La couche cornée constitue la couche la plus superficielle de l'épiderme. La couche cornée comprend environ 15 à 20 couches des kératinocytes [4] qui sont totalement différenciés en cellules polyédriques plates anucléées très riches en kératine et entourées d'une enveloppe cornée : on les appelle les « cornéocytes ». Ces cellules ont perdu leur noyau et leurs organelles cytoplasmiques, pour cela elles sont considérées comme des cellules mortes [14]. Les cornéocytes sont intégrés dans un ciment intercornéocytaire riche en lipides qui joue un rôle très important dans la fonction de la barrière cutanée [16]. Les cornéocytes les plus superficiels se détachent du stratum corneum et desquament. La couche cornée est divisée en deux couches : la couche la plus profonde est le *Stratum Compactum* qui se situe

directement au-dessus de la couche granuleuse et la partie supérieure est le *Stratum Disjunctum* [17].

2) Derme

Il s'agit d'une couche de tissus conjonctifs située sous l'épiderme qui contient des fibres musculaires lisses, des fibres collagènes et des fibres élastiques.

Il est composé de 2 couches :

- Couche papillaire qui est au contact de l'épiderme (couche basale). Elle est très vascularisée et possède une structure fibreuse et ordonnée constituée de fines fibres de collagène. Cette couche est zone d'échanges nutritifs avec les couches de l'épiderme.

- Couche réticulaire : composée de fibre collagène (élastique et épaisse). Elle est directement en contact avec l'hypoderme. Cette couche profonde dispose d'une structure dense en fibres et désordonnée, possédant des grosses fibres de collagène [18].

Le derme est constitué d'eau à 80%, de cellules fixes (les fibroblastes) et de cellules mobiles correspondant aux cellules migratrices de défense (mastocytes, leucocytes et macrophages).

Le derme permet l'implantation de toutes les annexes cutanées : glandes et canal excréteur des glandes sudoripares, bulbes des poils et glandes sébacées [4, 14].

3) Hypoderme

C'est la couche la plus profonde de la peau. C'est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé. Il est composé d'adipocytes qui stockent les graisses. Il constitue un isolant thermique important et un protecteur mécanique essentiel.

4) Annexes Cutanées

a) Glandes sudoripares

Les glandes sudoripares, également appelées glandes sudorales existent en deux types : les glandes sudoripares eccrines et les glandes sudoripares apocrines [19].

Les glandes sudoripares eccrines, indépendantes des follicules pileux, sont réparties sur l'ensemble de la surface corporelle et débouchent à la surface cutanée à travers d'un pore.

Elles excrètent une grande partie de la sueur dont le rôle majeur est de refroidir l'organisme. Elles permettent également le maintien du pH cutané, l'hydratation cutanée et possèdent une fonction immunologique.

Les glandes apocrines sont liées au poil puisqu'elles débouchent dans le follicule pileux. Elles sont localisées autour de l'oreille, sous l'œil, sous les aisselles, autour de l'aréole du sein, du nombril et dans les régions génitales. Elles excrètent la sueur lors de températures élevées et vont être responsables de l'odeur corporelle [2, 20, 21].

b) Glandes sébacées

Les glandes sébacées sont des glandes vascularisées réparties sur l'ensemble de la surface corporelle sauf au niveau des paumes des mains et plantes des pieds et sont impliquées dans la sécrétion du sébum qui fait partie du film hydrolipidique [2].

La sécrétion sébacée varie selon divers paramètres, tels que la température, le sexe, l'âge, les régions du corps, et la période du cycle menstruel chez la femme.

Ce sébum ayant une fonction fongistatique et bactériostatique, elles jouent donc un rôle important dans la protection de l'épiderme contre les agressions extérieures et participent à la bonne tenue du *stratum corneum* ; ainsi qu'un rôle de protection contre le rayonnement solaire [2, 20, 21].

c) Follicules pileux

Ils constituent la base des poils et des cheveux. Chaque follicule est associé à une glande sébacée, on parle alors de follicule pilosébacé. Ils sont présents, chez l'homme, sur la quasi-totalité de la surface corporelle, sauf les paumes et les plantes. Les poils possèdent des rôles de protection contre le soleil et le froid ainsi qu'une fonction tactile pour les cils [2, 20, 21].

5) Fonctions générales de la peau

La peau constitue un organe indispensable, jouant de nombreux rôles importants et variés, interconnectés les uns aux autres, parmi lesquels [22, 23] :

- Auto-entretien et auto-réparation, grâce aux processus de réparation et de cicatrisation.
- Protection mécanique contre les chocs et les cisaillements.

-Protection chimique limitant l'absorption de substances exogènes et permettant la conservation de l'eau et des substances endogènes nécessaires.

- Protection microbiologie contre les bactéries pathogènes.

- Protection contre les rayons UV.

- Fonction neurosensorielle permettant la perception de la température et de la douleur.

- Fonction de thermorégulation.

- Fonctions immunitaires en formant la première barrière de défense dans le processus d'immunité.

- Fonction métabolique passant par la synthèse de la vitamine D, mais également par la conversion de la testostérone en di-hydrotestostérone.

Au sein de sa composition, la peau contient une quantité importante de lipides au niveau du film hydrolipidique et dans le Stratum Corneum. Ces lipides sont d'une importance primordiale et permettent le maintien de l'homéostasie cutanée. Ils possèdent un rôle important dans l'état de la barrière cutanée. L'étude des effets du rayonnement solaire sur ces lipides représentent un enjeu majeur dans la compréhension du rôle du film hydrolipidique dans la protection de la barrière cutanées contre les rayons UV.

II) Film hydrolipidique

1) Origine

Le *Stratum corneum*, la couche la plus externe de l'épiderme, est recouvert d'un film hydrolipidique, constitué d'une phase lipidique et d'une phase aqueuse provenant majoritairement de la sueur. La phase lipidique correspondant aux "lipides cutanés de surface" (LCS) est constituée d'un mélange complexe de lipides sécrétés par le sébum, avec une contribution (3-6%) de lipides d'origine épidermique [24, 25].

La quantité de lipides à la surface de la peau varie selon la zone corporelle, allant de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sur les jambes, 34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sur le dos, à $189 \pm 42,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sur le front où la quantité de sébum est la plus importante [26].

Les glandes sébacées sont des glandes exocrines qui sont souvent associées à la partie supérieure du follicule pileux et forment ainsi l'unité pilo-sébacée. Elles sont retrouvées sur toute la surface cutanée, hormis la paume des mains et la plante des pieds. Les sébocytes contenus à l'intérieur de la glande sébacée libèrent leur contenu par sécrétion holocrine (rupture de leur membrane cellulaire et désintégration de la cellule) [27].

Les sébocytes existent à divers stades de différenciation et de maturation au sein des glandes sébacées. La couche la plus externe de la glande, couche germinative, est constituée de petits sébocytes indifférenciés en mitose active à partir des cellules souches sébocytaires. Ces sébocytes cessent alors de se différencier et migrent dans la lumière de la glande. Cette période s'appelle la maturation, pendant laquelle les sébocytes sont chargés de gouttelettes lipidiques et de l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des lipides. La différenciation terminale se produit après cette étape, qui se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, la synthèse de lipides et l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et la dégénérescence nucléaire. Une fois la différenciation terminée, les sébocytes se désintègrent et libèrent leur contenu au centre de la glande sébacée, qui déverse ensuite leur sébum dans un canal excréteur commun débouchant dans le canal folliculaire (Figure 3) [28].

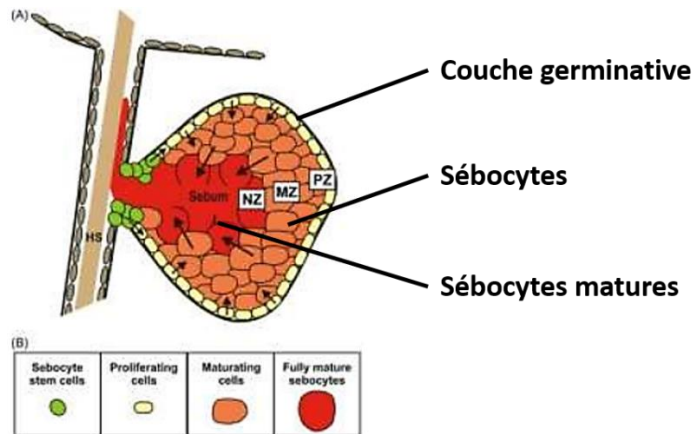


Figure 3 : Etapes de la différenciation sébocyttaire [29].

2) Composition des LCS

Les lipides cutanés de surface (LCS) représentent un mélange complexe de lipides, contenant majoritairement des triglycérides, des cires et du squalène [23, 24, 30]. Les triglycérides sont partiellement hydrolysés sous l'influence des lipases des microorganismes de la flore cutanée, donnant des acides gras libres, des diglycérides, des monoglycérides et du glycérol [25-27].

Par ailleurs, la desquamation épidermique est à l'origine de la libération, à la surface cutanée, de cholestérols libres ou estérifiés avec des acides gras (Figure 4).

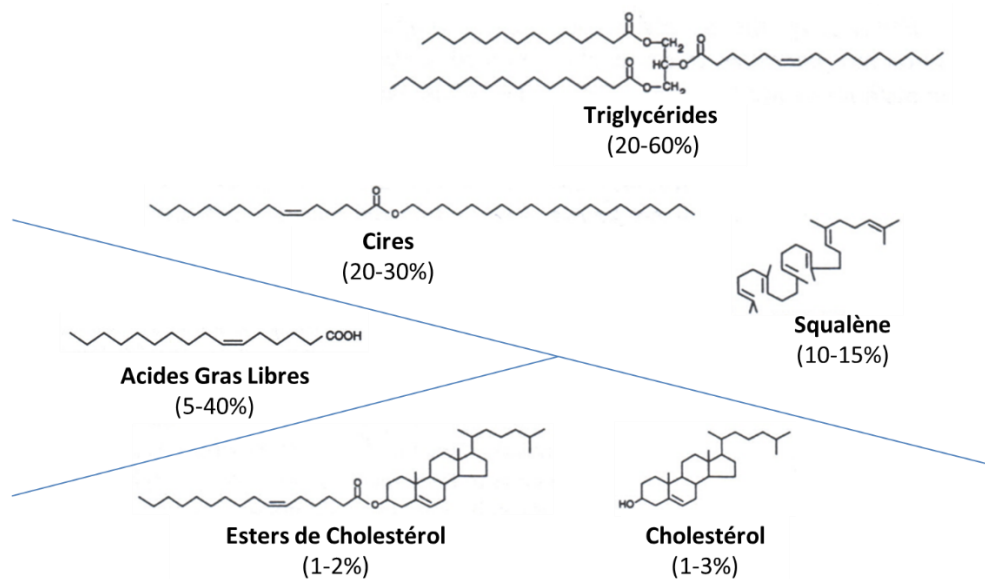


Figure 4 : Structure et répartition des différentes classes de lipides cutanés de surface [18].

Selon les travaux de Greene et al. [24], les triglycérides et les acides gras libres constituent la plus grande partie du sébum (57,5%), suivis des cires (26%) et du squalène (12%). Les esters de cholestérol représentent environ 4,5 % des lipides totaux. Cependant, une forte variabilité interindividuelle est observée, et la composition peut être modifiée par des changements de facteurs individuels tels que la concentration en enzyme, le pH ou la température extérieure [28, 31-33].

a) Acides gras

Ils existent dans les lipides cutanés sous forme libre ou estérifiée, *i.* par le glycérol (glycérides), *ii.* par des alcools gras (cires), *iii.* par des stérols (principalement le cholestérol). Ils proviennent à la fois de la glande sébacée et de l'épiderme [25].

Les acides gras libres, constituant 5 à 40 % des LCS, ne contiennent que 37 % d'acides gras essentiels, saturés ou insaturés en C14, C16, C18, tels que l'acide palmitique (C16 : 0), l'acide stéarique (C18 : 0), l'acide oléique (C18 : 1) et l'acide linoléique (C18 : 2) [34].

Les acides gras cutanés ont des longueurs de chaîne à nombre pair ou impair d'atomes de carbone, sont linéaires ou méthylés à différentes positions. Les longueurs de chaîne de la plupart des acides gras vont de C10:0 (acide décanoïque) à C24:1 (acide tétracosanoïque) [34-36]. L'acide sapiénique (C16:1 Δ 6) est le lipide majoritaire dans les acides gras comportant 16 et 18 atomes de carbone qui sont les plus représentés au sein des LCS. Les acides gras libres à chaîne courte peuvent également être trouvés en petites quantités [36].

Le degré d'insaturation augmente avec le nombre d'atomes de carbone [34, 37]. La présence d'une double liaison entre les carbones 6 et 7 est caractéristique des AG cutanés, mais les doubles liaisons entre les carbones 9 et 10 se retrouvent également dans la peau. Les AG insaturés en position Δ 6 sont presque tous d'origine sébacée, tandis que les AG insaturés en position Δ 9 sont majoritairement d'origine épidermique [31]. Downing et Greene [38] ont montré que, quelle que soit la position de l'insaturation (Δ 6 ou Δ 9), la plupart des composés insaturés contiennent une chaîne C16, tandis que dans les autres tissus, la plupart des composés insaturés contiennent une chaîne C18.

Les acides gras libres semblent provenir majoritairement de l'hydrolyse des triglycérides, au vu de la relation inverse entre les concentrations de ces deux types de constituants, et de

l'absence de quantités détectables d'alcools gras libres censés être produits lors de l'hydrolyse de cires [39].

b) Squalène

Le squalène est un hydrocarbure triterpénique composé de 30 atomes de carbone ($C_{30}H_{50}$). Il est le marqueur de la fonction des glandes sébacées chez l'humain [40, 41], dont les proportions varient selon la région du corps, principalement présent sur le front, représentant 10% à 15% du LCS [24].

C'est un intermédiaire important dans la biosynthèse du cholestérol et il a diverses fonctions en tant qu'émollient, antioxydant ainsi que pour l'hydratation [42].

En raison de sa structure chimique avec un nombre élevé d'insaturations, il est très sensible aux réactions de peroxydation. Le monohydroperoxyde de squalène (SQOOH) est le premier produit d'oxydation [43]. Le 2,3-oxidosqualène ou 2,3-epoxysqualène (SQO) a également été retrouvé dans les LCS [36].

c) Cires

Esters d'acides gras et d'alcools gras à longues chaînes, ces composés sont synthétisés puis libérés par la glande sébacée. Les alcools gras sont formés par réduction des acides gras [34].

Les grandes longueurs de chaîne carbonée rendent ces composés solides à l'état naturel, et participent donc à la viscosité du film hydrolipidique. Les cires représentent, selon les régions anatomiques, entre 13 et 27% des lipides cutanés de surface [25].

Les cires identifiées sont comprises entre le myristate de myristyle ($C_{28}H_{56}O_2$) et le lignocérate de palmitoléyle ($C_{40}H_{76}O_2$). Il existe des cires saturées et insaturées dans lesquelles la fraction acide et/ou la fraction alcool peut être insaturée. Les cires des LCS ont une grande proportion d'acides gras à chaîne ramifiée et une proportion importante d'insaturations [34, 37].

Les principales espèces d'acides gras identifiées sont l'acide hexadécanoïque ($C_{16:0}$) et l'acide hexadécénoïque ($C_{16:1}$), suggérant l'importance de l'acide palmitique et de son homologue insaturé dans le film hydrolipidique.

Karkkainen et al. [44] et Nicolaidis et al. [45] ont mentionné la rareté des acides gras supérieurs à C_{18} dans les cires par rapport aux acides gras présents dans les autres esters.

La structure des alcools gras dans les cires humaines est étroitement liée à la structure des acides gras. Il est en effet possible de rencontrer des composés de structures très différentes : chaînes à nombre pair ou impair de carbones, ramifiées ou non, saturées ou insaturées (principalement en $\Delta 6$) [31]. Les chaînes d'hydrocarbures saturés et monoinsaturés ont une longueur comprise entre C12 et C24, avec une grande proportion de composés C20, C22 et C24 [46]. Au sein des lipides cutanés, les alcools gras ne sont présents que dans les cires. Ils sont principalement synthétisés par la glande sébacée [47].

A l'inverse des triglycérides, les cires ne sont pas hydrolysées, aucun alcool gras, produit d'une éventuelle coupure, n'a été détecté à la surface de la peau. Apparemment les lipases bactériennes et épidermiques semblent incapables d'hydrolyser les cires [39, 48].

d) Glycérides

Les triglycérides (TG) sont des triesters d'acides gras formés d'une molécule de glycérol et de trois acides gras. Si les trois acides gras sont identiques, ils peuvent être des TG simples ou mixtes si les chaînes d'acides gras sont différentes.

Après leur sécrétion et sous l'influence des lipases des microorganismes de la flore cutanée, les triglycérides sont partiellement hydrolysés [34, 49]. Cette hydrolyse entraîne la libération de glycérol, d'acides gras libres (AGL), de monoglycérides (MG) et de diglycérides (DG) [50-54] (Figure 5), entraînant une augmentation des niveaux d'acides gras libres présents à la surface de la peau [34, 49, 50, 55]. Les triglycérides et leurs composés d'hydrolyse représentent l'entité majeure des LCS, 55 à 65% selon les régions corporelles [24].

Dans le LCS, les glycérides comprennent des AG avec des longueurs de chaîne comprises entre C12 et C18. Cinq monoglycérides ont été identifiés, allant de C14 à C18, dont la monopalmitine est le MG prédominant. Pour les diglycérides, le nombre total de carbones varie entre C34 et C39 au sein des LCS. Le nombre total de carbone des triglycérides identifiés était compris entre C45 et C54. De plus, la plupart des TG sont constitués de TG mixtes avec des chaînes hydrocarbonées de différentes longueurs dans le même composé [36].

De petites quantités de di- et triglycérides dérivés de la glande sébacée se trouvent également dans la matrice lipidique du SC [52, 53]. Ils ont des effets sur la différenciation épidermique et

la fonction barrière cutanée. En effet, l'hydrolyse des TG forme des acides gras nécessaires à la synthèse des oméga-O-acylcéramides, présents dans l'enveloppe cornifiée.

Des études lipidomiques ont montré que ces glycérides dérivés du sébum pénètrent progressivement dans le SC. Une quantité stable est retrouvée à des profondeurs d'environ 5 à 7 couches de cellules dans SC [54].

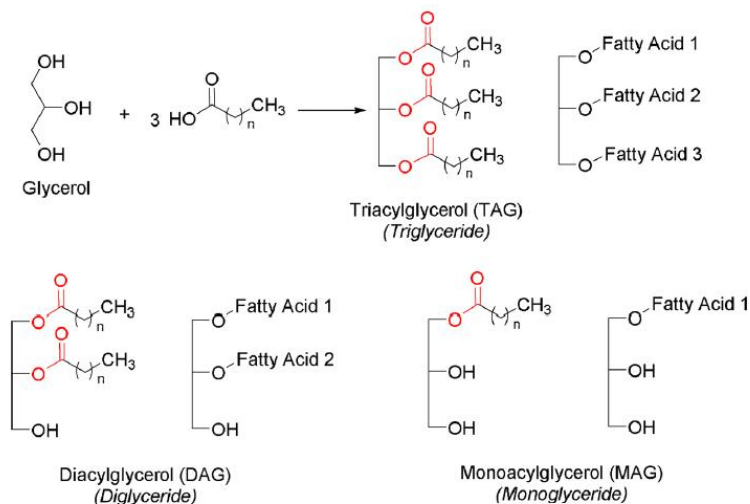


Figure 5 : Structure générale des triglycérides, diglycérides et monoglycérides [56].

e) Stérols

Cette classe est constituée de stérols libres et estérifiés avec des acides gras libérés par le sébum ou l'épiderme. Ce sont des marqueurs importants de l'épiderme [24, 40]. En fait, leurs contributions sont directement liées à la dynamique de la kératinisation.

Strauss et al. [40] ainsi que Green et all. [24] ont démontré que la glande sébacée produisait du squalène et peu ou pas de cholestérol, alors que l'épiderme synthétisait du cholestérol sans accumulation de squalène.

La desquamation de l'épiderme est à l'origine de la libération de cholestérol libre et cholestérols estérifiés par des acides gras à la surface de la peau. L'augmentation du nombre de stérols dans le LCS reflète une augmentation du renouvellement épidermique [40].

- Stérols libres :

Le cholestérol est un marqueur de la desquamation cutanée [57, 58] et est le stérol libre prédominant. C'est un composant de la membrane cellulaire [59] et représente 1 à 2% des LCS.

Le lanostérol, un intermédiaire de synthèse du cholestérol dérivé du squalène, est également présent dans le LCS [36].

- Stérols estérifiés :

Les stérols libres sont synthétisés par l'épiderme puis estérifiés avec des acides gras issus du sébum ou de l'épiderme [45]. Les stérols estérifiés par les acides gras essentiels sont des composés nécessaires au processus normal de kératinisation [60].

Les chaînes d'acides gras attachées aux stérols sont généralement monoinsaturées et plus rarement ramifiées [25]. Les esters de cholestérol identifiés dans les LCS ont des acides gras avec des longueurs de chaîne entre C14 et C18 [36]. Le composé le plus abondant observé est le « cholesteryl hexadecenoate ».

3) Rôle du film hydrolipidique

Les différents rôles du film hydrolipidique, notamment ceux des LCS, sont encore mal connus aujourd'hui et font l'objet de diverses études [61, 62], mais il représente un acteur important de la fonction barrière cutanée [63-65].

Le film hydrolipidique régule principalement l'homéostasie de la peau et protège la peau du dessèchement et des températures élevées. Il joue ainsi un rôle important dans le maintien de l'hydratation du SC [66]. Il offre également une protection contre les effets toxiques du stress oxydatif comme les rayons UVB et aide à lutter contre le vieillissement grâce à la présence d'antioxydants dans sa composition, en particulier la vitamine E (tocophérol) [59, 61, 67].

La fonction antioxydante du sébum peut être importante, car la formation d'espèces réactives de l'oxygène à la surface de la peau pourrait provoquer une dégradation de la barrière cutanée et certains des signes du vieillissement

Les acides gras contribuent au pH de la surface cutanée [57, 68, 69]. Un acide particulier (l'acide sapiénique, C16:1Δ6) présente une forte activité antimicrobienne [70].

Des déséquilibres dans la composition et/ou la quantité de sébum peuvent être associés à diverses pathologies cutanées, telles que l'acné et la dermatite atopique. Par conséquent, le maintien de la stabilité de la quantité totale et de la composition de LCS est d'une grande importance pour protéger les propriétés de la barrière cutanée.

III) Stratum corneum

Le *stratum corneum* est la couche superficielle de l'épiderme, et ses compartiments intercellulaires sont riches en lipides et jouent un rôle important de barrière cutanée, assurant une perméabilité adéquate tout en maintenant l'hydratation requise par la peau. Les facteurs naturels d'hydratation (NMF), qui représentent un mélange de molécules hygroscopiques, sont également présents dans le SC. Ils contiennent des acides gras libres, de l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA), de l'urée, des ions lactate et des sucres. Ces NMF aident à retenir les molécules d'eau dans le SC. Puisque la fonction principale de la peau est de former une barrière entre l'environnement interne et l'environnement externe agressif, une barrière osmotique pour empêcher la perte d'eau et d'électrolytes est essentielle.

Cette barrière est principalement médiée par des membranes lamellaires riches en lipides situées dans l'espace extracellulaire du *stratum corneum*. Dans le SC, les lipides intercellulaires représentent 15 % du poids sec total [71]. Ces membranes riches en lipides ont une structure unique, contenant environ 50 % de céramides, 25 % de cholestérol et 15 % d'acides gras libres, et sont très pauvres en phospholipides [72]. Les corps lamellaires formés lors de la différenciation des kératinocytes jouent un rôle clé dans le transport des lipides des cellules du *stratum granulosum* vers l'espace extracellulaire du *stratum corneum*.

Les corps lamellaires contiennent principalement des glucosylcéramides, des sphingolmyélines, des phospholipides et du cholestérol. Après exocytose des lipides lamellaires dans l'espace extracellulaire du *stratum corneum*, ces lipides précurseurs sont convertis en céramides et en acides gras par la β -glucocérébrosidase et la sphingomyélinase [73].

1) Structure du Stratum Corneum

Le SC a une structure globale relativement simple avec des cellules appelées cornéocytes reliées par des desmosomes. L'ensemble est imbibé dans une matrice de lipides qui remplit l'espace intercellulaire [74, 75]. Cela a incité sa comparaison à une structure en "brique et mortier" originellement décrite par Michaels et al. [76]; où les cornéocytes forment les «briques» et les lipides extracellulaires représentent le «mortier». L'épaisseur entière du SC est évaluée entre 15-20 μm .

2) Composition lipidique du *Stratum Corneum*

Les lipides du mortier remplissent les espaces entre les cornéocytes et sont constitués d'un mélange très complexe de céramides (50 %), de cholestérol (25 %) et d'acides gras libres (15 %) dans des proportions très variables entre individus et en fonction du site anatomique analysé [72, 77]. Le maintien d'une fonction barrière cutanée efficace résulte en partie de l'équilibre entre ces trois familles de lipides [78]. D'autres classes lipidiques représentées en plus faibles proportions sont également présentes telles que les esters de cholestérol (10%) et le sulfate de cholestérol (2-5%) [71, 72, 79].

L'organisation supramoléculaire de ces lipides constitue l'élément majeur de la propriété barrière cutanée.

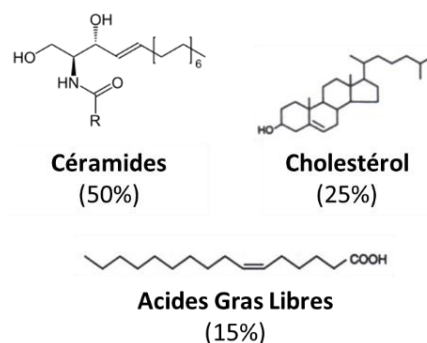


Figure 6 : Structure et répartition des principales classes lipidiques du *Stratum Corneum*.

a) Acides gras libres

La classe des acides gras libres (AGL) est considérée comme essentielle dans le SC [72]. Les AGL ont des chaînes hydrocarbonées non ramifiées avec un nombre de carbone compris entre C16 et C36, terminée par une fonction acide carboxylique (-COOH) qui contribue à l'acidité de la peau. Dans le SC humain, les AGL les plus abondants sont saturés, l'acide lignocérique (C24:0) et l'acide cérotique (C26:0) représentant à eux seuls 50 % du poids total de ces lipides [80]. Les AGL avec des longueurs de chaîne plus courtes, comme l'acide palmitique (C16:0) ou l'acide stéarique (C18:0), sont principalement situés près de la surface du SC. Il existe également en faibles quantités des AGL monoinsaturés (acide oléique, C18 :1) et polyinsaturés (acide eicosapentaénoïque (EPA), C20 :5 ; acide docosahexaénoïque (DHA), C22 :6 ; acide linoléique, C18 :2) et qui représentent 25 % des lipides totaux [53].

La composition des AGL varie selon le site anatomique par exemple, au niveau du SC humain, on observe une proportion plus importante au sein du visage et de l'abdomen comparé à la jambe et à la plante des pieds [3].

Ces AGL jouent un rôle important dans la synthèse des céramides, qui sont utilisés pour régénérer les AGL du ciment intercellulaire [81, 82].

b) Cholestérol

Le cholestérol et ses dérivés sont des stéroïdes lipophiles (Figure 7). Le cholestérol constitue environ 25 % de la teneur en lipides du SC. Il joue un rôle important dans la fluidité et la rigidité du SC en favorisant une bonne structure lamellaire et latérale des lipides. Les esters de cholestérol représentent environ 10 % des lipides SC. Les dérivés sulfatés du cholestérol sont des composants mineurs, représentant 2 à 5 % des lipides totaux du SC. Leur fonction n'est pas actuellement bien élucidée, mais ils semblent impliqués dans la régulation de la cohésion et de la desquamation au sein du SC.

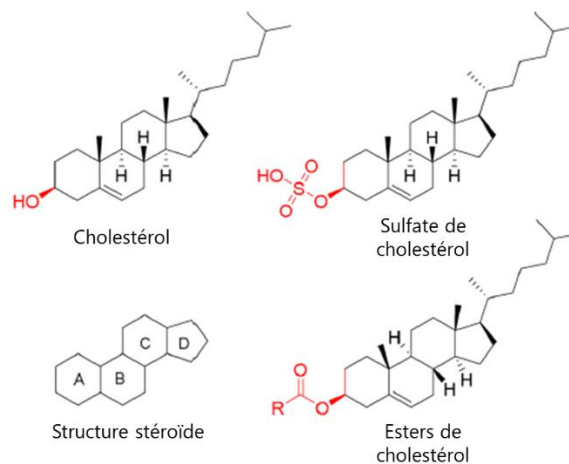


Figure 7 : Structure chimique du cholestérol et de ses dérivés, contenus dans le SC humain [56].

c) Céramides

La classe des céramides représente 50% des lipides du ciment intercornéocytaire [72]. 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.

Ils sont constitués d'une partie acide gras, liée à une base sphingoïde par une liaison amide (Figure 8) [81].

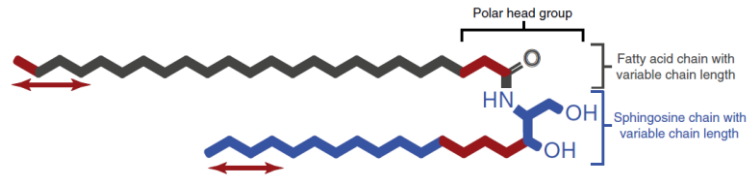


Figure 8 : Formule chimique générale des céramides [83].

Dans le SC, cinq bases sphingoïdes différentes ont été recensées [81] :

- S : sphingosine
- dS : dihydrosphingosine ou sphinganine
- P : phytosphingosine
- H : 6-hydroxy-sphingosine
- T : dihydroxysphinganine

Ces bases sphingoïdes, peuvent être associées à différents types d'acides gras [81] :

- N : acide gras non hydroxylé, non estérifié
- A : acide gras α -hydroxylé
- O : acide gras ω -hydroxylé, lié à l'enveloppe des cornéocytes [16].
- EO : acide gras ω -estérifié par l'acide linoléique (C18:2)
- 1-O-E : contient une chaîne d'acide gras supplémentaire. Le groupement hydroxyle en position 1 de la base sphingoïde est estérifié avec une chaîne d'acyle saturée.

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.

4) Hydratation cutanée et fonction barrière

Le derme est constamment alimenté en eau par la circulation sanguine. Dans le derme, une partie de l'eau existe sous forme de gel attaché à de nombreuses macromolécules hydrophiles. Bien que ces molécules aient de fortes capacités de captation d'eau, une fraction des molécules reste mobile et diffuse jusqu'à l'épiderme, première barrière protectrice vis-à-vis du milieu extérieur. En plus de l'eau perdue par transpiration, une partie de l'eau est perdue par évaporation. Dans des conditions physiologiques normales, cette Perte Insensible en Eau (PIE) est d'environ 5g/m².h.

Entre le derme fortement hydraté et l'épiderme, un gradient décroissant existe et devient plus évident entre les couches épidermiques les plus profondes et le SC. En particulier, alors que toutes les couches vivantes de l'épiderme (*stratum basale*, *SB*, *stratum spinosum*, *SS*, et *stratum granulosum*, *SG*) présentent un niveau d'hydratation élevé, une chute brutale de l'hydratation suit la transition entre *SG* et *SC*. A ce niveau, le taux d'hydratation chute à 30% puis à 15% environ dans les couches les plus superficielles [84].

Dans le *SC*, qui se caractérise par des cellules différenciées très spécifiques, deux facteurs principaux régulent la perméabilité à l'eau : a) Adsorption de l'eau par des Facteurs Naturels d'Hydratation (NMF) constituant une barrière statique et b) la limitation de la diffusion de l'eau à travers le *SC* en raison de la présence d'une matrice lipidique intercornéocytaire qui représente une barrière hydrophobe plus dynamique.

a) Absorption d'eau dans le *stratum corneum*

En raison de leurs propriétés hygroscopiques, le NMF, le glycérol [85] et l'acide hyaluronique lient l'eau dans le *SC* et absorbent l'humidité de l'atmosphère, fournissant ainsi une hydratation suffisante pour aider à garder la peau souple et faciliter diverses réactions enzymatiques [86].

Les NMF sont contenus dans les cornéocytes. Ils sont constitués essentiellement d'acides aminés libres (40%) et de leurs dérivés comme le pyrrolidone carboxylate (PCA) et l'acide urocanique (UCA). Les sels d'acide lactique (12%), importants pour le maintien de l'acidité à la surface du *SC*, l'urée (8%) et divers sels minéraux sont également présents. L'absorption d'eau est en partie due à une pression osmotique élevée, qui augmente avec la différenciation des

cornéocytes, associée à une augmentation des acides aminés, des métabolites de faible masse moléculaire tels que les lactates et d'autres à l'intérieur des cornéocytes. Cette différence de pression intra-et extra-cellulaire conduit à un transfert d'eau vers l'intérieur des cornéocytes. La filaggrine est nécessaire à la synthèse et à la libération des acides aminés du NMF et est une protéine essentielle à l'hydratation de la peau. Il est produit dans les kératinocytes du SG sous la forme de la profilaggrine précurseur. Au niveau SG-SC, la sous-unité filaggrine subit une protéolyse, qui va générer les acides aminés qui composent le NMF [87].

b) Barrière à la diffusion de l'eau

Le rôle de la matrice lipidique est crucial dans la régulation de la perméabilité à l'eau. Il représente une barrière hydrophobe à la désorption de molécules d'eau à travers les espaces inter-cornéocytaires. Les lipides présents dans la matrice inter-cornéocytaire sont : les céramides, les acides gras libres et le cholestérol. Dans des conditions physiologiques normales, les céramides, les acides gras et le cholestérol forment un réseau supramoléculaire organisé de manière optimale pour assurer des flux d'eau transépidermiques modérés. Les céramides jouent un rôle majeur dans les lipides impliqués dans la formation de la matrice lipidique extracellulaire et donc dans le flux d'eau à travers SC.

En général, des modifications quantitatives et/ou qualitatives d'une ou plus de ces trois classes, entraîne une barrière cutanée anormale caractérisée par une augmentation de la PIE et des modifications dans l'organisation supramoléculaire de la matrice [88].

IV) Rayonnement solaire et ses effets sur la peau

1) Le rayonnement solaire

a) Les ondes électromagnétiques et le spectre solaire

i) Les ondes électromagnétiques

Le soleil est l'étoile au centre de notre système solaire. Il produit par des réactions thermonucléaires, le rayonnement électromagnétique.

Le rayonnement électromagnétique est un rayonnement constitué d'un champ électrique et d'un champ magnétique qui vibrent et se propagent à grande vitesse (jusqu'à 300 000 km/s). Il a deux propriétés : l'aspect ondulatoire et l'aspect particulaire (on dit dualité onde-particule).

L'aspect ondulatoire, explique les phénomènes d'interférence, de réflexion et de diffraction. Elle est obtenue par la formule suivante et est exprimée en nanomètre (nm) :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = c \cdot T$$

c : célérité de la lumière en nanomètre par seconde ($\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$).

T : période en seconde (s).

ν : fréquence du photon en Hertz (Hz ou s^{-1}).

L'aspect corpusculaire, concerne les phénomènes d'absorption et les effets photochimiques.

Il est défini par l'afflux de photons propagé par ces ondes.

Le photon, est une entité dépourvue de masse et son énergie est calculée par la formule :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

E : énergie du photon en Joule (J)

h : constante de Planck ($6,2 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$)

ν : fréquence du photon en Hertz (Hz ou s^{-1})

c : célérité de la lumière en $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$

λ : longueur d'onde en m

Ceci montre que l'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de la lumière qu'il représente : plus la longueur d'onde est courte et plus l'énergie libérée est importante [89].

ii) Le spectre solaire

Le spectre solaire (Figure 9) est composé des rayonnements émis par le Soleil qui sont répartis en fonction de leur énergie et caractérisés par leur longueur d'onde. De plus, ce spectre, est continu car il est constitué d'une suite infinie de radiations. Il comprend les rayons cosmiques ($\lambda = 0,001$ nm) jusqu'aux ondes radio ($\lambda = 10$ m).

Ce spectre se décompose comme suit :

- Les rayonnements ionisants, dont les rayons gamma, les rayons X : ils induisent la formation de radicaux libres ou d'ions et sont imperceptibles à l'œil nu.
- Les rayonnements non ionisants ou optiques, tel que les rayons ultraviolets, la lumière visible et l'infrarouge (IR).

Les rayons UV sont définis de la sorte (suivant la matière qui les arrête) :

- Les UVA, entre $\lambda = 315$ et 400 nm, arrêtés par le verre ; avec les UVA-II (courts) entre $\lambda = 315$ et 340 nm et les UVA-I (longs) entre $\lambda = 340$ et 400 nm.
- Les UVB, entre $\lambda = 280$ et 315 nm, arrêtés par l'ozone.
- Les UVC, entre $\lambda = 100$ et 280 nm, arrêtés par le quartz.

Les UVC sont plus énergétiques que les B eux-mêmes plus énergétiques que les A.

La lumière visible, également appelée lumière blanche, est perçue grâce à la rétine, sous forme de couleur, définit la sensibilité de l'œil de l'Homme :

- Le violet entre $\lambda = 380$ et 440 nm
- Le bleu entre $\lambda = 440$ et 495 nm
- Le vert entre $\lambda = 495$ et 570 nm
- Le jaune entre $\lambda = 570$ et 590 nm
- L'orange entre $\lambda = 590$ et 620 nm
- Le rouge entre $\lambda = 620$ et 780 nm

Les Infra Rouges, comprennent les IRA entre $\lambda = 780$ et 2500 nm (Proche infrarouge), les IRB entre $\lambda = 2,5$ et $50 \mu\text{m}$ (Moyen infrarouge) et les IRC entre $\lambda = 50$ et $1000 \mu\text{m}$ (infrarouge lointain) sont responsables du phénomène de chaleur [89].

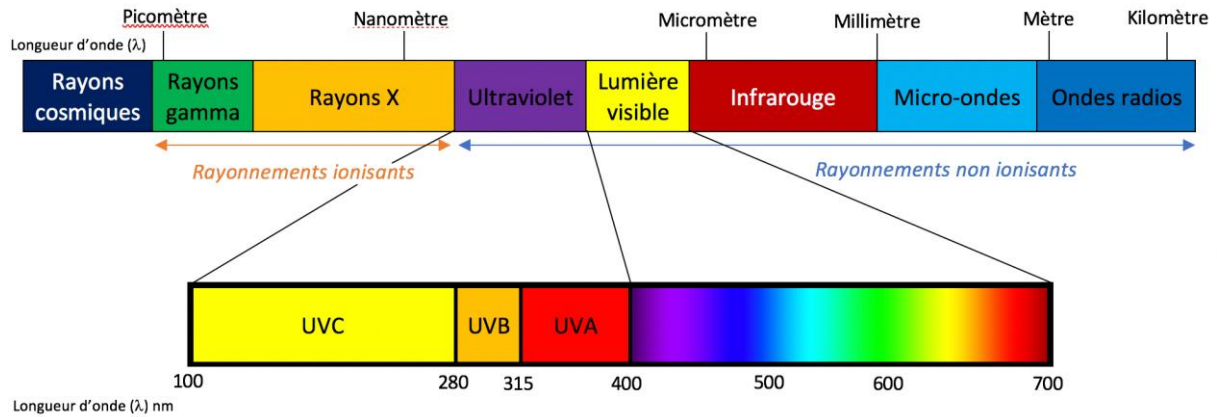


Figure 9 : représentation du spectre solaire [14].

b) Les facteurs influençant le rayonnement reçu sur la Terre

i) L'atmosphère terrestre

L'atmosphère terrestre est l'air qui nous entoure. Il protège contre les rayons solaires en absorbant une partie des rayonnements émis, et par sa composition, 20% d'oxygène et 80% d'azote, il permet la vie sur Terre [89].

Il est divisé en différentes parties selon l'altitude, qui absorbent plus ou moins les rayons émis par le soleil selon leur composition (par ordre décroissant) :

- La thermosphère : comprise entre 700 et 80 km
- La mésosphère entre 80 et 50 km
- La Stratosphère entre 50 et 15 km : constitue un premier filtre vis-à-vis des rayons solaires grâce à la couche d'Ozone. Ainsi, les UVC sont arrêtés, et les proportions d'UVB et d'UVA continuant leur trajectoire sont diminuées.
- La Troposphère entre 15 et 0 km : constitue un deuxième filtre par les nuages et la pollution.

La répartition du rayonnement atteignant le sol est la suivante : 50 % infrarouge, 40 % visible et 10 % ultraviolet (1 % UVB et 9 % UVA). Cela équivaut aux deux tiers de l'énergie solaire émise [89].

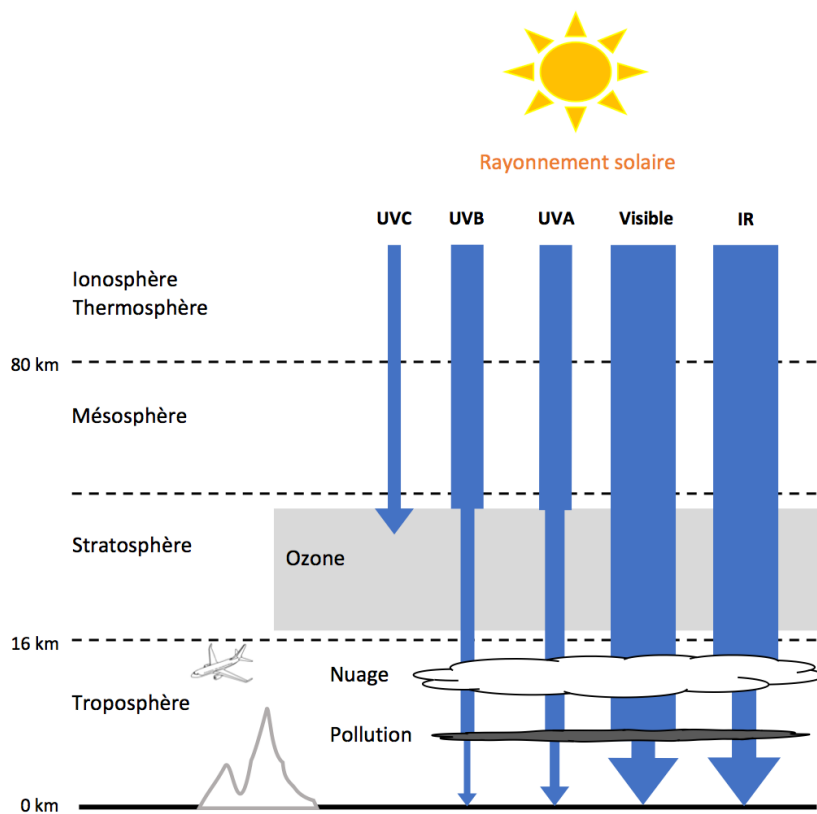


Figure 10 : Représentation des rayonnements solaires arrivant sur Terre [14].

- **L'ozone :**

L'ozone est produit lorsque la lumière UV réagit avec l'oxygène dans l'atmosphère.

Les rayons UV détruisent les molécules d'oxygène qui seront dans leur état atomique et vont se combiner avec de nouvelles molécules d'oxygène (Figure 11)

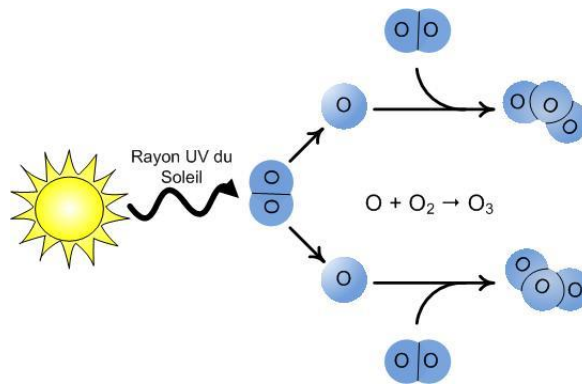


Figure 11 : Mécanisme de formation d'Ozone [90].

L'Ozone est retrouvé dans la stratosphère, elle permet l'absorption totale des UVC, des UVB les plus courts et de deux tiers des UVA.

Dans certaines parties du globe, une plus grande proportion d'UVA et d'UVB (voire d'UVC) atteint le sol : on parle du trou d'ozone. Par exemple, on les trouve en Amérique du Sud [89].

- **La longueur du trajet des rayons dans l'atmosphère :**

Cette longueur dépend de la position du soleil dans le ciel : en effet, les rayons du soleil forment un angle avec la surface de la Terre. L'angle doit être de 90° pour maintenir la longueur du trajet des rayons aussi courte que possible et pour obtenir une intensité de rayonnement maximale.

La position du soleil dépend de la zone géographique, de la saison et de l'heure de la journée. En France, c'est en été et à midi que l'intensité est la plus forte : passage de 95% d'UVA et de 5% d'UVB [89].

- **Les conditions atmosphériques :**

- **La couleur bleue du ciel :**

Cela est dû à la diffusion atmosphérique des longueurs d'onde les plus courtes de la lumière visible, comme le bleu. La propagation des rayons UV est maximale lorsque le ciel est clair et sans nuages.

- **Les nuages :**

Les nuages ont la capacité d'atténuer l'intensité des UV.

- **La pollution :**

La pollution (poussière, fumée, gaz carboniques...) absorbe les rayons UV.

ii) La nature du sol

La nature du sol joue un rôle important car elle déterminera la quantité de rayonnement solaire entrant qui sera réfléchi par la surface et donc renvoyée dans l'espace : Cette réflexion, qui dépend de la couleur et de la matière de la surface concernée, est nommée « albédo ». C'est ce phénomène qui permet d'expliquer en partie les basses températures des régions polaires. Sa valeur peut être exprimée par un pourcentage (entre 0 et 100%) ou par un chiffre (entre 0 et 1).

Les surfaces noires ne réfléchissent aucun rayonnement, elles sont complètement absorbées par cette surface et ont un albédo de 0% ou 0. Une surface blanche réfléchit tous les rayonnements qu'elle reçoit et son albédo sera de 100% ou 1.

Pour exemples, le sable possède un albédo de 20%, l'eau des océans entre 5 et 10% et la neige entre 80 et 90% [89].

2) Les effets bénéfiques du soleil

a) La synthèse de vitamine D

Dans la peau, les UVB sont absorbés par le 7-dehydrocholesterol qui est converti en pré-vitamine D3 qui à son tour s'isomérisse en Vitamine D3. La Vitamine D est nécessaire pour le métabolisme du calcium et du phosphate ainsi qu'au bon fonctionnement de plusieurs organes du corps humain [91]. Selon l'organisation mondiale de la santé, une exposition solaire des bras, des mains et du visage de 5 à 10 minutes, deux fois par semaine est estimée suffisante pour la synthèse de la vitamine D.

b) Effets bénéfiques sur l'humeur

Certaines études démontrent que l'exposition aux UV stimule la production de β -endorphine – une opioïde qui atteint le cerveau et induit une sensation de relâchement et de relaxation [92-94].

c) Le bronzage et la photo-protection

L'exposition aux UV accélère l'activité des mélanocytes et la production de la mélanine qui sera libérée en plus grandes quantités dans la peau. Cette production accélérée de la mélanine confère une couleur plus foncée à la peau, c'est le principe du bronzage appelé également « la pigmentation facultative ».

Le bronzage existe en trois phases : la pigmentation immédiate nommée « Immediate Pigment Darkening (IPD)», la pigmentation persistante nommée « Persistent Pigment Darkening (PPD)» et le bronzage retardé nommé « Delayed Tanning (DT) » [95]. L'intensité du bronzage varie non seulement d'un individu à l'autre mais aussi entre les différents sites du corps humain [96].

Pour une peau foncée, le type de mélanine dominant est l'Eumélanine, qui va se regrouper et former un parapluie au-dessus du noyau des kératinocytes et absorber les rayons UV protégeant ainsi l'ADN de la cellule. Pour une peau claire, le type dominant de mélanine est la phéomélanine qui ne possède aucune capacité d'absorption, les UV peuvent former des radicaux libres qui engendrent des coups de soleil puis possiblement des mutations de l'ADN. Une exposition solaire répétée et prolongée peut être dommageable et dangereuse pour la peau [97].

d) La photothérapie

Les rayonnements UV sont utilisés en photothérapie pour le traitement de certaines bactéries (ex. *Mycobacterium Tuberculosis*), le traitement du psoriasis par la régulation de l'hyperprolifération des kératinocytes, le traitement du vitiligo par activation de la synthèse, prolifération et migration des mélanocytes, le traitement de la dermatite atopique (communément appelée eczéma) par induction d'effets phototoxiques sur les T-lymphocytes et pour le traitement de la sclérodémie localisée par réduction du nombre des cellules de Langerhans [93].

e) Épaississement de l'épiderme

Lorsque les kératinocytes basaux reçoivent des rayons UVB, ils participent à l'épaississement du *stratum corneum* en augmentant le nombre de couches et en épaississant la muqueuse. Ceci permet d'augmenter la photoprotection naturelle à chaque irradiation [14].

Lorsque les kératinocytes ne reçoivent plus d'UVB, la desquamation ramène l'épiderme à son épaisseur normale.

Différentes études ont rapporté une augmentation de l'épaisseur de la peau après irradiation [98-100]; par exemple, Pearse et al. [99] ont rapporté depuis 1987 que les UVA et les UVB augmentaient significativement l'épaisseur moyenne de l'épiderme, l'épaisseur moyenne du SC et la hauteur moyenne des kératinocytes. Ces résultats, notamment l'épaisseur de

l'épiderme, ont ensuite été confirmés par Tomographie par Cohérence Optique (OCT) après des doses répétées d'UVA ou d'UVB [100].

3) Peau et soleil

Le rayonnement solaire a de nombreux effets bénéfiques sur la peau à travers ses différents composants, comme la synthèse de la vitamine D par l'action des rayons UVB sur les stérols membranaires et la pigmentation cutanée.

Mais lors d'expositions répétées, et en l'absence de protection, des effets nocifs comme des coups de soleil et même une phototoxicité peuvent apparaître dans un premier temps, suivis à long terme d'un photo-vieillessement et une immunosuppression pouvant conduire à un cancer de la peau.

Les UVB en sont la principale cause mais leurs effets sont potentialisés par les UVA, qui eux, agissent de manière indirecte [89].

a) Pénétration du rayonnement solaire dans la peau

Le rayonnement solaire est absorbé par toutes les couches de la peau : son absorption dépend de la longueur d'onde du rayonnement et de la composition des couches de la peau (Figure 12).

70% des rayons UVB sont absorbés par le *stratum corneum* du fait de sa composition : la kératine, due aux acides aminés polaires (acide glutamique, sérine, asparagine) et la mélanine, qui selon sa forme, Eumélanine ou Pheomélanine absorbent plus ou moins ces rayons UV.

Enfin, 20 % des rayons UVB atteignent la jonction dermo-épidermique et moins de 10 % atteignent le derme. 80% des UVA reçus par la peau traversent l'épiderme et 20% arrivent au derme.

Les rayons ultraviolets sont absorbés par les différentes couches cellulaires de la peau et provoquent des réactions photochimiques : les rayons UVA forment des espèces réactives de l'oxygène ainsi que des photo-produits qui ont un effet indirect à long terme sur les cellules et les rayons UVB agissent directement sur les cellules en formant des photo-produits [14, 89].

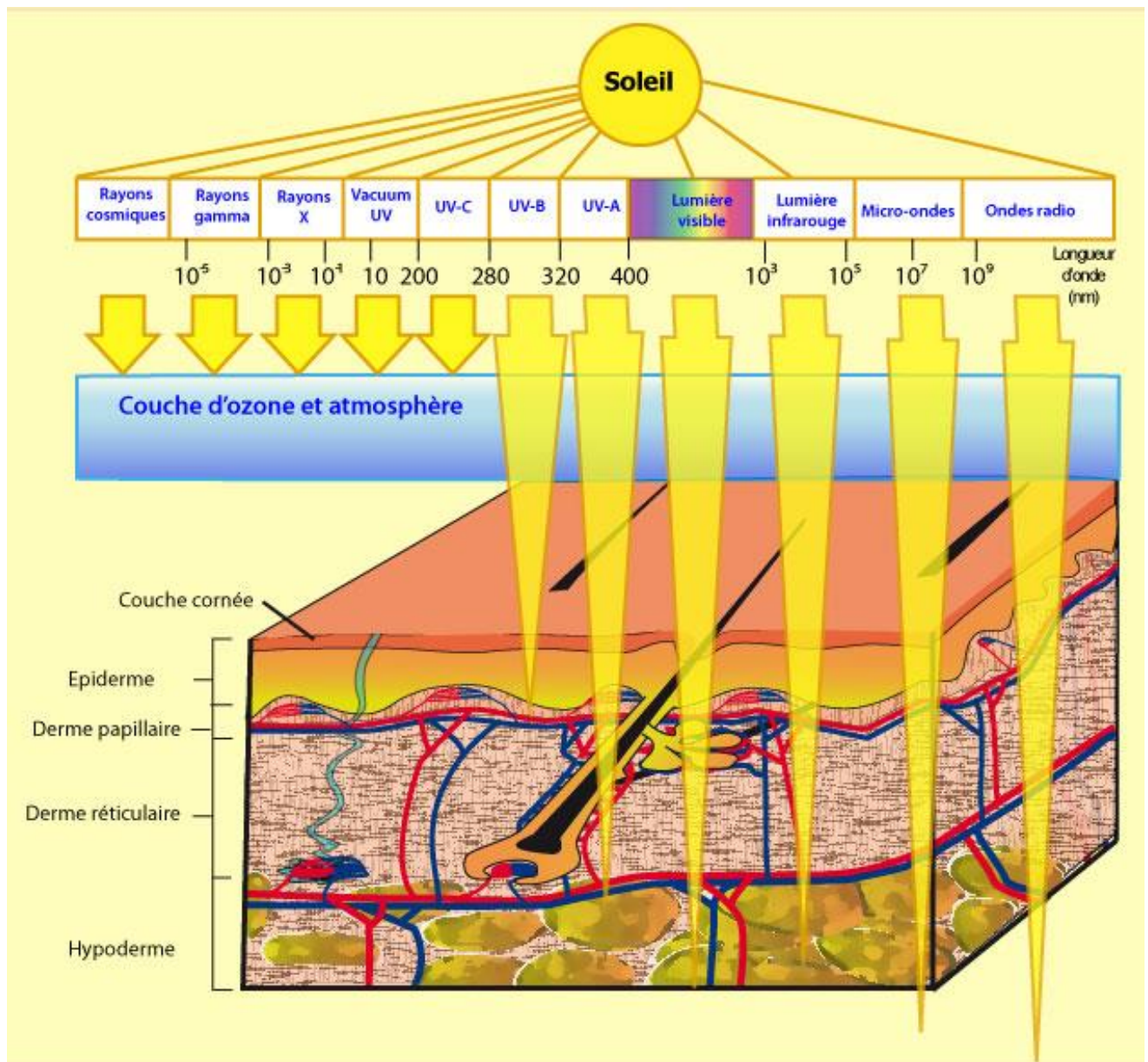


Figure 12 : Composition du rayonnement solaire et son interaction avec la peau [101].

b) Le phototype

Il classe les personnes selon la couleur de la peau, la couleur des cheveux, la couleur des yeux et la sensibilité aux coups de soleil. Il y en a six. Plus le phototype est faible, plus le sujet est sensible au soleil et plus il devra se protéger [102].

| Phototype | Couleur de peau, des cheveux et des yeux | Réaction au soleil |
|-----------|--|--|
| I | Peau très claire avec taches de rousseur Cheveux blonds ou roux Yeux clairs | Ne bronze pas Coups de soleil systématiques |
| II | Peau très claire Taches de rousseur au soleil Cheveux châtain ou blonds Yeux clairs | Bronze difficilement Coups de soleil fréquents |
| III | Peau claire Cheveux châtain ou blonds | Bronze progressivement Coups de soleil occasionnels |
| IV | Peau mate Cheveux châtain ou bruns Yeux foncés | Bronze bien Coups de soleil peu fréquents |
| V | Peau foncée Cheveux foncés Yeux foncés | Bronze facilement Coups de soleil rares |
| VI | Peau noire Cheveux foncés Yeux foncés | Jamais de coups de soleil |

Tableau 1 : Les différents phototypes selon La classification de Fitzpatrick [102].

c) La dose érythémateuse minimale ou DEM

La DEM est la plus petite dose de rayonnement UV qui produit un érythème visible qui apparaît après quelques heures et se développe 24 heures après l'exposition. Un DEM est défini pour chaque catégorie des rayonnements UV : les UVB ont un DEM de 30 à 70 mJ.m⁻², et les UVA ont un DEM de 10 à 100 J.cm⁻² [14].

d) Le stress oxydatif : Les Espèces Réactives de l'Oxygène

Après exposition au soleil, les protéines et les lipides de la peau peuvent subir des réactions oxydatives qui altèrent leurs fonctions principales. L'oxygène est utilisé pour le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Cependant, sous l'énergie UV, l'oxygène dans un atome ou une molécule perd un électron pour former un radical libre, tel que l'ion superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle (•OH) ou le radical peroxyde (ROO•). Ce sont des radicaux libres instables qui sont très réactifs là où ils sont produits. D'autres molécules d'oxygène réactif, telles que l'oxygène singulet (¹O₂), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou l'oxygène moléculaire (O₂), peuvent initier des réactions d'oxydation conduisant à la formation de radicaux libres. Les radicaux libres et les molécules d'oxygène réactives sont tous appelés les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) (ou en anglais ROS Reactive Oxygen Species) qui attaquent les membranes des cellules pour altérer leur fonctionnement. Le corps humain produit des

antioxydants enzymatiques (tels que la catalase, la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase) et des antioxydants non enzymatiques (tels que le glutathion, l'acide ascorbique, les vitamines E et l'ubiquinol-10, communément appelé coenzyme Q10) qui ont la capacité de contrôler et de gérer ce stress oxydatif. Mais après une exposition prolongée, l'organisme est au maximum de sa capacité et ne peut plus lutter seul contre les radicaux libres produits, entraînant des dommages oxydatifs. Le stress oxydatif est principalement causé par les UVA car l'énergie absorbée par l'acide urocanique qui transforme son énergie à l'oxygène O_2 pour donner O_2 singulet correspond à une longueur d'onde d'environ 345 nm [103].

- Sources des ERO :

Les ERO peuvent être générés de manière exogène ou intracellulaire à partir de nombreuses sources.

- Sources endogènes :

Les compartiments intracellulaires, y compris les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes, les noyaux, le cytosol, les membranes plasmiques et même les espaces extracellulaires, sont capables de générer des ERO [104, 105]. La chaîne de transport d'électrons mitochondriale est le principal site de production de ERO dans la plupart des cellules de mammifères [106]. Les enzymes qui catalysent les réactions chimiques générant des ERO sont les peroxydases, la NADPH oxydase, les isoformes de la NADPH oxydase (NOX), la xanthine oxydase (XO), les lipoxygénases (LOX), la glucose oxydase, la myéloperoxydase (MPO), l'oxyde nitrique synthase et les cyclooxygénases (COX).

- Sources exogènes :

Il existe de multiples déclencheurs externes qui induisent un stress oxydatif. Les polluants atmosphériques, la fumée de tabac, les radiations ionisantes et non ionisantes, les aliments et les médicaments, ainsi que les xénobiotiques peuvent tous contribuer au stress oxydatif. Les agents chimiques comme les quinones [107], les métaux lourds comme le plomb, l'arsenic, le mercure, le chrome et le cadmium, les solvants organiques et les pesticides sont des sources exogènes courantes de ERO [108]. Diverses sources exogènes et endogènes de ERO sont incluses dans la Figure 13.

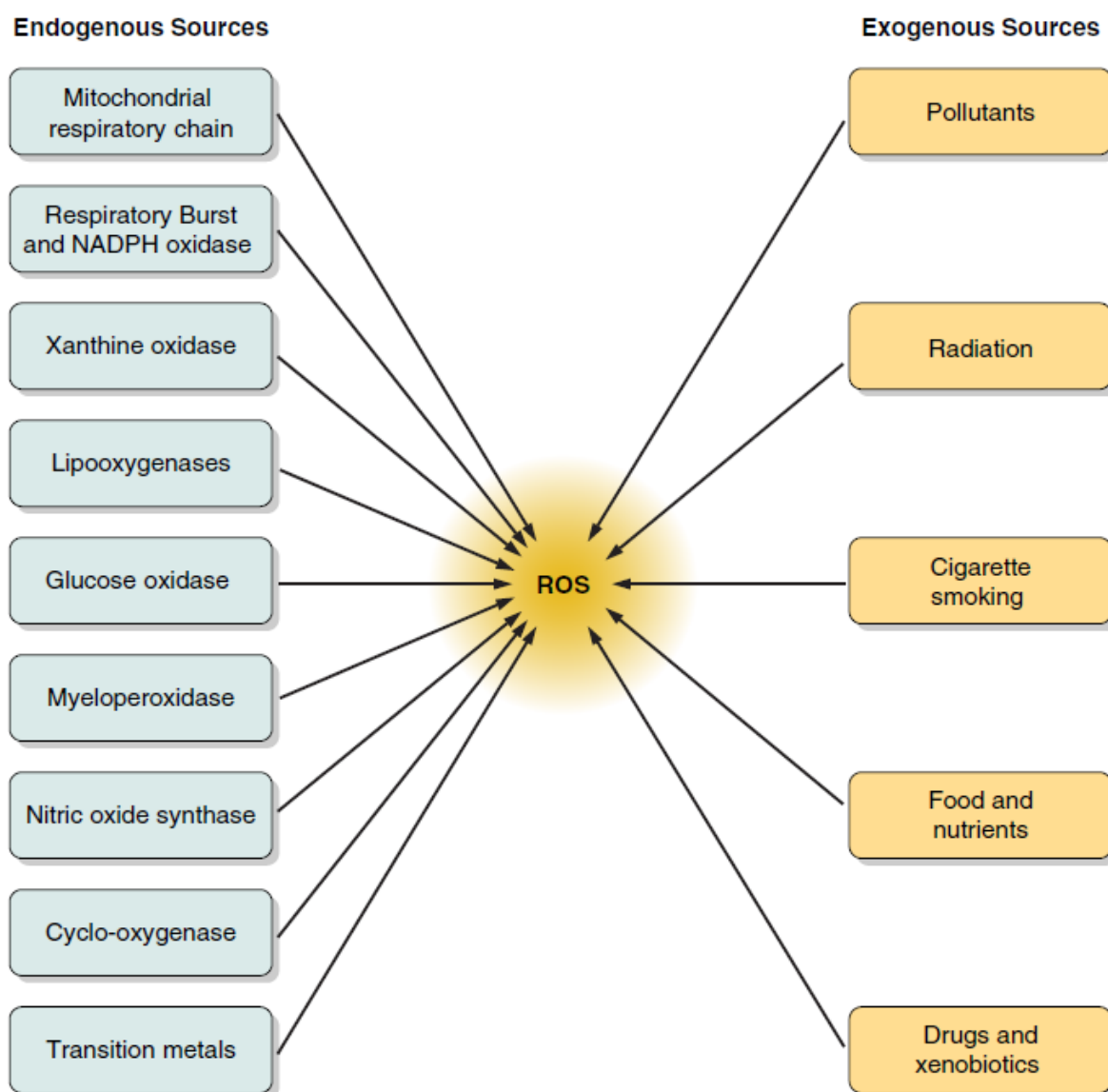


Figure 13 : Facteurs endogènes et exogènes conduisant à la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). La chaîne respiratoire mitochondriale et diverses enzymes intracellulaires sont les principaux générateurs endogènes des ERO. La pollution environnementale, les radiations, le tabagisme, certains aliments et les médicaments sont les principales sources exogènes des ERO [109].

e) Les risques des rayonnements UVA sur la peau

Bien que les UVA (320 nm - 400 nm) aient une énergie plus faible que les UVB, les UVA ont une pénétration importante dans la peau et peuvent atteindre le derme [110, 111]. Ils sont responsables du bronzage immédiat, du vieillissement cutané et de la formation des rides. Les rayons UVA possèdent des effets nocifs sur la peau. L'exposition aux UVA réduit immédiatement la synthèse de l'ADN qui revient à son processus normal après environ 8 heures de photo-repos [112]. Plus récemment, des études ont montré que les UVA pouvaient

également contribuer au développement du cancer de la peau. Ils produisent des radicaux libres et des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) qui affectent les voies de signalisation des cellules qui favorise les tumeurs ou provoque la mort cellulaire dans les heures suivant l'exposition [112]. Les UVA sont considérés comme des promoteurs de tumeurs cutanées.

f) Les risques des rayonnements UVB sur la peau

Les UVB (290 nm – 320 nm) sont plus énergétiques que les UVA, mais ils ne pénètrent pas profondément dans la peau et se limitent aux couches superficielles de la peau [110]. Les rayons UVB sont considérés comme des rayonnements très actifs biologiquement. En effet, ils sont absorbés par les protéines de la peau et par l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules épidermiques. Les UVB causent un endommagement de l'ADN et voire l'apoptose des cellules d'une peau non protégée [103, 112]. Les rayons UVB sont principalement responsables du développement de l'érythème, des brûlures, des dommages à l'ADN et du cancer de la peau.

V) La peroxydation lipidique

De nombreux facteurs affectent l'oxydation des lipides. Il s'agit de facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides (nombre et localisation des insaturations), la présence de pro-oxydants (ions métalliques, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc.) ainsi que des facteurs extrinsèques, tels que la température, la lumière, la pression partielle d'oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de traitement [113].

La peroxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies de réaction en fonction du milieu et des agents initiateurs : (1) l'auto-oxydation accélérée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres, (2) l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase ou (3) la photooxydation initiée par l'énergie radiante telle que les UV, le rayonnement solaire ou la lumière artificielle [114-116].

La peroxydation lipidique est une série de réactions radicalaires qui se déroulent en trois étapes (Figure 14). La première réaction produit des radicaux libres (initiation) en éliminant un hydrogène du lipide insaturé. Puis ces réactions génèrent successivement plusieurs radicaux libres (propagation), qui se combinent pour former des composés non radicalaires (terminaison).

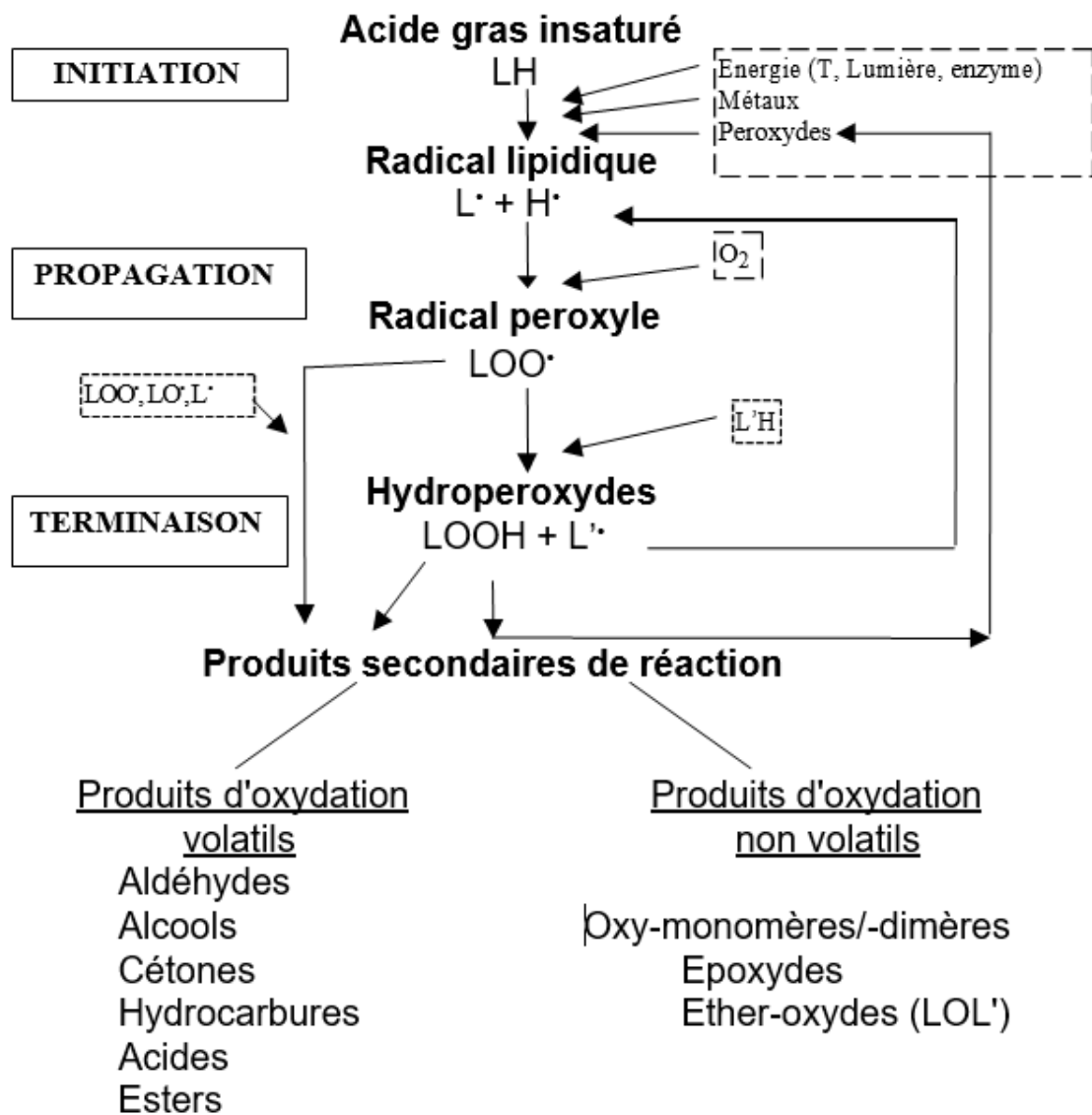
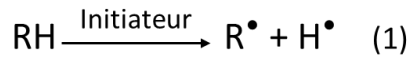


Figure 14 : Schéma général de l'oxydation des lipides [116].

1) Mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides polyinsaturés

a) L'initiation ou l'amorçage

En présence d'un initiateur (I), la peroxydation des lipides polyinsaturés (RH) consiste en l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le groupement méthylène en alpha de deux doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée (H bis-allylique) pour former un radical libre de lipide (R•) [réaction 1].



Ce mode d'initiation, peut être produit par des rayonnements ionisants, des générateurs chimiques, des enzymes ou des systèmes chimiques qui génèrent des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), ou des traces métalliques [116].

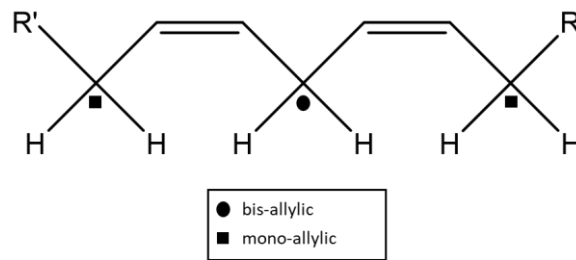
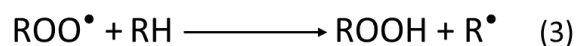


Figure 15 : Illustration des positions mono-allyliques et bis-allyliques.

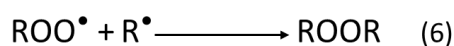
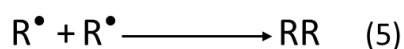
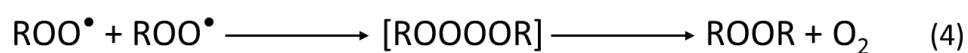
b) La propagation

Après l'amorçage, le mécanisme de propagation se met en place. Le radical carboné (R^\bullet) réagit rapidement avec le dioxygène pour former un radical peroxy (ROO^\bullet) [réaction 2]. Ce dernier, très instable, réagit en arrachant un atome d'hydrogène labile à une deuxième molécule de lipide pour former un hydroperoxyde (composé d'oxydation primaire), et de nouveau un radical carboné [réaction 3] [116, 117].



c) La terminaison

Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit non radicalaire.



Les hydroperoxydes (ROOH) peuvent également former des radicaux alkyles, alkoxy et des radicaux hydroxyles par décomposition homolytique de la liaison O-O. Les radicaux alkyles réagissent avec d'autres substrats et propagent la réaction en chaîne. Ils peuvent également subir un clivage carbone-carbone de part et d'autre du radical pour former des radicaux alkyles et vinyliques. Les radicaux alkyles peuvent réagir avec l'hydrogène, les radicaux hydroxyles ou les molécules d'oxygène pour produire des hydrocarbures, des alcools et d'autres hydroperoxydes. Les radicaux vinyliques peuvent réagir avec les radicaux hydroxyles (ROO•), les radicaux hydrogène (H•) ou l'oxygène moléculaire pour former des aldéhydes et des hydrocarbures [116, 117].

2) Produits formés au cours de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides conduit à la formation de produits primaires : hydroperoxydes, radicaux libres, diènes conjugués, très instables et rapidement décomposés en produits secondaires : aldéhydes, alcools, cétones. Ainsi, lors du développement des réactions d'oxydation vont successivement apparaître les produits primaires et secondaires de l'oxydation (Figure 16).

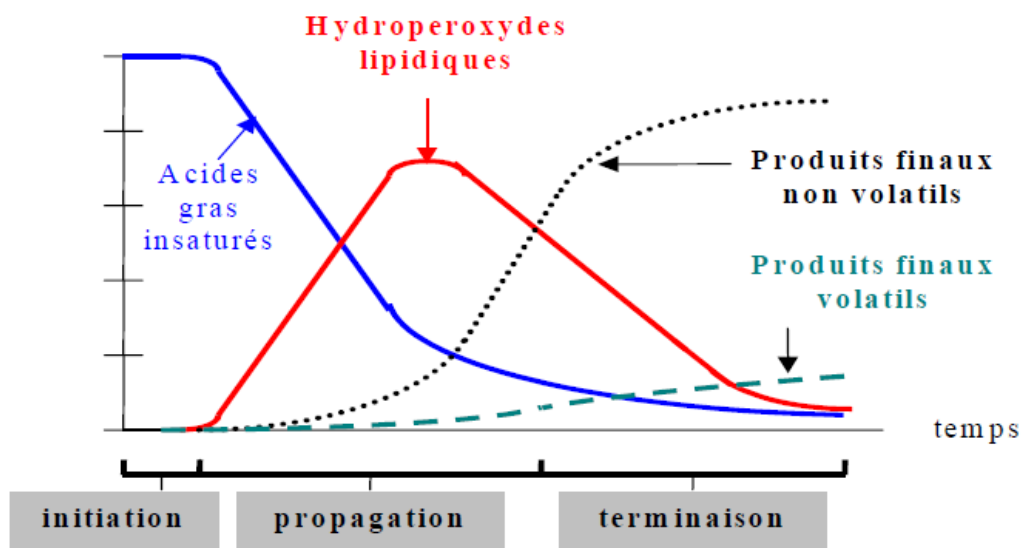


Figure 16 : Schématisation de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés [116].

- **Produits primaires :**

Les radicaux libres se forment lors des phases d'initiation et de propagation de la réaction d'oxydation des lipides. Ces espèces très instables et très réactives sont des composés cytotoxiques capables d'induire des altérations des molécules d'ADN et des protéines. Les diènes conjugués sont formés par réarrangement des doubles liaisons du radical alkyle des acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires de l'oxydation des lipides sans odeur spécifique, ils se décomposent rapidement avec la chaleur. Ce sont les précurseurs des composés volatils.

Les taux d'oxydation des acides gras sont approximativement 1:10:100:200 pour les acides stéarique (C18:0), oléique (C18:1 n-9), linoléique (C18 :2 n-6) et linoléique (C18 :3 n-3) respectivement [118].

- **Produits secondaires :**

Les produits d'oxydation primaires, de type hydroperoxyde (ROOH), peuvent subir des réactions de coupure homolytique pour former des radicaux alkoxydes (RO•) susceptibles d'évoluer vers des diénalcétones (R=O) ou bien se fragmenter (clivage de liaison C-C) pour donner d'autres dérivés, dits composés secondaires, de type aldéhydes, époxydes, alcanes, alcènes et acides carboxyliques.

Les aldéhydes sont eux même réactifs (caractère électrophile) et peuvent altérer les protéines et les acides nucléiques. Leur implication dans le développement de certains cancers et maladies cardiovasculaires a été suggérée dans plusieurs études [119, 120].

Réarrangements intermoléculaires :

Après la formation de radicaux, de nombreux réarrangements ont lieu : formation de radicaux endoperoxyde via des endoperoxydes bicycliques et formation de malondialdéhyde (MDA) [121], bien que d'autres voies soient également proposées par Dhale et al. [122] ou Pryor et al. [123] pour la création du MDA.

Scissions des hydroperoxydes

La principale voie de clivage de l'hydroperoxyde conduit à la formation de radicaux hydroxyles (OH•) et de radicaux alkoxydes (RO•). Ces derniers génèrent divers produits d'oxydation ainsi que de nouveaux radicaux très réactifs qui peuvent entretenir la réaction ou réagir avec d'autres composés (comme les amines). La réorganisation des hydroperoxydes peut évoluer

vers des fonctions époxy, cétone, hydroxyle, furane plus stables, avec accumulation possible dans la même chaîne [124].

3) Effets du rayonnement solaire sur les lipides cutanés de surface (LCS)

La peau est le plus grand organe du corps et exerce plusieurs fonctions physiologiques telles qu'une barrière protectrice contre la perte d'humidité et les agents nocifs, notamment les rayons ultraviolets. Les réactions d'oxydation au sein de la peau peuvent altérer ces fonctions et induire des troubles cutanés, notamment le photo-vieillessement et le cancer de la peau. Les lipides cutanés de surface, un mélange de lipides sébacés et épidermiques, présentent des espèces et un profil d'acides gras uniques. Les principaux lipides insaturés sont le squalène, l'acide sébaléique, l'acide linoléique et le cholestérol [125].

Les lipides cutanés de surface (LCS) jouent un rôle important dans les fonctions essentielles de la peau humaine, telles que la barrière mécanique et chimique, la thermorégulation et la photo-protection [62, 126, 127]. En effet, la toute première cible des UV et des autres rayonnements environnementaux lors d'une exposition naturelle, professionnelle ou thérapeutique est représentée par les LCS [128].

Le spectre d'absorption UV-R des LCS a été évalué par spectrométrie et montre une absorption significative, avec un maximum à 215 nm. La couche hydrolipidique présente sur le front dans des conditions saines est susceptible de réduire la transmission à 300 nm d'environ 10% [129]. En plus de représenter une première ligne de défense par absorption directe des UV, les LCS constitue une cible et un piègeur approprié pour toutes les espèces réactives d'oxygène générées au niveau de la peau par différents mécanismes moléculaires, au cours de l'irradiation UV [127].

L'oxydation des LCS peut être la cause de coups de soleil, de formation de rides, d'hyperpigmentation, de taches de rousseur, d'acné, de dermatite atopique et de cancer [130, 131].

Le squalène, le cholestérol et la vitamine E sont des substrats importants plutôt pour l'oxygène singulet, tandis que les acides gras polyinsaturés et les triglycérides qui contiennent des AG polyinsaturés, ayant des groupes méthylène réactifs placés entre les deux doubles liaisons voisines sont les substrats de la peroxydation lipidique médiée par les radicaux libres. Le squalène contient six doubles liaisons, mais sans groupe méthylène réactif ayant des

hydrogènes bis allyliques, ce qui le rend relativement stable contre la peroxydation lipidique médiée par les radicaux peroxytes. Les acides gras polyinsaturés et leurs esters ainsi que les TG polyinsaturés sont oxydés pour donner de nombreux types de produits par un mécanisme de chaîne médié par les radicaux libres, comme décrit dans de nombreux articles de synthèse [131, 132].

Parmi les composants du LCS, le squalène (SQ) est un composant très intrigant. Il représente en effet la fraction peroxydable la plus abondante dans les LCS. Il a été démontré précédemment que lorsque le sébum humain est soumis à une irradiation UVB à forte dose *in vitro*, le SQ est nettement dégradé par rapport au cholestérol, aux triglycérides du sébum, ou les acides gras libres mono-/di-insaturés (AGL).

En ce qui concerne la vitamine E, d'un point de vue biologique, l'alpha-tocophérol, est généralement considéré comme l'antioxydant liposoluble le plus important dans les tissus humains tels que la peau, capable de capturer les radicaux libres et d'arrêter la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique [133-135].

L'alpha-tocophérol empêche la propagation de la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxytes qui sont eux-mêmes très réactifs et peuvent facilement déclencher une réaction en chaîne [135, 136].

La vitamine E et d'autres antioxydants phénoliques inhibent cette réaction en chaîne en piégeant les radicaux peroxytes qui sont neutralisés par l'hydrogène du groupe OH phénolique de l'alpha-tocophérol, ce qui entraîne la formation du radical alpha-tocophérol [135, 136].

En outre, la réaction du radical alpha-tocophérol avec un second radical peroxyte conduit à la formation de nombreux produits d'oxydation tels que les quinones, les époxyquinones, les cétones et les hydroperoxydes qui servent de marqueurs des réactions antioxydantes de l'alpha-tocophérol [133, 135-138].

Les UV induisent une dégradation oxydative du SQ avec la génération d'une large gamme de produits d'oxydation de polarité et de réactivité variables, qui ont été clairement caractérisés par spectrométrie de masse. Il s'agit notamment du monohydroperoxyde de SQ [139], de différents isomères de l'époxyde de squalène et d'aldéhydes réactifs à chaîne plus courte [140]. En outre, la détérioration oxydative des acides gras et des TG polyinsaturés génère également une variété de produits aldéhydiques, notamment le malondialdéhyde (MDA), qui peuvent être des indicateurs pertinents de la peroxydation lipidique [141].

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour déterminer le degré de peroxydation des lipides. La méthode la plus utilisée pour la détermination du MDA est la détection spectrophotométrique du MDA à 532-535 nm après dérivatisation avec l'acide thiobarbiturique (TBA), mais de nombreuses études ont montré que des produits interférents se forment lors de la réaction du TBA avec les produits de la peroxydation lipidique, induisant une diminution de la sensibilité de cette méthode [142]. Pour éviter les problèmes d'interférence, de nombreuses méthodes HPLC ont été décrites pour mesurer l'adduit MDA-TBA ou le MDA sans dérivatisation [141-145]. D'autres auteurs ont décrit des méthodes GC-MS utilisant l'ionisation électronique (EI) pour la mesure de la MDA et d'autres aldéhydes [142].

La spectroscopie vibrationnelle a également été utilisée pour l'analyse des produits de peroxydation des lipides [146-149]. Elle est bien adaptée aux échantillons biologiques car il s'agit d'une méthode non invasive qui nécessite peu ou pas de préparation de l'échantillon et qui est rapide par rapport aux méthodes chromatographiques qui prennent beaucoup de temps. La génération de composés polaires (hydroperoxydes) et de composés carbonyliques (aldéhydes) peut être détectée en utilisant la spectroscopie infrarouge (FT-IR), tandis que les modifications du squelette carboné et des liaisons C=C au cours de l'oxydation et l'apparition de doubles liaisons trans se traduisent par des changements spectraux en utilisant la spectroscopie Raman [146, 150].

VI) La photoprotection

La photoprotection regroupe différentes méthodes capables de lutter contre les dommages cutanés causés par les rayons UV.

La peau possède un pouvoir écran biologique et une propriété d'autoprotection contre les rayonnements UV. Mais à la suite d'une exposition prolongée, cette capacité devient saturée et insuffisante. Elle doit être renforcée par différents moyens tels que la photoprotection naturelle, et la photoprotection artificielle.

1) La photoprotection naturelle

La photoprotection adaptative est l'ensemble des systèmes biologiques protecteurs endogènes qui améliore ou adapte la photoprotection naturelle. C'est l'ensemble des systèmes cutanés permettant de s'opposer aux effets biologiques cutanés des radiations UV.

a) Le stratum corneum

Les kératines ont plusieurs mécanismes : la réflexion, la diffraction et l'absorption photonique. L'irradiation lumineuse, après une phase d'inhibition entraîne un épaissement de ce stratum corneum [151].

b) Le système pigmentaire

La mélanine agit comme une barrière contre les rayons UV. Sa présence dans la peau est essentielle pour lui donner sa couleur, mais aussi pour la protéger des rayons UV. Les pigments de mélanine ont la propriété d'absorber le rayonnement UV pour réduire sa pénétration dans la peau [152]. La mélanine diffuse également la lumière reçue sur la peau, ce qui réduit également sa pénétration cutanée [152]. La photosensibilité de la peau aux rayons UV dépend de la concentration de mélanine dans la peau [153].

La peau foncée, richement concentrée en eumélanine, a l'avantage de tolérer plus longtemps le soleil et d'avoir une dose érythémateuse minimale supérieure à celle d'une peau claire [154]. La DEM d'une peau foncée peut être dans certains cas 13 fois supérieure à celle d'une peau claire, ceci dépend évidemment de la couleur de chaque peau et de la quantité de mélanine présente [152].

c) Les pigments caroténoïdes

Ils absorbent entre 470 et 700nm donc n'arrêtent pas les UV, ils sont simplement anti radicalaires [155].

L'impact des UV sur les caroténoïdes dans la peau humaine a été étudié *in vivo* en utilisant la spectroscopie Raman de résonance [156, 157]. Darvin et al 2006 [156] et Laderman et al 2011 [157] ont observé une diminution du bêta-carotène et du lycopène après une exposition à des doses relativement faibles d'UVB avec un délai allant de 30 à 90 minutes pour le premier et de 0 à 30 minutes pour le second.

d) La défense anti-oxydante

La lumière UV produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et est responsable du stress oxydatif dans les cellules. La cellule est alors capable de se protéger grâce à un ensemble d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase) et de piègeurs de ERO (thiols, vitamines E et C, bêta-carotène, oligo-éléments) dont le rôle est de maintenir le potentiel redox lors d'un stress oxydatif [158].

e) Les systèmes de réparation enzymatique de l'ADN

Ces systèmes peuvent réparer les dommages à l'ADN causés par la lumière UV. Leur carence provoque le *xeroderma pigmentosum* qui se caractérise par le développement de lésions précancéreuses et de multiples cancers cutanés dans les zones exposées à la lumière, notamment dans l'enfance.

La réparation par excision des nucléotides est la principale défense contre les effets génotoxiques du rayonnement solaire. Il existe également la réparation post-réplivative, qui est un mécanisme d'urgence lorsque la cellule en division est endommagée par les rayons UV. Enfin, la réparation des ruptures de chaîne est assurée par plusieurs systèmes qui permettent la survie cellulaire, mais qui peuvent donner lieu à des mutations [159].

f) L'acide urocanique

L'acide urocanique est produit par désamination de l'histidine, sous l'influence d'une histidinase activée par les UV. Il est sécrété par la sueur et absorbe les UVB et UVC en passant de la forme « *trans* » à la forme « *cis* ».

L'acide urocanique (UCA) peut être facilement détecté sous sa forme trans en utilisant la microscopie confocale Raman [160, 161]. La forme trans s'isomérisé en forme cis lors de l'exposition aux UV [160, 161]. Dans les deux études, les auteurs ont observé une diminution de la teneur de l'UCA trans immédiatement après l'irradiation UV et qui est restée faible pendant une semaine pour retrouver le niveau initial environ deux semaines après [162].

L'efficacité de la photoprotection naturelle dépend essentiellement de la pigmentation constitutionnelle de la personne, et de sa capacité à l'augmenter après exposition solaire. Le phototype qualifie la photosensibilité individuelle [163].

2) La photoprotection artificielle

La photoprotection artificielle comprend la photoprotection physique, c'est-à-dire les vêtements, et la photoprotection chimique, c'est-à-dire l'utilisation de produits de protection solaire (PPS). Il représente aujourd'hui le seul moyen de protection contre le rayonnement solaire, notamment les rayons UV.

a) La photoprotection physique : la photoprotection vestimentaire

Il s'agit notamment de se protéger du rayonnement solaire en portant des vêtements ou des accessoires (chapeaux, casquettes). La protection apportée par les vêtements dépend de plusieurs facteurs : la texture, la couleur, l'épaisseur et le confort de ces derniers. Le facteur de protection est déterminé par le facteur de protection UV (UPF : Ultraviolet Protection Factor) [89, 155].

Ce facteur quantifie le niveau de protection offert par les vêtements, et il est équivalent au SPF (Sun Protection Factor). Ce facteur est déterminé selon deux méthodes :

- Une méthode dite « in vivo » : chez un sujet sain, on détermine la Dose Érythémateuse Minimale (DEM), protégée et non protégée par un vêtement.
- Une méthode dite « in vitro » : le tissu subit une irradiation par un rayonnement UV et on mesure la transmission du tissu par spectrophotométrie.

La principale méthode utilisée est la méthode « in vitro », car cette dernière est plus facile et moins coûteuse à réaliser [14, 89, 155].

Un vêtement est défini comme photoprotecteur suivant la Norme européenne EN13758-2 par :

- Un UPF > 40
- Une transmission des UVA < 5 %
- Couvrir le cou, les épaules, les trois quarts des bras et la totalité des cuisses.

un pictogramme EN 13758-2 et 40+ identifient les vêtements répondant aux standards européens pour définir les vêtements protecteurs du soleil (Figure 17).



Figure 17 : Pictogramme apposé sur le vêtement qu'ils sont conforme aux exigences de la norme européenne relative aux vêtements de protection solaire [164].

L'UPF dépend du type de fibre, du tissage, de la teneur en humidité, de la couleur, de l'étirement et de l'abrasion [165].

La protection varie selon le spectre, le polyester a un indice de protection UVB élevé et une pénétration UVA plus élevée que le coton, la viscose et le lin.

La serge de coton, la soie, le polyester réfléchissant sont les tissus les plus protecteurs.

Les vêtements foncés sont les plus efficaces, mais ils absorbent les rayons infrarouges et sont donc désagréables en été.

Les vêtements qui se mouillent en nageant ou en transpirant réduisent la protection UV [166].

b) La photoprotection chimique : les Produits de Protection Solaire (PPS)

En France, l'Agence nationale de sécurité du médicament (anciennement Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) en a donné une définition dans sa recommandation de 2011 sur le bon usage des produits solaires (écrans solaires) [89] : « La protection solaire

est un produit cosmétique. Il est défini comme : Toute préparation destinée à entrer en contact avec la peau humaine (ex : crèmes, huiles, gels, lait, etc.) dont le but unique ou principal est de protéger le corps humain des rayonnements UV en absorbant et/ou réfléchissant ces rayonnements ».

L'histoire des écrans solaires a commencé avec un chimiste Autrichien, le Professeur Franz Greiter qui était un alpiniste passionné. À la suite de plusieurs brûlures sévères lors de ses ascensions en montagne, Pr. Greiter développe la première crème formellement protectrice contre les UV en 1946 et la commercialise sous le nom de « crème glacière » [97]. En 1962, Pr. Greiter introduit le concept de Facteur de Protection Solaire (SPF), puis en 1977, il introduit les écrans résistants à l'eau [97]. En 1978, l'administration américaine des aliments et des médicaments (FDA : Food and Drug Administration) adopte le SPF comme indice de protection officiel aux Etats Unis [167]. Ce n'est qu'en 2006 que la commission européenne adopte des standards pour la détermination du SPF d'un écran solaire. Depuis, plusieurs mises à jour ont été appliquées, la dernière étant en 2012 [168].

Actuellement, la norme officielle européenne de détermination du SPF d'un écran solaire est la méthode in vivo représentée par la norme ISO 24444 : 2010 (ISO24444:2010, 2010).

i) La composition des PPS

Le PPS se compose de filtres, d'excipients et d'éventuels additifs. Leur composition est conforme au Règlement Cosmétique du Parlement Européen CE n°1223/2009 [89] qui liste les substances interdites, restreintes et autorisées. En France, le respect de cette réglementation par les fabricants, est assurée par l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé (ANSM) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) [89].

➤ Les filtres :

Les filtres UV sont des substances contenues dans les produits de protection solaire qui sont conçus pour absorber et/ou réfléchir certaines longueurs d'onde spécifiquement afin de réduire l'exposition de la peau à ces rayonnements. Il existe deux types de filtres : les filtres chimiques et les filtres minéraux.

- Les filtres organiques :

Les filtres chimiques sont des molécules lipophiles ou hydrophiles obtenues par synthèse. Ils agissent comme des chromophores, c'est-à-dire que ces molécules absorbent le rayonnement

lumineux atteignant la peau, notamment au niveau du cycle du benzène, leur permettant d'entrer dans un état d'énergie plus élevé. En retournant à leur état énergétique initial, l'énergie accumulée est restituée en émettant de la chaleur, un rayonnement fluorescent ou par conversion en isomères.

Vingt-six filtres chimiques sont autorisés suivant la réglementation européenne. Ils sont classés suivant leur spectre d'action. On distingue, les filtres absorbant les UVB, filtres à spectre étroit, ayant un pic d'absorption compris entre 290 et 300 nm et les filtres absorbant les UVB et les UVA, filtres à large spectre, apparus plus récemment, ayant un pic d'absorption compris entre 288 et 378 nm [89].

- Les filtres minéraux :

Ce sont des poudres minérales inertes obtenues par broyage. Ils permettent la réflexion et la diffusion du rayonnement solaire. Le diamètre de ces particules détermine l'efficacité de la photoprotection : les grands diamètres augmentent la réflexion ou l'absorption de la lumière UV, mais l'agrégation de grosses particules peut créer un aspect blanchâtre lorsque le produit est appliqué sur la peau. Les particules sont alors réduites à l'état de nanoparticules : transparentes lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, mais absorbent moins les UVA longs [89].

➤ **Les excipients :**

Les excipients déterminent la forme galénique du PPS. Ils jouent un rôle dans l'application et la durabilité du produit. Il existe de nombreuses formes :

- Les solutions : Elles sont principalement à base d'huile pour une application facile.
- Les émulsions : Elles peuvent être obtenues en mélangeant des composés huileux et à base d'eau pour obtenir de nombreuses textures, comme les laits, les crèmes, pour faciliter l'application et améliorer les capacités filtrantes.
- Les gels : alternatifs aux émulsions.
- Les sprays : facilité d'utilisation avec un diamètre de particules émises de plus en plus fins. (Exemple : les brumes)
- Les sticks : adaptés pour une application localisée.

Les excipients utilisés sont déterminés en fonction des objectifs à atteindre par le PPS : indice de protection élevé, résistance à l'eau, esthétique, etc.

Comme tout produit cosmétique, des additifs peuvent être ajoutés : des colorants, des parfums, des conservateurs, des antioxydants [89].

ii) Les propriétés physico-chimiques des PPS

Un Produit de Protection Solaire présenté comme tel, doit avoir des filtres répondant à plusieurs paramètres physico chimiques.

➤ **La photostabilité :**

La photostabilité permet d'évaluer la persistance ou la dégradation du ou des filtre(s) du PPS lorsqu'il est soumis à des radiations. Ainsi, certains filtres sont très photostables et d'autres, nécessitent d'être associés à d'autres filtres pour se stabiliser [155].

Enfin, le mélange de filtres chimiques et physiques est recommandé pour obtenir une couverture optimale contre l'ensemble des UV [89].

➤ **La rémanence (la durabilité) :**

La rémanence détermine la durée effective du PPS dans les conditions d'utilisation : le label "waterproof" atteste que le SPF reste proche avant et après deux bains de 20 minutes (et "très résistant à l'eau" après quatre bains de vingt minutes) [89, 155].

➤ **La protection anti-UVB (SPF) :**

La protection contre les rayons UVB est caractérisée par le facteur de protection solaire (SPF). Le SPF est une norme standardisée, déterminée in vivo selon les normes COLIPA (European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) : les doses érythémateuses minimales d'érythème (DEM) sont mesurées en l'absence et en présence de PPS (appliqué à 2 mg/cm²) ; Le SPF est le rapport entre ces deux DME [14, 89]. Le SPF peut également être déterminé in vitro, bien que la technique ne soit pas standardisée : il s'agit de mesurer le spectre d'absorption du produit par spectrophotométrie [89].

Pour qu'un produit cosmétique soit appelé PPS, il doit être conforme aux recommandations européennes SPF :

- La catégorie de photoprotection doit être indiquée et correspondre au SPF : faible protection (SPF de 6 ou de 10), protection moyenne (SPF de 10, 20 ou 25), haute protection (SPF de 30 ou 50) et très haute protection (SPF de 50+).
- Le SPF minimal pour un PPS est de 6 et le SPF maximal est de 50+.

SPF signifie uniquement protection contre les UVB et pas contre les autres rayonnements [89].

➤ **La protection anti-UVA (FPUVA) :**

La protection anti-UVA est caractérisée par le Facteur de Protection UVA (FPUVA). Pour cette raison, l'ANSM recommande de mesurer le Persistent Pigment Darkening (PPD) [89, 155]. Le PPD caractérise la protection contre les UVA courts : cet indice est déterminé en évaluant l'apparition d'une pigmentation cutanée due à l'oxydation des précurseurs de la mélanine après une irradiation UVA, puis en calculant le rapport entre la dose pigmentogène qui persiste plus de deux heures après la fin d'exposition aux UVA avec protection et celle pigmentogène persistant plus de deux heures après la fin d'exposition aux UVA sans protection [89].

In vitro, le COLIPA recommande la même procédure que celle utilisée pour déterminer le SPF : mesure spectrophotométrique de l'absorbance pour déterminer la FPUVA [89].

En plus, un autre paramètre est pris en compte : il s'agit de la longueur d'onde critique (λ_c). C'est la longueur où l'aire sous la courbe d'absorption du produit entre 290 nm et λ_c est égale à 90 % de l'aire sous la courbe d'absorption entre 290 et 400 nm (le spectre UV complet). Il permet de couvrir les rayons UVA longs mais aussi les UVB [89, 155].

Comme pour le SPF, le FPUVA du PPS et sa longueur d'onde critique doivent être conformes à la réglementation européenne :

- Chaque PPS doit avoir un FPUVA égal au tiers du SPF. Cela signifie que le rapport SPF/FPUVA doit être inférieur ou égal à 3.
- La longueur d'onde critique doit être supérieure ou égale à 370 nm.
- La protection contre les UVA doit être affichée par le symbole suivant :



VII) Méthodes d'analyse et de caractérisation

1) La spectroscopie vibrationnelle : Principe et instrumentation

La spectroscopie constitue un ensemble de méthodes de mesure des phénomènes d'interactions lumière/matière, et utilise donc la lumière pour étudier les processus moléculaires. Les positions relatives des atomes dans une molécule ne sont pas complètement fixes, mais fluctuent constamment en raison de divers types de vibrations. La spectroscopie vibrationnelle (diffusion Raman et absorption infrarouge) est une technique spectroscopique basée sur les transitions entre niveaux d'énergie vibrationnelle d'un même état électronique. Les théories quantique et mécanique de ces techniques Raman et infrarouge sont bien décrites dans la littérature [84, 169, 170]. Notons brièvement que la diffusion Raman est active lorsque la polarisabilité de la molécule est modifiée, tandis que l'absorption infrarouge nécessite une modification du moment dipolaire. Ces techniques permettent de mesurer l'interaction des radiations électromagnétiques incidentes avec les vibrations moléculaires spécifiques de l'échantillon ; telles que les élongations ou les déformations angulaires des liaisons (Figure 18). Les deux techniques sont donc complémentaires et permettent d'obtenir une signature vibrationnelle complète de l'échantillon [84].







| Modes d'élongation | Modes de déformation | |
|--|---|--|
|  Symétrique |  Symétrique Cisaillement (Scissoring) |  Symétrique Balancement (Wagging) |
|  Asymétrique |  Asymétrique Rotation (Rocking) |  Asymétrique Torsion (Twisting) |

Figure 18 : Différents modes de vibration : nombre d'onde. Les modes de vibration des molécules pourraient être classés en deux types : un mode de vibration de valence ou d'élongation (symétriques ou antisymétriques), dont les angles formés entre les liaisons restent constants avec une variation de longueur de ces liaisons et un mode de vibration de déformation où les angles entre les liaisons qui varient.

2) La spectroscopie Raman

a) Principe de l'effet Raman

La spectroscopie Raman étudie les transitions vibrationnelles à partir de la diffusion inélastique de la lumière [171]. Elle consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée. L'analyse se fait alors par excitation de l'échantillon avec une onde électromagnétique de fréquence donnée. Lorsque le rayon lumineux interagit avec la matière, trois phénomènes de diffusion peuvent être observés (Figure 19) :

- La diffusion Rayleigh ou élastique correspond à la diffusion majoritaire (environ 1 photon sur 10^4) sans échange d'énergie. Il se traduit par une simple diffusion du rayonnement incident dans n'importe quelle direction, sans changement de fréquence. La longueur d'onde est donc la même que la longueur d'onde de la source d'excitation.
- La diffusion Raman, ou diffusion inélastique concerne elle environ 1 photon sur 10^8 , et comporte un échange d'énergie entre les photons et les molécules. Dans ce cas, les photons diffusés n'ont pas la même fréquence que les photons incidents, les molécules passent dans un état d'énergie virtuel, transitoire, avant d'émettre à leur tour de nouveaux photons qui constituent la diffusion Raman.
 - Si l'énergie des photons diffusée est plus faible que celle des photons incidents, on parle de diffusion Stokes.
 - Si l'énergie des photons diffusée est plus élevée que celle des photons incidents, on parle de diffusion anti-Stokes.

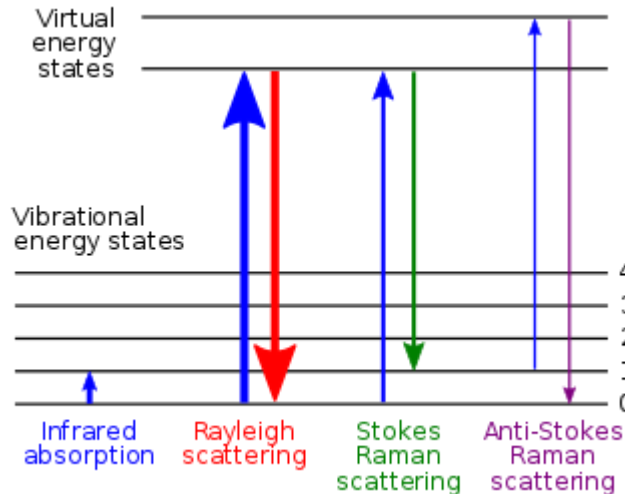


Figure 19 : Diagramme des niveaux d'énergie impliqués dans la spectroscopie infrarouge, la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman. L'épaisseur des lignes indique qualitativement l'intensité des signaux de chaque transition [18]

b) Appareillage Raman

Tous les microspectromètres Raman sont composés principalement (Figure 20) :

- d'une source excitatrice (laser)
- d'un microscope de focalisation et de collecte de la lumière diffusée,
- d'un système de filtrage,
- d'un système de séparation des longueurs d'ondes,
- d'un système de détection.

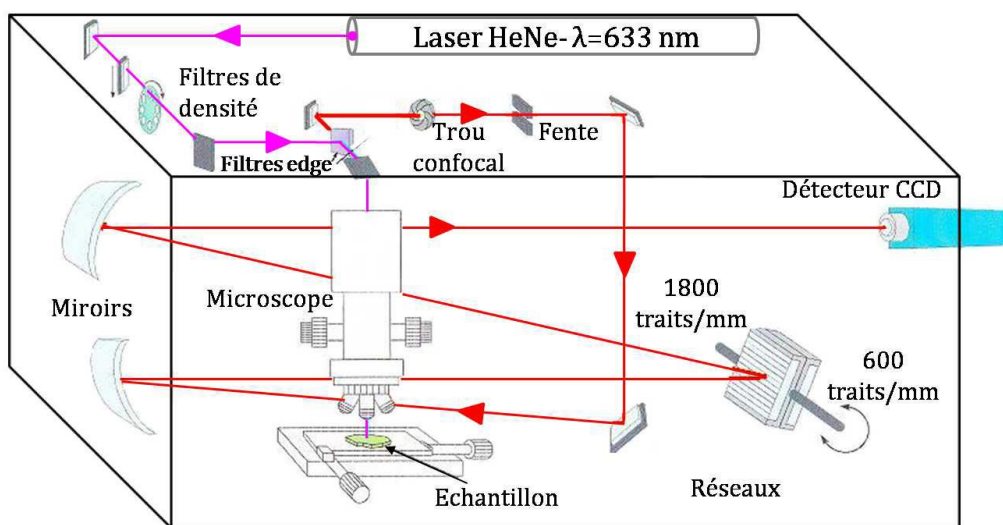


Figure 20 : Schéma du microspectromètre Raman Labram [84].

- **Source :**

On distingue essentiellement les lasers continus et les lasers pulsés. Le choix de la longueur d'onde d'excitation résulte d'un compromis : plus l'onde est énergétique (longueur d'onde basse ou fréquence élevée), plus la diffusion est intense, mais plus le risque d'induire de la fluorescence parasite est important notamment pour les échantillons biologiques.

Les principaux types de lasers utilisés en spectroscopie vibrationnelle Raman sont répertoriés dans le tableau 2.

| Laser, nm | Type | Gamme de longueur d'onde, nm (stokes, 100-3000 cm^{-1}) | Risque de fluorescence | Remarques |
|---------------------------------|---------------------|---|------------------------|--|
| Lasers visibles | | | | |
| 488 | Ar+ | 490-572 | Très élevé | Laser modulable |
| 514,5 | Ar+ | 517-608 | Très élevé | Bonne sensibilité |
| 532 | Double (Nd :YAG) | 535-633 | Elevé | Meilleure sensibilité |
| 633 | He-Ne | 637-781 | Assez élevé | Bonne sensibilité |
| 660 | Pompé Nd:YLF | 664-823 | Moyen | Meilleur compromis sensibilité/ fluorescence |
| Lasers proche infrarouge | | | | |
| 780-785 | Diode | 791-1027 | Moyen | Limité à 3000 cm^{-1} pour détecteur Charged Coupled Device (CCD) |
| 830 | Diode | 837-980 | Très faible | Limité à 2000 cm^{-1} pour détecteur CCD |
| 1064 | Nd :YAG (pulsé) | 1075-1563 | Nul | Peu sensible, Raman à transformée de Fourier |

Tableau 2 : Caractéristiques de principaux lasers utilisées en spectroscopie Raman [84, 172].

- **Système de collecte :**

Il est utilisé pour collecter la lumière diffusée et l'envoyer au spectrographe. Divers systèmes de collecte sont utilisés, notamment des microscopes, des fibres optiques. Ils peuvent contenir des chambres d'acquisition et être équipés de platines motorisées. Des sondes

confocales très compactes et portables ont été développées qui peuvent être utilisées pour des analyses in vivo.

- **Filtrage :**

Un filtre passe-bande (interférentiel) est placé après la source afin de filtrer les raies parasites. Un laser de puissance modulable, et un jeu de filtres atténuateurs, permet de réduire l'intensité du rayonnement incident, ce qui évite dans certains cas une dégradation photothermique de l'échantillon. L'utilisation de filtres Notch (élimination d'une raie spécifique) ou des filtres Edge (filtres passe-haut) permet d'exclure, par réflexion, la zone spectrale contenant la raie excitatrice du laser et la diffusion Rayleigh (beaucoup plus intense que la diffusion Raman).

- **Séparation des longueurs d'ondes :**

La séparation des longueurs d'ondes peut être réalisée à l'aide d'un système dispersif (réseaux à diffraction) ou d'un interféromètre (pour la spectroscopie Raman à transformée de Fourier « Raman-TF », plutôt utilisée pour les excitations dans le proche infrarouge).

- **Détecteurs :**

Les détecteurs multicanaux de type CCD (Charged Couple Device) sont les plus communément utilisés avec les systèmes dispersifs tandis que les détecteurs InGaAs (Indium-Gallium-Arsenide) sont plutôt réservés à la spectroscopie Raman-TF.

Chaque détecteur a un rendement quantique spécifique (Figure 22) ; la position et l'étendue de la réponse Raman en longueur d'onde sont fonction du laser (tableau , colonne 3). La réponse optimale est obtenue dans la zone de recouvrement de sensibilité du détecteur et de la réponse Raman. Par exemple, pour un laser à 633 nm, la gamme spectrale 100 - 3000 cm^{-1} correspond à la plage de longueur d'onde 637 - 781 nm. Sur cette plage de mesure, le rendement quantique d'un détecteur CCD est optimal (Figure 21).

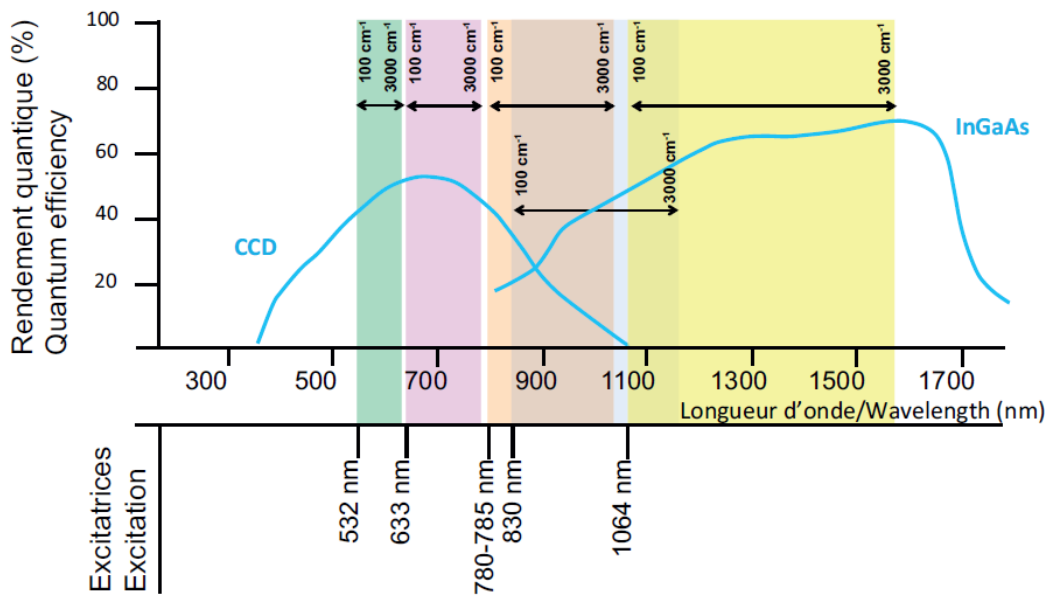


Figure 21 : Rendement quantique des détecteurs (CCD et InGaAs) en fonction de la longueur d'onde. Étendue en nm de la gamme spectrale ($100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) en fonction de l'excitatrice [172].

c) Micro-sonde Raman

Pour l'analyse cutanée *in vivo* par microscopie Raman, il existe des dispositifs tels que ceux développés par Horiba Scientific (Figure 22) et River Diagnostic [173, 174]. Le système d'acquisition de données spectrales de ce dernier consiste en un microscope inversé figé sur lequel est placée la partie du corps à analyser. Il est donc clair que cette configuration ne permet pas d'analyser différentes zones du corps humain. Par conséquent, Horiba Scientific a développé un système de spectroscopie Raman *in vivo* qui comprend une microsonde confocale facilement manipulable pour permettre l'analyse de différents sites anatomiques [84].

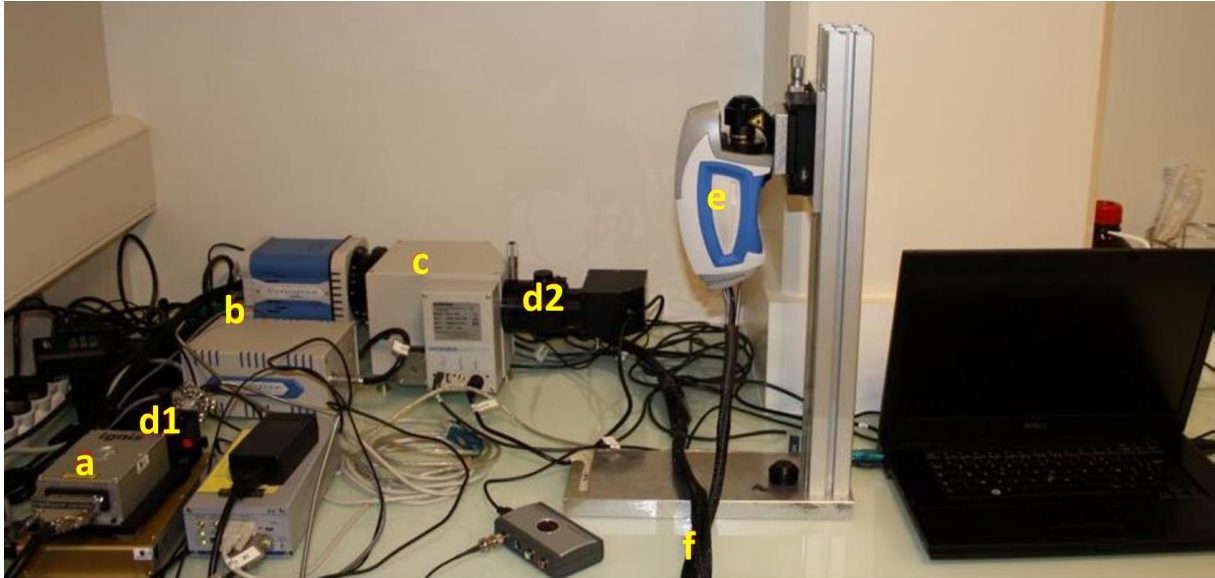


Figure 22 : Système micro-sonde Raman : (a) source laser, (b) charged coupled device (CCD), (c) Micro-HR, (d1 et d2) shutter laser et shutter spectromètre respectivement, (f) fibre permettant une confocalité de 5 μm et (e) micro-sonde confocale [175].

Le système comprend :

- Une source laser à 660 nm (Figure 22a). La puissance laser est de 12 mW en sortie d'objectif.
- La micro-sonde confocale (Figure 22e) ; Une fibre optique monomode de 5 μm de diamètre utilisée pour véhiculer la lumière laser, assurant une confocalité de l'ordre de 3 μm (avec un objectif 100X). La sonde comporte également une caméra intégrée permettant de visualiser la surface de l'échantillon.
- Un objectif remplaçable selon les besoins analytiques. Dans nos travaux, nous utilisons un objectif 100X MPlanFLN (NA, WD). Un système piézoélectrique permet un mouvement en Z de l'objectif de $\pm 100 \mu\text{m}$ avec des pas d'incrémentations ajustables.
- Un spectromètre Raman, ici de type micro-HR (Figure 22c), équipé de réseaux de différent pouvoir résolutif (400, 600 et 1800 traits/mm) et d'un détecteur CCD (Figure 22b) de haute sensibilité refroidi à -70°C par effet Peltier.
- Au bout de l'objectif, un embout indépendant de l'objectif et comprenant une ouverture de 1 ou 2 mm, permet d'ajuster la distance entre de la peau et l'objectif de façon à se positionner à la distance de travail optimale. Un système d'autofocus

ultrarapide permet une focalisation du laser en surface de la peau, presque en temps réel.

d) Interprétation du spectre Raman

➤ **Microspectroscopie Raman pour l'analyse des lipides :**

La spectroscopie Raman fournit des informations utiles pour caractériser les lipides. Différentes caractéristiques spectrales peuvent être utilisées pour surveiller simultanément l'identité, l'ordre conformationnel et l'organisation des lipides.

D'un point de vue structurel, la présence de doubles liaisons dans les chaînes alkyle des lipides peut être directement observée sur les spectres.

Ainsi, la bande centrée à 1657 cm^{-1} est attribuée à l'élongation $\nu(\text{C}=\text{C})$ en configuration *cis* tandis que les bandes qui apparaissent à 1670 cm^{-1} sont attribuées à l'élongation $\nu(\text{C}=\text{C})$ en configuration *trans*. D'autre part, les bandes situées à 973 et 1267 cm^{-1} sont associées à la flexion hors du plan de $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ et à la flexion dans le plan de $\text{C}=\text{C}-\text{H}$, respectivement.

Le mode d'élongation $\nu(\text{=CH})$ peuvent être identifiés par la vibration à 3010 cm^{-1} .

Descripteurs de l'ordre conformationnel et d'organisation des lipides :

Elongation C-C :

Dans la région de l'empreinte digitale, les bandes entre $990-1150\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées à l'élongation $\nu(\text{C}-\text{C})$ et sont très sensibles à l'ordre conformationnel *trans-gauche* (les interactions intramoléculaires). Les pics à 1060 cm^{-1} et 1130 cm^{-1} correspondent respectivement au $\nu(\text{C}-\text{C})$ asymétrique et symétrique en conformation *trans*. De plus, la bande autour de 1100 cm^{-1} est également attribuée aux structures contenant des conformères *trans*. Quant à la conformation *gauche*, les bandes dans la région optique du squelette apparaissent à 1086 et 1113 cm^{-1} [176-180]. Le calcul du ratio d'intensité $1060+1130\text{ cm}^{-1}/1080\text{ cm}^{-1}$ permet d'étudier la conformation *trans/gauche*. Une valeur élevée de ce rapport est liée à une organisation compacte des lipides [178, 181-185].

Déformation CH_2 (Twisting) :

La caractéristique spectrale Raman à 1300 cm^{-1} est attribuée à la déformation du groupe CH_2 . Cette bande est sensible à l'ordre conformationnel ; un pic fin indique une chaîne hydrocarbonée orientée avec une teneur élevée en conformères *trans*. Un déplacement vers

des nombres d'onde plus élevés et un élargissement de la bande indiquent une augmentation du désordre et une augmentation de la conformation de type *gauche*.

Déformation CH₂ (Wagging) :

La caractéristique spectrale Raman à 1370 cm⁻¹ est aussi attribuée à la déformation du groupe CH₂. Cette bande peut être utilisée pour le suivi des conformations de la chaîne alkyle. Cependant, la diminution et l'élargissement du pic de 1370 cm⁻¹, indique une augmentation du désordre et une augmentation de la conformation de type *gauche*.

Déformation CH₂ (Scissoring) :

En outre, les spectroscopies vibrationnelles sont utilisées non seulement pour observer l'ordre conformationnel de la chaîne et le comportement intramoléculaire, mais aussi pour déterminer les arrangements intermoléculaires de la chaîne. 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) [177, 178].

Elongation CH₂ et CH₃ :

La région 2800-3000 cm⁻¹ est attribuée aux vibrations d'élongation CH₂ et CH₃ symétriques et asymétriques.

Les bandes à environ 2850 cm⁻¹ et 2880 cm⁻¹ sont associées respectivement à l'élongation symétrique et asymétrique de CH₂ dans les spectres Raman.

Les bandes d'élongation symétrique et asymétrique de CH₃ se situent respectivement autour de 2934 et 2962 cm⁻¹.

Cette région est sensible à l'ordre conformationnel et aux interactions latérales des chaînes alkyles des lipides (les interactions intermoléculaires). Le rapport d'intensité des bandes $\nu(\text{CH}_2)$ asymétrique 2880 cm⁻¹/ $\nu(\text{CH}_2)$ symétrique 2850 cm⁻¹ peut servir comme un indicateur du degré d'organisation des lipides. Des valeurs élevées indiquent un contenu *trans* élevé et une organisation compacte des lipides [177, 178, 181, 182].

➤ **Microspectroscopie Raman pour l'analyse de la barrière cutanée *in vivo* :**

La spectroscopie Raman est particulièrement utile pour caractériser la barrière cutanée *in vivo* [186, 187]. En fait, cette méthode permet d'obtenir des informations moléculaires et tissulaires sur les lipides, les protéines, les facteurs naturels d'hydratation (NMF) ou les

molécules d'eau contenues dans le SC [181, 187], qui représentent tous des composants essentiels pour maintenir une fonction barrière optimale. La spectroscopie Raman peut mesurer des spectres à des profondeurs spécifiques de la surface de la peau, jusqu'à 100-200 μm . L'information structurelle et organisationnelle des liaisons moléculaires possède des signatures caractéristiques, qui permettent d'identifier la nature et la structure d'une molécule sous forme libre ou liée, ainsi que l'interaction avec son environnement. Par conséquent, cette méthode peut être utilisée pour collecter des informations sur la qualité de la fonction barrière du SC ainsi que sur l'épaisseur de SC [188]. Elle peut également être utilisée pour étudier la pénétration des substances actives et la distribution de concentration à travers le SC [189].

Parmi les différents mécanismes participant à la fonction barrière, la matrice lipidique extracellulaire du SC représente l'élément essentiel. En effet, la composition lipidique ainsi que l'organisation permettent une fonction barrière efficace.

Dans les bicouches lipidiques de la matrice du SC, les lipides à longue chaîne peuvent adopter trois types d'arrangements, qui diffèrent par leurs mobilités (Figure 23) :

- La phase orthorhombique, la plus dense et celle prédominante dans le SC humain. Les chaînes lipidiques ont une conformation *trans* et sont organisées en un réseau cristallin sans mobilité rotationnelle ni translationnelle.
- Dans la phase hexagonale, les chaînes lipidiques *trans* ont une mobilité rotationnelle le long de leurs axes mais leur mobilité translationnelle est limitée.
- Dans la phase cristalline liquide, les chaînes présentent un haut degré d'isomérisation *gauche* et perdent leur organisation latérale. Les chaînes présentent alors une mobilité rotationnelle ainsi qu'une mobilité translationnelle élevées.

La disposition de cette organisation latérale affecte significativement la perméabilité du SC à l'eau : une conformation désordonnée des lipides au sein du SC le rendra plus perméable qu'une conformation ordonnée [190].

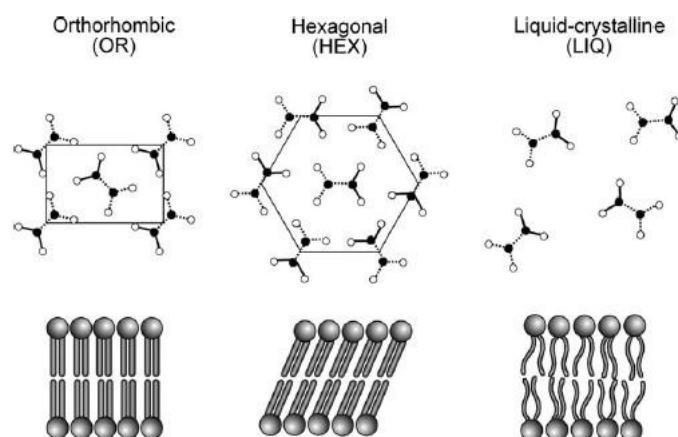


Figure 23 : Organisation moléculaire latérale des lipides du SC [72].

Le spectre Raman de l'analyse *in vivo* :

Les mesures sont réalisées sur 2 zones spectrales :

- Région « empreinte digitale » : $400 - 2200 \text{ cm}^{-1}$
- Région « hauts nombres d'ondes » : $2500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$

De nombreuses informations peuvent être extraites des spectres Raman, notamment sur la conformation et l'organisation des lipides, la structure secondaire des protéines et l'état d'hydratation des SC. Les quantités relatives des facteurs d'hydratation naturelle (NMF) peuvent également être évaluées par la méthode des régressions linéaires basée sur des spectres de référence des NMF et d'autres composants du SC.

Le Tableau 3 regroupe les informations actuellement disponibles et d'intérêt concernant la caractérisation du SC.

| Longueur d'onde (cm ⁻¹) | Attribution (ν : élongation δ : déformation) | Caractérisation cutanée et observations physio-pathologiques |
|---|--|---|
| 1050 – 1150 | $\nu\text{C-C}$ | Associé à l'état conformationnel |
| 1060 & 1130 1080 | $\nu\text{C-C}_{\text{trans}}$ $\nu\text{C-C}_{\text{gauche}}$ | |
| AUC (1060 + 1130) / 1080 | $\nu\text{C-C}_{\text{trans}}$ / $\nu\text{C-C}_{\text{gauche}}$ | Reflète l'organisation des chaînes lipidiques. Augmentation du ratio : organisation plus compacte. |
| 1296 | δCH_2 | Position sensible aux désordres conformationnels des lipides, liée à l'état d'organisation latérale des lipides. Décalage vers un plus haut nombre d'onde reflète une augmentation des désordres conformationnels. |
| 1410 – 1480 | Cisaillement CH | |
| 1600 – 1700 | Amide I (AI) | Reflète la structure secondaire des protéines |
| 1630 1650 1670 1690 | Feuillet- β Hélice- α Feuillet- β et struct. aléatoires structures aléatoires | |
| 2800 – 3000 | νCH_2 et νCH_3 | |
| 2850 2885 2932 | $\nu\text{CH}_{2\text{sym}}$ $\nu\text{CH}_{2\text{asym}}$ $\nu\text{CH}_{3\text{asym}}$ | Associé aux lipides (symétriques) Associé aux lipides (asymétriques) Associé aux protéines |
| AUC 2885 / 2850 | $\nu\text{CH}_{2\text{asym}}/\nu\text{CH}_{2\text{sym}}$ | Marqueur de compacité |
| AUC (2885+2850)/2932 | $(\nu\text{CH}_{2\text{asym}} + \nu\text{CH}_{2\text{sym}})/\nu\text{CH}_3$ | Le rapport de bandes caractéristiques des lipides sur les bandes caractéristiques des protéines. |
| 2930 | Position du maximum bande $\nu\text{CH}_{3\text{asym}}$ | Structure tertiaire de la kératine. Décalage du pic vers nombre d'onde inférieur montre un repliement de la kératine, favorise les interactions intramoléculaires. |
| 3060 | $\nu=\text{CH}$ | |
| 3100 – 3700 | νOH | Eau totale |
| 3100 – 3350 3245 – 3420 3420 - 3620 | Eau liée Eau partiellement liée Eau non liée | La décomposition de cette région spectrale (νOH) permet de mettre en évidence la mobilité de l'eau au sein du SC. |
| AUC 3500 / 2900 | $\nu\text{OH}/\nu\text{CH}$ | Détermination de la quantité de l'eau dans le SC. Détermination de l'épaisseur du <i>Stratum Corneum</i> . |

Tableau 3 : Attribution des bandes et marqueurs Raman in-vivo d'intérêt [84, 177, 178, 186, 191-194].

3) La spectroscopie infrarouge

a) Principe de la spectroscopie infrarouge : Absorption infrarouge

La spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption du rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Le rayonnement infrarouge varie de 14000 cm^{-1} à 10 cm^{-1} ($0,8 \text{ }\mu\text{m}$ à $1000 \text{ }\mu\text{m}$) et se situe entre la région visible du spectre électromagnétique et les micro-ondes. Ce domaine IR est divisé en trois régions : le proche-IR, le moyen-IR et le lointain-IR. Le proche-IR, qui est plus énergétique, se situe approximativement entre 14000 et 4000 cm^{-1} ($0,78 \text{ }\mu\text{m}$ à $2,5 \text{ }\mu\text{m}$) et permet d'étudier les vibrations harmoniques et combinaisons. Le moyen-IR entre 4000 - 400 cm^{-1} ($2,5 \text{ }\mu\text{m}$ à $25 \text{ }\mu\text{m}$) a une énergie qui coïncide avec l'énergie des mouvements internes des molécules. Il est utilisé pour étudier les vibrations fondamentales et caractéristiques ainsi que la structure vibrationnelle associée des liaisons chimiques. L'IR lointain, approximativement de 400 cm^{-1} à 10 cm^{-1} ($25 \text{ }\mu\text{m}$ à $1000 \text{ }\mu\text{m}$), est moins énergétique et permet d'étudier la spectroscopie rotationnelle.

L'IR moyen est le domaine le plus utilisé en spectroscopie IR car il permet d'étudier les vibrations fondamentales et caractéristiques ainsi que la composition et structure moléculaires associées aux liaisons chimiques. En effet, l'énergie du moyen-IR correspond à l'énergie des mouvements internes des molécules. Cette spectroscopie est également appropriée pour étudier les interactions moléculaires.

Un mode vibrationnel est dit actif dans l'infrarouge si l'absorption d'énergie peut provoquer une modification du moment dipolaire de la liaison. Chaque molécule a ses propres modes de vibrations de fréquences et d'énergies caractéristiques. L'énergie de la vibration moléculaire est mesurée par son amplitude.

Lorsque l'énergie apportée par le rayonnement incident est voisine de l'énergie de vibration d'une liaison, cette dernière va absorber le rayonnement et provoquera une diminution de l'énergie transmise.

$$T = I / I_0$$

$$A = \text{Log } 1/T = \text{Log } (I_0 / I)$$

Avec :

T : facteur de transmission ou transmittance (en %)

A : absorbance

I_0 : intensité du rayon incident

I : intensité du rayon transmis

Ces grandeurs sont reliées à la concentration de l'échantillon par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l c$$

Avec :

ϵ : coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l : épaisseur de l'échantillon traversée par l'onde (cm)

c : concentration de l'échantillon ($mol \cdot L^{-1}$)

b) La spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Les instruments se répartissent en deux catégories : les spectromètres de type dispersif et les spectromètres à transformée de Fourier. La première catégorie utilise des filtres ou un monochromateur tandis que la seconde est basée sur l'emploi d'un interféromètre de Michelson.

Dans cette partie, on va se baser juste sur le principe de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Principe de la spectroscopie FT-IR :

Le faisceau infrarouge provenant de la source IR est dirigé vers l'interféromètre de Michelson (Figure 24) qui va moduler chaque longueur d'onde à une fréquence différente. Le faisceau arrive sur la séparatrice qui le divise en deux. Une partie est dirigée vers le miroir fixe (miroir fixe) et le reste passe à travers la séparatrice vers le miroir mobile (miroir mobile). Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences constructives ou destructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile.

Le faisceau modulé est réfléchi vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur qui le transforme en signal électrique. Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme : signature de l'intensité en fonction de la position du miroir (somme de toutes les fréquences du faisceau). Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée Transformée de Fourier (TF).

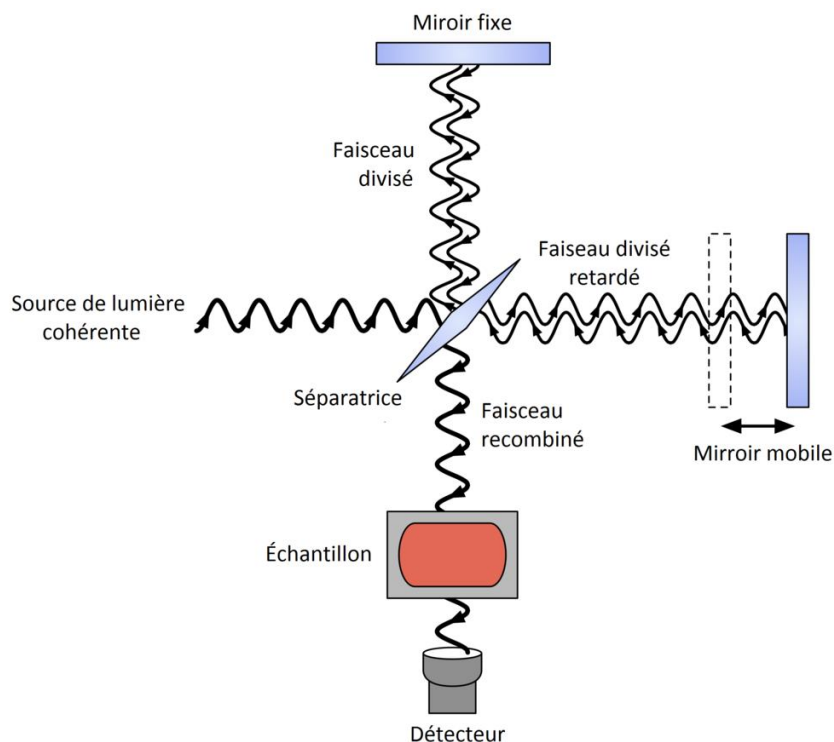


Figure 24 : Schéma de l'interféromètre de Michelson.

c) Modes d'analyses en spectroscopie IR

Deux modes sont généralement possibles en spectroscopie IR : la transmission et la réflexion. En mode transmission, le faisceau IR traverse l'échantillon et l'énergie provenant de ce dernier est mesurée. Le signal est recueilli et envoyé au détecteur. Soit l'onde incidente a pour intensité lumineuse I_0 avant l'échantillon. Elle est égale à I après avoir traversé l'échantillon. On obtient donc une transmittance $T = I/I_0$. L'absorbance est donc $A = -\log T = \log(I_0/I)$.

Pour le mode transmission, le rayonnement IR traverse l'échantillon pour arriver au détecteur. Cette méthode est relativement simple et permet d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives. Cette méthode nécessite une épaisseur faible et une préparation de l'échantillon sur des supports spécifiques coûteux (CaF_2 , BaF_2 , ZnSe ...).

Le mode réflexion utilisé est dépendant de la nature des échantillons et peut être de différentes sortes : réflexion diffuse, réflexion spéculaire et réflexion totale atténuée (ATR) (Figure 25).

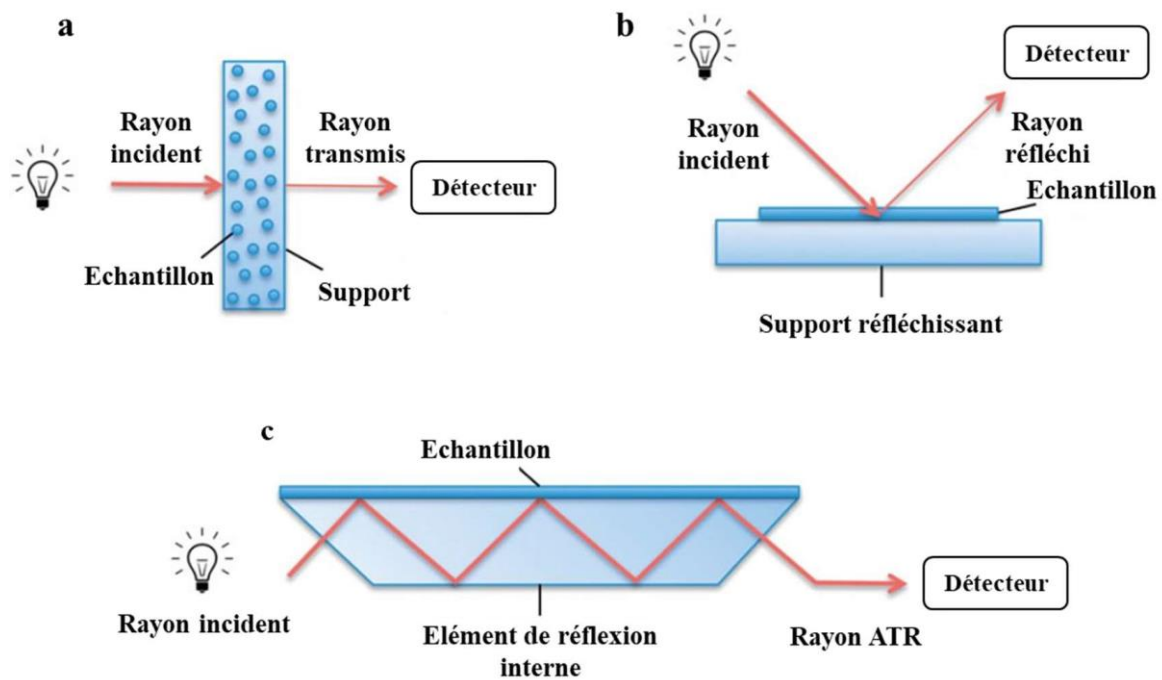


Figure 25 : Les principaux modes d'acquisition en spectroscopie FT-IR : (a) mode transmission, (b) mode réflexion et (c) mode réflexion totale atténuée ou ATR [195].

Seul le principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sera abordé dans cette partie.

Le principe de cette technique se base sur la différence entre les indices de réfraction entre deux milieux. Au-delà d'un angle critique θ la lumière est entièrement réfléchi.

En ATR on fait subir au faisceau optique une ou plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un matériau transparent dans le domaine de longueur d'onde choisi avec un indice de réfraction n élevé tel le germanium ($n= 4$), le diamant ($n= 2,4$) ou le KRS-5 ($n=2,4$) sur lequel il a été déposé (Figure 26). Si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique, la lumière ne pénètre que faiblement dans l'échantillon à une profondeur de quelques dixièmes de micromètres environ. La profondeur de pénétration dépend de la longueur d'onde, des indices de réfraction du cristal, de l'échantillon et de l'angle d'incidence. On dit qu'on est en présence d'une onde évanescente. Les principaux avantages de l'ATR, par rapport aux acquisitions en modes transmission ou réflexion, sont, *i.* l'indépendance de la mesure de l'épaisseur de l'échantillon et *ii.* l'absence de préparation complexe de l'échantillon. Il est nécessaire cependant de s'assurer que l'échantillon soit bien en contact avec le cristal [18].

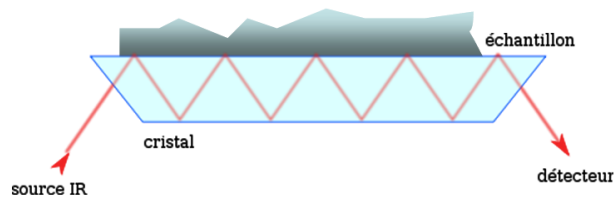


Figure 26 : Représentation schématique du cristal ATR [18].

d) Imagerie par ATR-FTIR

Le couplage à un système de microscopie permet d'accéder à une résolution spatiale micrométrique et l'évolution des systèmes de pilotage permet l'accès à des cartographies spectrales, dites images hyperspectrales. La résolution spatiale est limitée par l'ouverture numérique de l'objectif, la longueur d'onde incidente et les pixels du détecteur. En infrarouge classique la résolution spatiale optimale est de l'ordre d'une dizaine de micromètres ce qui correspond à la résolution attendue pour une longueur d'onde de 25 μm .

En ATR, la lumière étant dans un milieu avec un indice de réfraction élevée (n) avant le contact avec l'échantillon, la longueur d'onde est divisée par n . Dans le cas du germanium ($n=4$) utilisé dans nos expériences, la longueur d'onde est divisée par 4 et nous permet d'accéder à une résolution spatiale latérale de 3 μm .

e) Spectres infrarouge de la peau

La spectroscopie d'absorption Infrarouge permet d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues par spectroscopie Raman au niveau des différents constituants moléculaires de la peau [178, 196, 197].

Pour les protéines, la liaison peptidique possède de nombreux modes de vibration et donne différentes bandes, notées amide I à amide VII. Parmi ces vibrations, les bandes amide I et amide II sont particulièrement actives en infrarouge (Tableau 4). L'analyse fine de leur position donne des informations sur la structure de la protéine étudiée, notamment le pourcentage des différentes structures secondaires, hélice α , feuillet β ou les structures aléatoires (random coil).

| Structure secondaire | Fréquence (cm ⁻¹) | |
|---|-------------------------------|-----------|
| | Amide I | Amide II |
| Hélice α | 1650-1652 | 1516-1540 |
| Feuillet β chaînes antiparallèles | 1630-1645 | 1530-1550 |
| Feuillet β chaînes parallèles | 1632-1685 | 1530 |
| Random coil | 1656 | 1535 |

Tableau 4 : Détermination de la structure secondaire des protéines [18].

Pour les lipides, l'attribution des vibrations est plus difficile comparée à la spectroscopie Raman en raison des largeurs des bandes et leur chevauchement.

Dans les spectres infrarouge les positions des $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) et $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$ ($\sim 2930 \text{ cm}^{-1}$) sont souvent utilisées comme marqueurs de l'évolution de l'organisation. Un décalage de la bande $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ vers des hauts nombres d'onde et de la bande $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$ vers des nombres d'ondes plus bas est indicatif d'un désordre.

4) Analyse des LCS par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les lipides cutanés de surface (LCS) constituent un mélange très complexe dans l'environnement biologique et sont généralement présents à de très faibles concentrations [198]. Ce mélange contient de très nombreuses molécules (environ 250 lipides cutanés de surface) qui présentent des propriétés physico-chimiques (polarité, masse moléculaire, température d'ébullition, volatilité ou encore micro-hétérogénéité structurale) très proches et d'autres très éloignées, rendant ainsi leur étude complexe. Leur analyse et leur caractérisation moléculaire fine nécessitent l'utilisation de méthodes séparatives efficaces et adaptées.

Les lipides cutanés de surface sont étudiés depuis de nombreuses années, mais principalement après la séparation des classes de lipides. Leur micro-hétérogénéité structurale est généralement analysée en séparant d'abord les classes par chromatographie sur couche mince (CCM) : acides gras libres [199-201], cires avec ou sans clivage [201-205] et triglycérides, généralement après clivage [201, 206, 207]. L'identification individuelle des composés et la quantification sont ensuite effectuées à l'aide de techniques additionnelles telles que la photodensitométrie [39, 208, 209], la chromatographie en phase liquide haute performance en phase normale (NPLC) couplée à la spectrométrie de masse en ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI-MS) [205], la chromatographie gazeuse couplée à

un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) [199, 204, 206, 210] ou à un spectromètre de masse en impact électronique (GC-MS) [199, 201, 203]. La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton a également été utilisée comme méthode d'analyse semi-quantitative des différentes classes lipidiques du sébum [211].

Pour l'identification de substances dans des matrices biologiques complexes, une technique physico-chimique combinant sensibilité et sélectivité est requise [212].

Camera et al. [35] ont mis au point une méthode analytique permettant d'étudier les classes lipidiques du sébum sans séparation préalable. Ces analyses sont réalisées en utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution avec ionisation par électrospray (électrospray).

La chromatographie en phase gazeuse a un pouvoir de séparation plus élevé que la chromatographie en phase liquide. Elle est parmi les techniques séparatives couramment utilisées dans l'analyse des lipides cutanés de surface [35, 36, 80].

En effet, la grande longueur de colonne (30m) permet d'obtenir une très bonne résolution. En revanche, il nécessite que la molécule étudiée soit volatile pour pouvoir être élue. Les ajustements sur colonne ou les gradients de température peuvent rendre les molécules plus volatiles pendant l'analyse. La phase stationnaire étant peu polaire, la séparation des molécules est principalement basée sur la longueur de la chaîne hydrocarbonée.

Les molécules de sébum sont volatiles et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse semble optimale pour avoir une meilleure résolution. L'équipe Lip(Sys)² a développé une méthode de chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS) qui permet d'établir le profil global d'un mélange complexe composé de lipides cutanés de surface, tout en préservant l'intégrité structurale de tous les composés présents [36].

Cette méthode possède plusieurs avantages :

- Cette méthode permet tout d'abord la caractérisation de l'ensemble des LCS en une seule analyse.
- La chromatographie gazeuse permet ainsi une séparation des lipides, y compris les composés non polaires à hautes masses moléculaires, grâce à l'utilisation de colonnes

capillaires peu polaires ([100% diméthylpolysiloxane], [5% diphenyl / 95% diméthylpolysiloxane]) et supportant des températures élevées.

- La haute température est utilisée afin de permettre la détermination de profils lipidiques totaux, et d'éluer les tri-glycérides [212].
- L'injection à froid grâce au mode d'injection « on-column » permet d'éviter la dégradation thermique de composés fragiles.

Le pouvoir résolutif important de la GC permet de séparer les molécules les unes des autres, un pic chromatographique correspondant à une molécule des LCS (Figure 27).

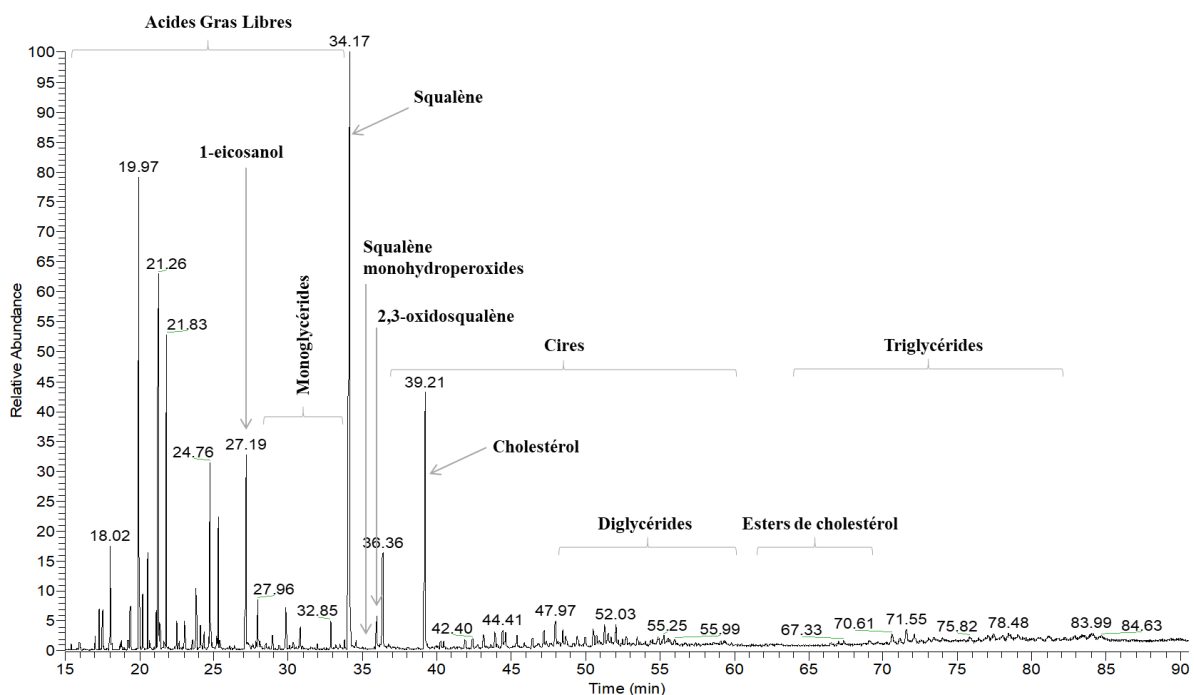


Figure 27 : Profil chromatographique obtenu après analyse en HT-GC/MS, impact électronique, des lipides cutanés de surface [213].

Afin de rendre les molécules volatiles, une dérivation peut être effectuée, par exemple par ajout d'un groupement triméthylsilyl [214, 215]. Cette dérivation consiste en un remplacement de la molécule d'hydrogène sur le groupement hydroxyle par un groupement triméthylsilyl.

L'analyse des temps de rétention ainsi que du rapport masse sur charge (m/z) obtenu grâce au couplage avec la spectrométrie de masse, permettent d'obtenir une caractérisation fine des molécules présentes dans le mélange étudié.

Partie 2 : Méthodologies expérimentales

Les travaux expérimentaux effectués dans le cadre de cette thèse ont été réalisés, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. La mise en place a nécessité une adaptation et une optimisation à la fois concernant la préparation de l'échantillon, l'irradiation, la mesure et l'analyse des données. Bien que les publications mentionnent rapidement ces éléments, elles ne permettent pas à leur lecteur de reproduire une expérience similaire.

L'objectif de ce chapitre est à la fois de mettre en évidence l'étendue des différentes mises en place et d'apporter les informations nécessaires pour qu'un expérimentateur puisse reproduire le travail.

I) Mise en place du système d'irradiation :

Pour les deux premières parties de la thèse, un simulateur solaire qui donne un spectre complet de la lumière du soleil a été utilisé pour étudier l'impact des rayonnements solaires sur les LCS et pour évaluer le rôle des LCS dans la protection contre ces rayonnements et l'action des filtres solaires.

Pour la dernière partie, pour étudier *in vivo* séparément l'impact des doses sous érythémateuses d'UVA et d'UVB, un simulateur fibré a été utilisé.

1) Simulateur de soleil : Solar Light

Les lampes au xénon émettent un spectre lumineux très proche de celui du soleil et peuvent être filtrées pour fournir une correspondance très proche du spectre UV terrestre.

Le Solar Light® (Figure 28) 16S-300 (Lampe à arc court au xénon) à sortie unique de 300 W produit un faisceau ponctuel de 3 pouces (7,5 cm de diamètre). Le spectre d'émission reproduit le spectre complet de la lumière du soleil.



Figure 28 : Solar Light 16S-300.

2) Mesure de la dose d'irradiation du simulateur solaire :

a) Pyranomètre :

Un pyranomètre est un capteur utilisé pour la mesure de la quantité d'énergie solaire en lumière naturelle et est notamment utilisé en météorologie (Figure 29). Il permet la mesure de la puissance du rayonnement solaire total en watts par mètre carré. Il est sensible dans un domaine spectral de 300 à 2500 nanomètres.



Figure 29 : Pyranomètre (Glenside, USA).

b) Radiomètre UV-A UV-B : Vilber

Les radiomètres Vilber (Figure 30) enregistrent l'intensité du rayonnement ultraviolet pour une longueur d'onde UV spécifique (UVA, UVB, UVC). L'intensité du rayonnement UV se mesure en mW/cm^2 . Le radiomètre VLX-3W indique la quantité d'énergie UV sur une surface pendant un temps spécifique. Les données sont définies en mJ/cm^2 .



Figure 30 : Radiomètre Vilber VLX-3W.

La puissance maximale d'irradiation mesurée par le pyranomètre est égale à $0,54 \text{ W}/\text{cm}^2$.

Grâce aux capteurs d'UVA et UVB, il est possible de mesurer la puissance:

- UVA : 365 nm (distribution gaussienne entre 320 et 400 nm centrée à 365 nm),
- UVB : 312 nm (distribution gaussienne entre 280 et 315 nm centrée à 312 nm),

| | Puissance (mW/cm ²) |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| UVA | 8,413 |
| UVB | 1,515 |
| Spectre total du simulateur solaire | 540 |

Tableau 5 : Puissance en mW/cm² d'UV-A, d'UV-B et du spectre solaire total.

3) Simulateur fibré :

Une source de lumière DH-2000 Deutérium-Halogène couplée à une fibre (215-400 nm) (Ocean Optics, Dunedin, USA) équipée de filtres passe-bande UVA et UVB (Figure 31). Des doses sous érythémateuses d'UVA et d'UVB ont été appliquées soit 95 mJ/cm² pour les UVA (20 minutes d'exposition) et 15 mJ/cm² pour les UVB (20 secondes d'exposition). Un spectromètre Ocean optics a été utilisé pour mesurer la puissance d'irradiation (Figure 32).



Figure 31 : Ocean Optics – DH-2000.



Figure 32 : Spectromètre Ocean Optics.

II) Mise en place des analyses des effets du rayonnement solaire sur les LCS :

L'objectif de ce travail était d'étudier l'impact des rayonnements solaires sur chacune des classes lipidiques qui constituent les LCS. Puis, évaluer l'impact des irradiations solaires sur le mélange lipidique des LCS d'origine humaine en utilisant les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge et la chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse.

1) Les analyses par spectroscopie vibrationnelle :

Pour les mesures spectroscopiques, des solutions ont été préparées en dissolvant les lipides dans du chloroforme pour obtenir des solutions de concentration de 2 mg/ml. 20 μ L de chaque solution ont été déposés sur des lames CaF₂. Les films lipidiques ont ensuite été séchés pour éliminer les traces résiduelles de solvant et analysés par spectroscopies Raman et infrarouge.

Chaque lipide a été irradié à différents temps d'une façon cumulée puis analysé par spectroscopies Raman et infrarouge à chaque temps d'irradiation.

L'irradiation d'une façon cumulée consiste à irradier en utilisant le simulateur solaire les lipides déposés sur la lame pour une durée de 5 min puis les analyser par spectroscopies Raman et IR, puis re-irradier les lipides pour une durée de 5 min pour obtenir un temps d'irradiation de 10 min, les analyser par la suite par spectroscopies Raman et IR et ainsi de suite (Figure 33).

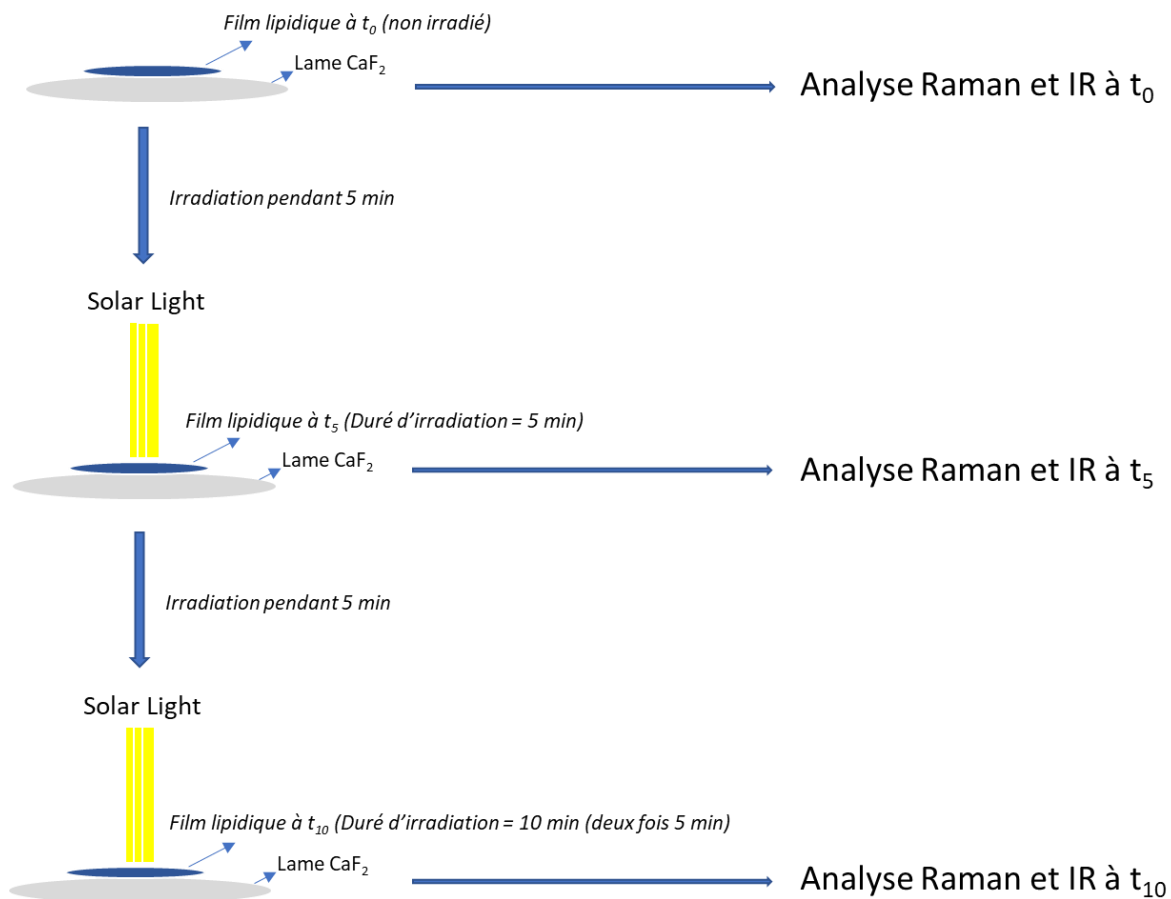


Figure 33 : Irradiation cumulée des lipides.

a) Analyse par spectroscopie Raman :

Les acquisitions spectrales Raman ont été réalisées avec un microspectromètre HR Labram (Horiba Scientific, Palaiseau, France). La source d'excitation est un laser diode avec une longueur d'onde de 633 nm (TOPTICA PHOTONICS, Allemagne) avec une puissance laser de 35 mW sur l'échantillon. Le microspectromètre est équipé d'un microscope Olympus, et les mesures ont été enregistrées avec un objectif de x100 MPlan (Olympus, Japon). La lumière diffusée par l'échantillon est collectée à travers le même objectif. Un détecteur CCD (coupled charge device) multicanal refroidi par effet Peltier (-65°C) (1024x256 pixels) détecte le signal Raman Stokes dispersé avec une largeur de fente de $400\ \mu\text{m}$ et un réseau holographique de 600 traits/mm permettant une résolution spectrale de $2\ \text{cm}^{-1}$. Une procédure de calibration a été appliquée quotidiennement avant la collecte des données, comme recommandé par Horiba Scientific. La position de l'ordre zéro et la ligne laser ont été vérifiées quotidiennement. Pour cette étude, la gamme spectrale sélectionnée était de $400\text{-}3800\ \text{cm}^{-1}$. L'acquisition de

chaque spectre a nécessité 3 minutes. L'acquisition spectrale a été réalisée à l'aide du logiciel Labspec 6 (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

b) Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FT-IR) :

Les données spectrales ont été enregistrées à l'aide du Spotlight 400 (Perkin Elmer Life Sciences, Grande-Bretagne) équipé d'un détecteur MCT (Mercury Cadmium Telluride) de 16 pixels refroidi à l'azote liquide. Avant chaque acquisition, un background est enregistré sur une partie propre de la lame de CaF₂. Tous les spectres ont été enregistrés dans la région de l'IR moyen (4000 à 750 cm⁻¹) avec une résolution spectrale de 2 cm⁻¹.

2) Les analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS) :

a) Préparation des échantillons :

Pour les mesures HT-GC/MS, des solutions de 2 mg/mL des LCS dans du chloroforme ont été préparées.

i) Préparation des échantillons LCS pour l'analyse en HT-GC/MS avant irradiation :

250 µL de la solution LCS avec 250 µL de la solution d'étalon interne (EI) (1-eicosanol (C₂₀:0 / C₂₀H₄₂O)) (0.15 mg/mL) dissous dans du chloroforme ont été déposés dans un flacon puis le chloroforme a été évaporé sous flux d'azote. Un film lipidique a été formé au fond du flacon. Ensuite, les LCS et l'EI ont été silylés dans 200 µL de BSTFA/Pyridine (50/50) pour 30 minutes à température ambiante. L'excès du réactif a été éliminé par évaporation sous flux d'azote puis le résidu sec a été dissous dans 250 µL de chloroforme (pour obtenir une solution finale de l'ordre de 2 mg/mL des LCS) et analysé en HT-GC/MS (Figure 34).

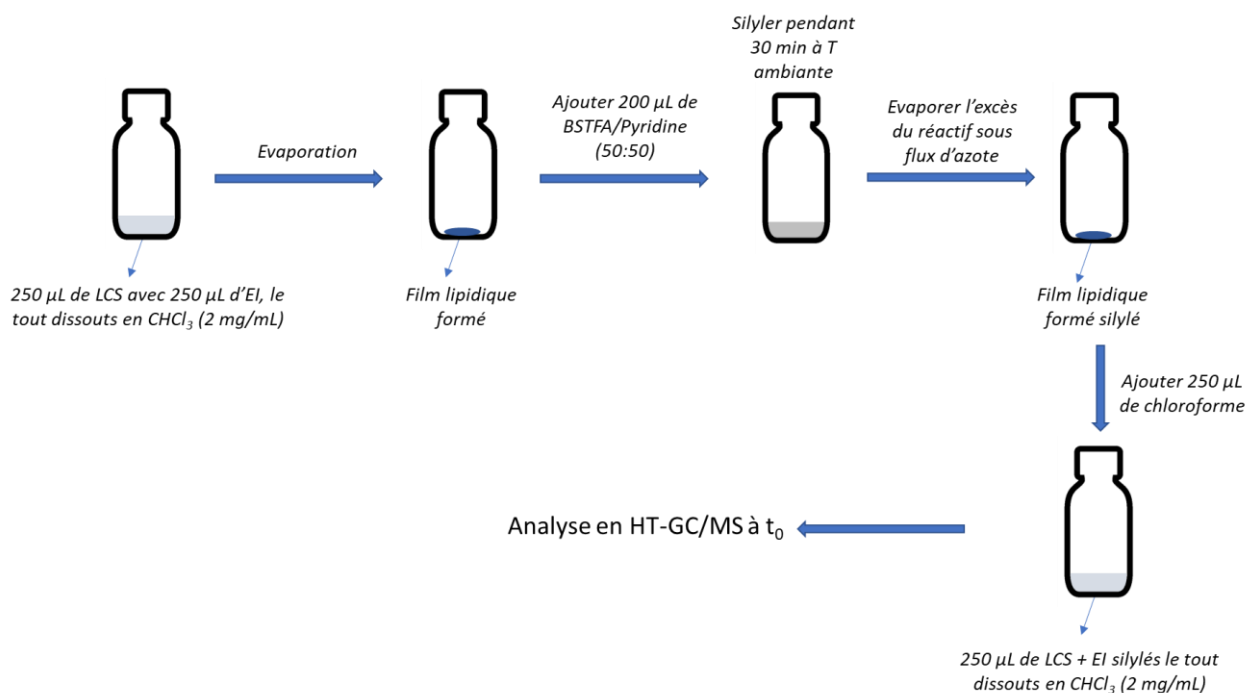


Figure 34 : Protocole d'analyse des LCS en HT-GC/MS avant irradiation.

ii) Préparation des échantillons LCS pour l'analyse en HT-GC/MS après irradiation :

250 µL de la solution LCS (extrait de LCS fournit par Pierre Fabre Dermo Cosmétics) ont été déposés dans un flacon puis le chloroforme a été évaporé. Ensuite, le film lipidique formé au fond du flacon a été irradié en utilisant le simulateur solaire (doses détaillées dans la partie travaux expérimentaux). Après l'irradiation, 250 µL de la solution d'étalon interne (EI) (0.15 mg/mL) dissous dans du chloroforme (1-icosanol ($\text{C}_{20}:0$ / $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}$)) ont été ajoutés sur le film lipidique formé puis le chloroforme a été évaporé sous flux d'azote. Ensuite, les LCS irradiés et l'EI ont été silylés dans 200 µL de BSTFA/Pyridine (50/50) pour 30 minutes à température ambiante. L'excès du réactif a été éliminé par évaporation sous flux d'azote puis le résidu sec a été dissous dans 250 µL de chloroforme pour obtenir une solution finale de l'ordre de 2 mg/mL et analysé en HT-GC/MS (Figure 35).

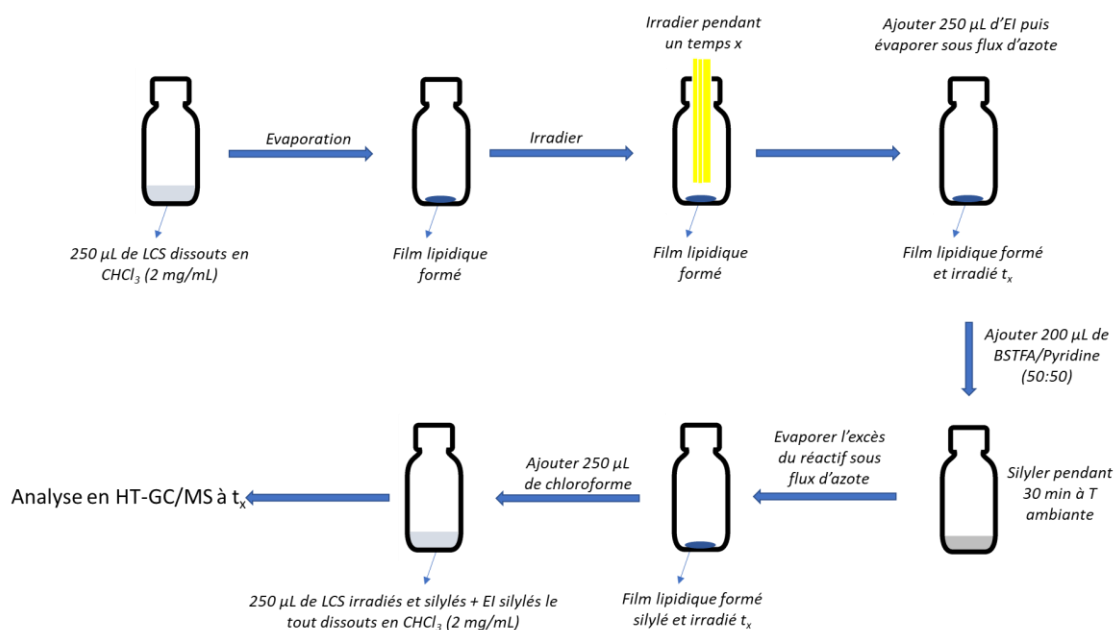


Figure 35 : Protocole d'analyse des LCS en HT-GC/MS après irradiation.

b) Analyses en HT-GC/MS:

Les analyses ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse (ThermoScientific, Austin, TX, Etats-Unis, modèle Ultra Trace GC), muni d'un injecteur « on-column », couplé à un spectromètre de masse à trappe ionique (ITQ 900) via une interface haute température.

La séparation des lipides a été réalisée en utilisant une colonne OPTIMA-5HT capillaire (Macherey-Nagel) résistante à la haute température, de longueur 30m et de diamètre interne 0,32mm, revêtue d'un film de 0,1µm de 5 % phényl – 95 % méthylpolysiloxane, connectée à une pré-colonne de 10m de long, diamètre interne 0,32mm.

L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit constant de 2 mL/min. L'injecteur et la ligne de transfert étaient à une température de 60°C et 350°C respectivement. La température du four était programmée de 60°C à 240°C, avec une augmentation de 5°C/min, puis de 240°C jusqu'à 320°C avec une augmentation de 2,5°C/min, de 320°C à 350°C à 1°C/min et de 350°C à 390°C à 30°C/min (Figure 36). Les spectres de masse en impact électronique (IE) ont été enregistrés en courant ionique total (TIC). La température de la source d'ionisation était fixée à 220°C et l'énergie d'ionisation à 70 eV.

Le mode de balayage fullscan a été utilisé, entre les rapports masse sur charge (m/z) 45 et 1000, avec une périodicité de 1s. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel ThermoFisher Xcalibur.

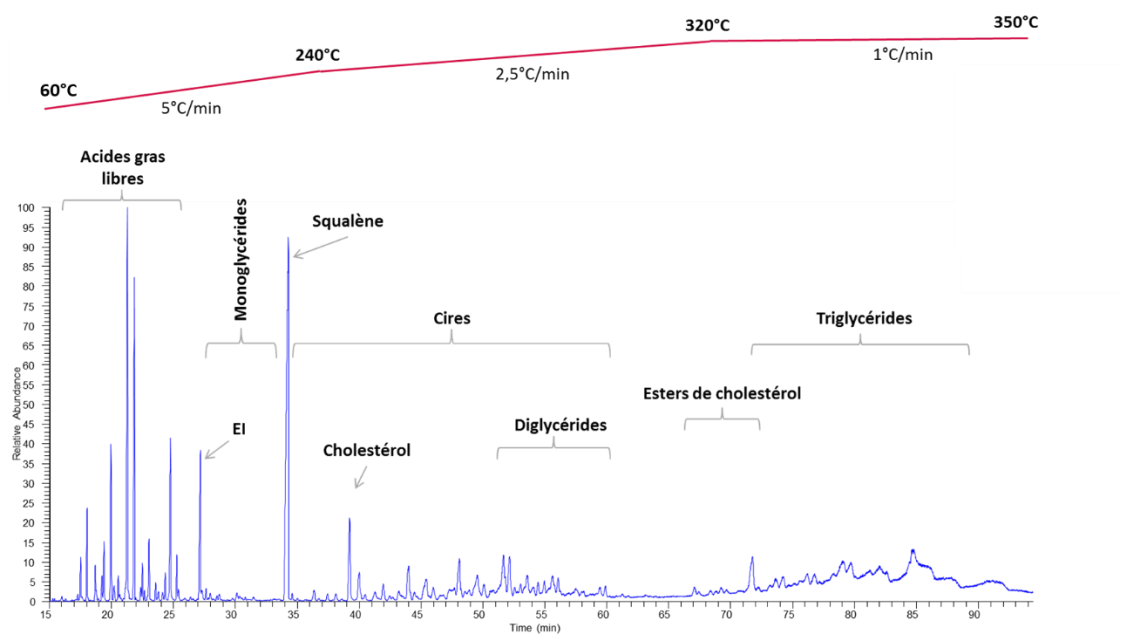


Figure 36 : Profil chromatographique des LCS obtenu en HT-GC/MS, avec gradient de température. EI : Etalon Interne (1-eicosanol) [18, 36].

III) Mise en place de l'étude des effets du rayonnement solaire sur la cinétique de déshydratation du SC : analyses par spectroscopie Raman

Il s'agit d'une nouvelle approche pour évaluer l'effet des rayonnements solaires sur le SC. Elle est basée sur l'homéostasie de l'eau du SC, en particulier la cinétique d'hydratation et de déshydratation du SC.

1) Conception et mise en place d'un protocole optimisé de préparation de l'échantillon, hydratation et irradiation du SC

a) Préparation de l'échantillon :

- Déposer une goutte d'eau sur la lame de CaF₂.
- Mettre le SC (0.5 cm²) sur la goutte et absorber la goutte avec un papier absorbant.
- Presser légèrement sur la surface pour éliminer l'air entre le SC et la lame.
- Laisser sécher à température ambiante pendant 2 heures.

b) Stabilisation du SC à humidité relative (HR) élevée :

La lame de CaF₂ où le SC a été déposé, a été installée dans une boîte remplie à moitié d'eau et fermée avec du parafilm (Figure 37).

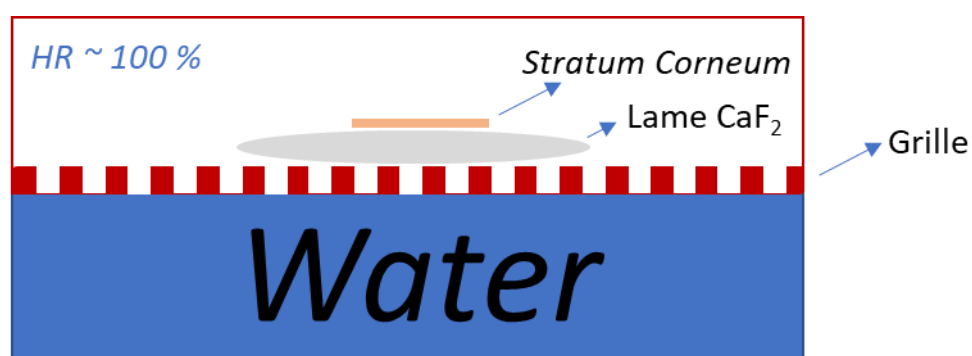


Figure 37 : Boîte de stabilisation du SC.

c) Temps de stabilisation du SC à humidité relative (HR) élevée :

Plusieurs temps de stabilisation ont été testés. Il a été constaté que la quantité d'eau retenue (AUC de la bande d'élongation OH du spectre Raman du *Stratum Corneum*) par le SC est

proportionnelle au temps d'incubation. La quantité d'eau la plus retenue était après 24 heures d'incubation à HR élevée $\sim 100\%$ (Figure 38).

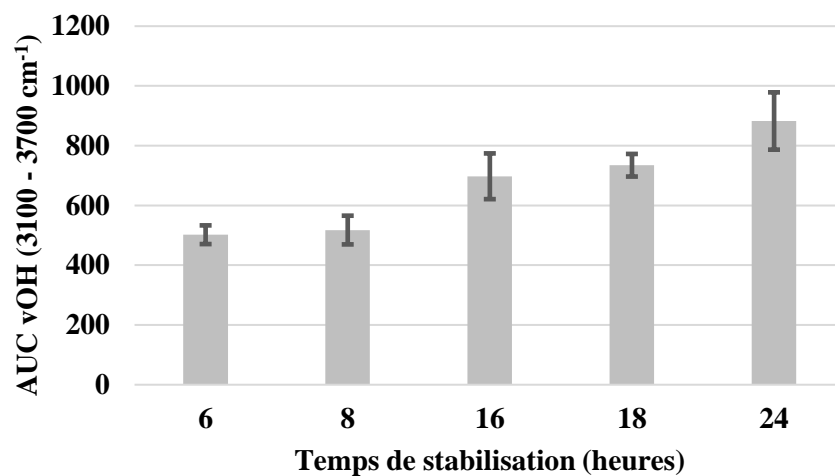


Figure 38 : Aire sous la courbe de la bande vOH (3100 – 3700 cm⁻¹) du spectre Raman du SC (n=3) en fonction de temps d'incubation.

d) Choix de la dose :

Dans un premier temps, pour étudier l'impact des rayonnements solaires sur l'hydratation du SC, le SC a été irradié directement après fixation sur la lame CaF₂ puis stabilisé pendant 24h avant l'analyse Raman. Dans un deuxième temps, le SC a été irradié à humidité relative élevée durant la stabilisation puis analysé par spectroscopie Raman.

Pour les deux séries de manipulations, le SC a été irradié pendant 5, 15 et 30 minutes.

Pour l'irradiation 5 min, pas d'effet sur l'hydratation du SC quel que soit le SC irradié à humidité relative élevée ou irradié avant stabilisation.

Pour les irradiations 15 et 30 min, nous avons remarqué qu'il y'a un effet sur la cinétique de déshydratation du SC quand il est irradié à humidité élevée.

Pour cette raison, nous avons décidé d'irradier à HR élevée mais il reste à vérifier la répétabilité à 15 ou 30 min d'irradiation.

Malgré les valeurs moyennes comparables entre 15 et 30 min, une grande variabilité a été observée entre les différentes répétitions à 30 min comparée aux répétitions à 15 min. Cela est expliqué par l'échauffement à l'intérieur de la boîte qui déstabilise le cycle hydrique du SC.

Ainsi, 15 min d'irradiation à HR élevée a été choisie pour étudier l'impact des rayonnements solaires sur les propriétés d'hydratation du SC. En outre, la même dose a été utilisée pour étudier le rôle protecteur des LCS contre ces rayonnements.

Cependant, pour déterminer la capacité de protection des LCS contre les rayonnements solaires, il a été nécessaire que le SC soit irradié à HR élevée à travers les LCS pendant des temps plus longs de 30 et 45 min mais sous formes d'irradiations de 15 minutes espacées d'une heure pour éviter l'échauffement.

Les doses sont récapitulées dans le tableau 6.

| | | | | |
|------------------------------------|------|------|------|------|
| Temps (min) | 5 | 15 | 30 | 45 |
| Spectre total (J/cm ²) | 135 | 405 | 810 | 1215 |
| UVB (J/cm ²) | 0.45 | 1.35 | 2.7 | 4.05 |
| UVA (J/cm ²) | 2.4 | 7.2 | 14.4 | 21.6 |
| DEM | 15 | 45 | 90 | 135 |

Tableau 6 : Les doses d'irradiations utilisées.

e) Irradiation du SC à humidité relative (HR) élevée :

L'échantillon est déposé dans une boîte remplie à moitié d'eau et qui dispose d'une ouverture dans son couvercle. Cette ouverture a été fermée par une lame vierge de CaF₂ (Figure 39). La boîte a été entourée par du parafilm et l'échantillon a été gardé pendant 24 heures pour l'incubation.

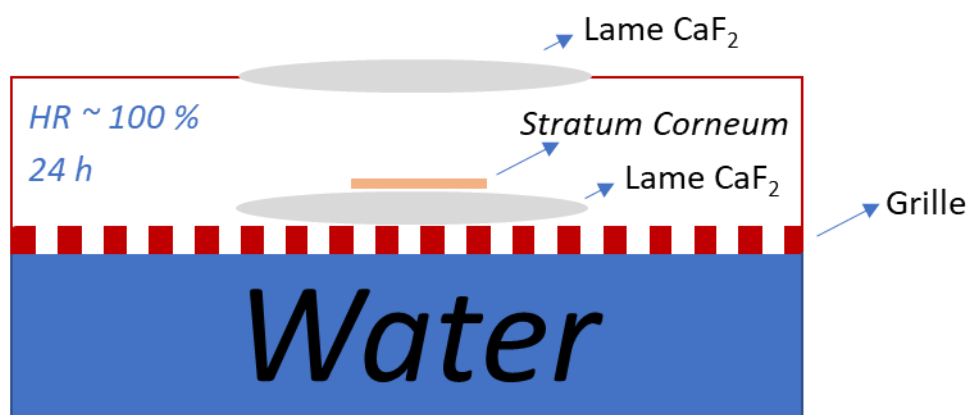


Figure 39 : Irradiation du SC à humidité élevée.

5h avant la fin de l'incubation, l'échantillon a été irradié en utilisant le simulateur solaire dans la boîte à travers la lame de CaF_2 puis le SC a été laissé dans la boîte pour continuer les 5h d'incubation restantes (Figure 40).

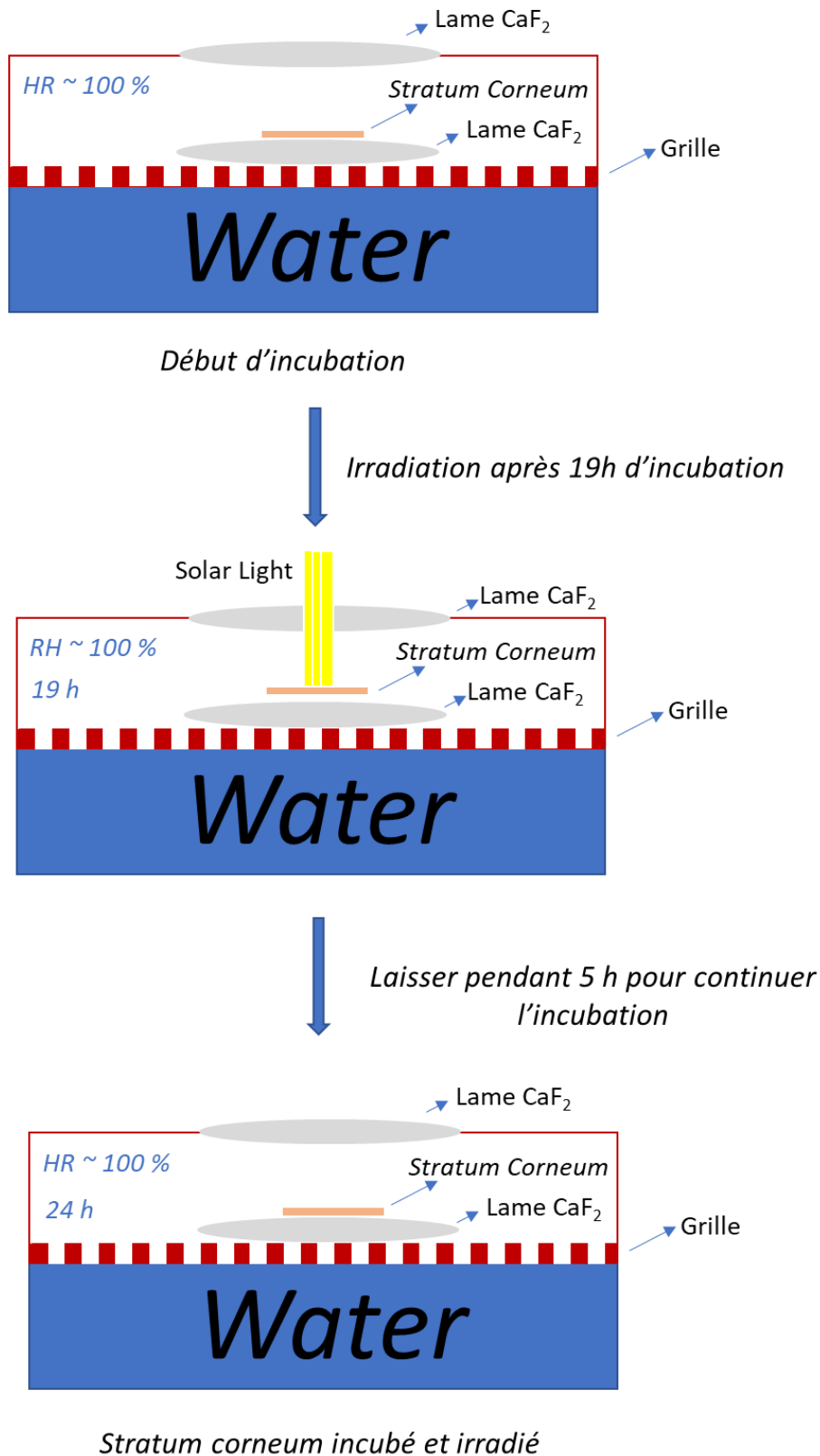


Figure 40 : Protocole d'irradiation du SC à humidité relative élevée.

2) Analyses des effets du rayonnement solaire sur l'homéostasie de l'eau du SC : Rôle protecteur des LCS et efficacité des écrans solaires

a) Rôle protecteur des LCS :

i) Préparation des LCS :

Les LCS sont fournis par le Centre de Recherche Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC, Toulouse, France).

Pour préparer la solution, 10 mg des LCS ont été dissous dans 250 μL d'EtOH absolu pour avoir une solution mère de concentration 40 mg/mL. Puis, des solutions filles avec une concentration de 2 mg/mL ont été préparées en diluant au 20^{ème} avec le sérum physiologique.

ii) Irradiation en présence des LCS :

Pour évaluer le rôle des lipides cutanés de surface dans la protection de l'homéostasie de l'eau dans le SC contre les radiations solaires, deux configurations expérimentales ont été étudiées :

- Les LCS ont été directement déposés sur le SC avant irradiation.
- Le SC a été irradié à travers les LCS déposés sur une lame de CaF_2 .

Dans les deux configurations, 2,5 μL de solution fille des LCS ont été étalés soit directement sur le SC, soit sur la lame de CaF_2 .

- LCS directement déposés sur le SC avant irradiation :

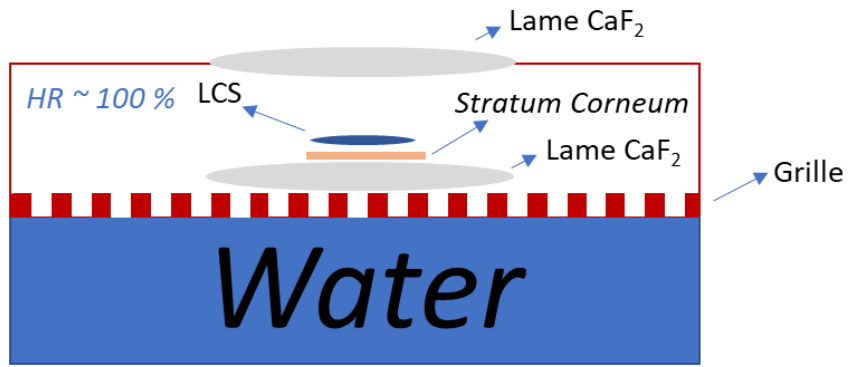
Pour cette configuration, 2,5 μL des LCS ont été déposés directement sur le SC. Ensuite, l'échantillon a été déposé dans la boîte d'incubation à HR élevée

5 h avant la fin d'incubation, le SC couvert des LCS a été irradié puis l'échantillon a été gardé à l'intérieur de la boîte pendant 5 h pour continuer les 24 h d'incubation (Figure 41).

- SC irradié à travers les LCS

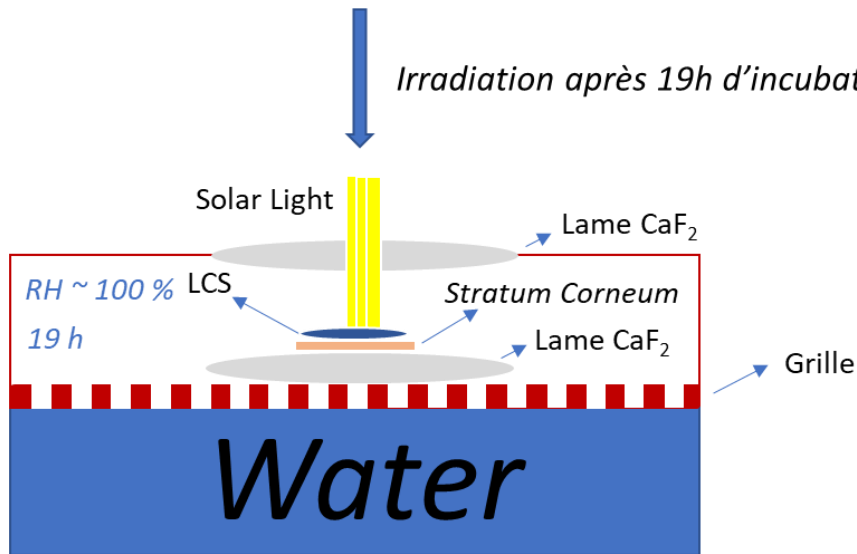
Pour cette configuration, le SC a été déposé dans la boîte d'incubation à HR élevée.

5 h avant la fin d'incubation, le SC a été irradié à travers les LCS déposés sur une lame de CaF_2 (2,5 μL de la solution) puis le SC a été gardé à l'intérieur de la boîte pendant 5 h pour continuer les 24 h d'incubation (Figure 42).

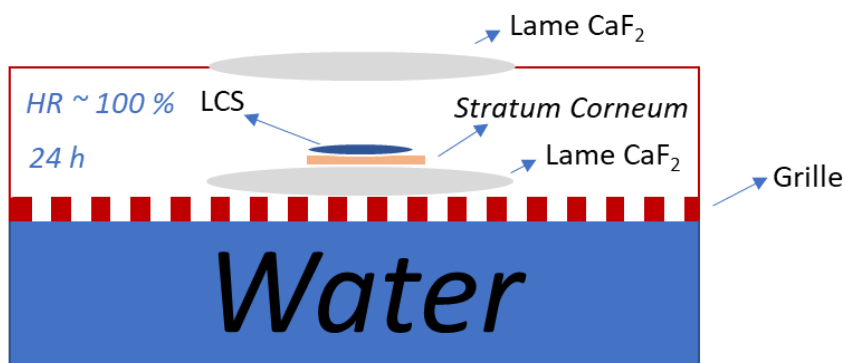


Début d'incubation

Irradiation après 19h d'incubation

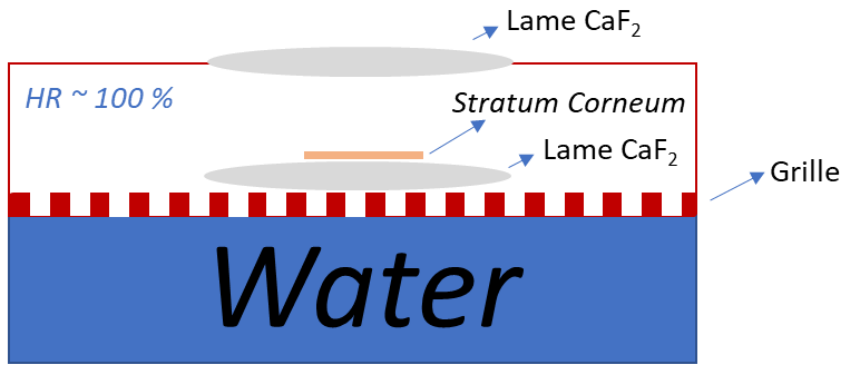


Laisser pendant 5 h pour continuer l'incubation

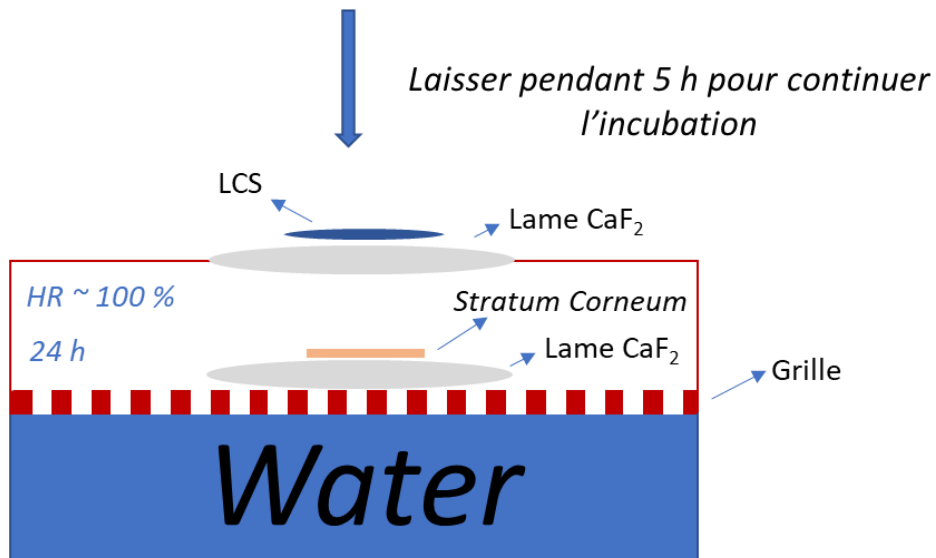
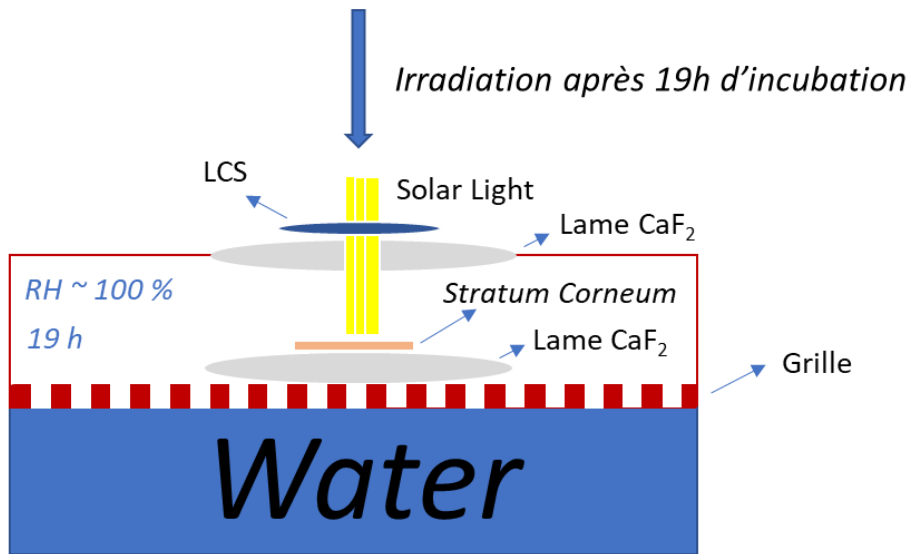


Stratum Corneum couvert des LCS incubé et irradié

Figure 41 : Protocole d'irradiation du SC couvert par des lipides cutanés de surface à humidité relative élevée.



Début d'incubation



Stratum Corneum incubé et irradié à travers les LCS

Figure 42 : Protocole d'irradiation du SC à travers les lipides cutanés de surface (déposés sur la lame CaF_2) à humidité relative élevée

b) Efficacité des écrans solaires :

i) Préparation des écrans solaires :

Les écrans solaires (formulation TriAsorb (TF) et formulation SPF50+ (FF)) sont fournis par le Centre de Recherche Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC, Toulouse, France). Le filtre TF contient juste le triAsorb (phenylene bis-diphenyltriazine) tandis que le filtre FF contient une combinaison spécifique de quatre filtres solaires.

Étalement de 2 mg/cm² des écrans solaires sur la lame de CaF₂ :

- Le diamètre de la lame est de 1 cm et sa surface est de 0,785 cm².
- Le dépôt de préparation antisolaire est de 2 mg par 1 cm², soit 1,57 mg pour 0,785 cm².
- 1,57 mg des écrans solaires correspond à 1,7 µL de préparation antisolaire.

Pour un étalement homogène et continu des 1,57 mg sur la lame, la hauteur (épaisseur) des écrans solaires sur la lame doit être calculée puis l'étalement s'effectue à l'aide d'un elcomètre :

- Volume d'un disque = $\pi \cdot r^2 \cdot h$.
- Pour 1,7 µL, $h = 0,0021 \text{ cm} = 21 \text{ µm}$

r : rayon du disque.

h : hauteur du disque (épaisseur de l'écran solaire)

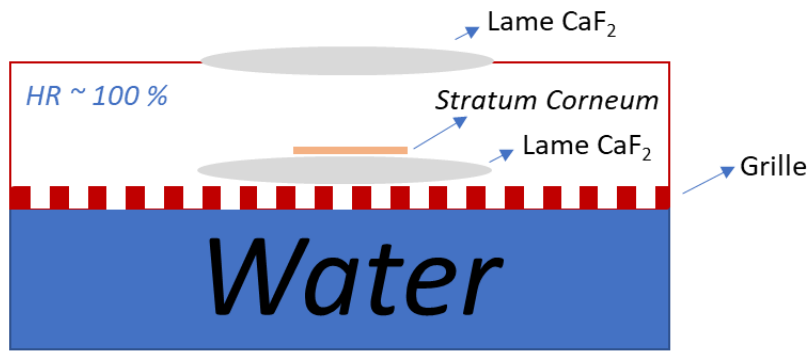
ii) Irradiation en présence des écrans solaires :

Pour évaluer l'efficacité des écrans solaires dans la protection de l'homéostasie de l'eau dans le SC contre les radiations solaires, le SC a été déposé dans la boîte d'incubation à HR élevée.

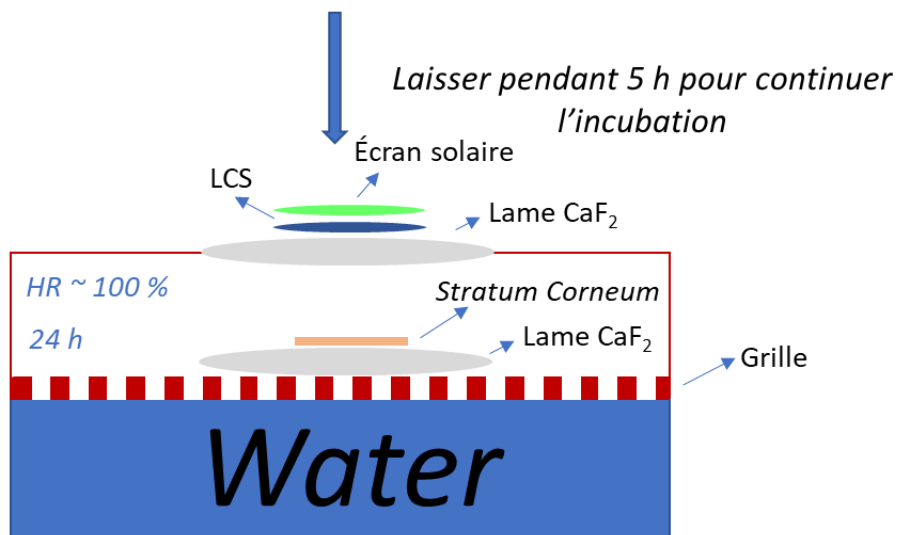
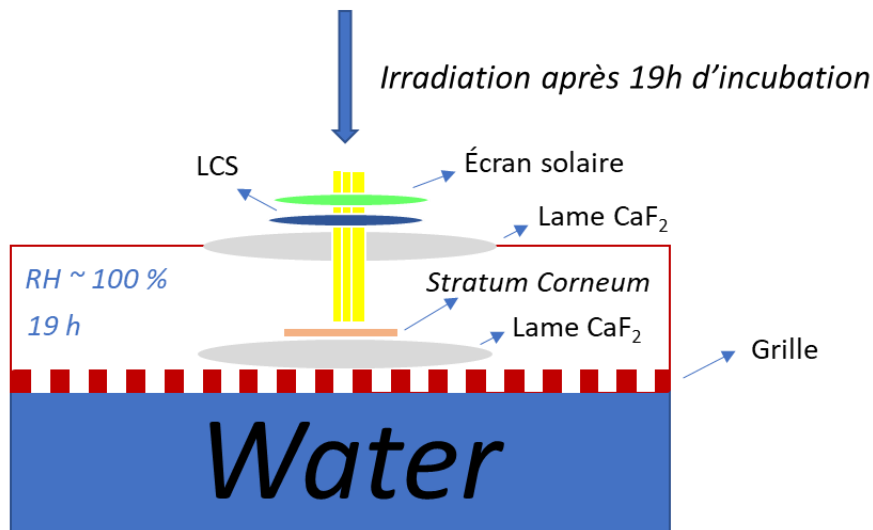
5h avant la fin d'incubation, le SC a été irradié à travers une lame de CaF₂ sur laquelle 2,5 µL des LCS et 1,7 µL (à une épaisseur de 21 µm) des écrans solaires ont été préalablement déposés. Ensuite, le SC a été laissé pendant 5 h pour atteindre les 24 h d'incubation (Figure 43).

iii) Préparation des échantillons LCS pour l'analyse en HT-GC/MS après irradiation à travers des écrans solaires :

250 µL de la solution LCS (extrait des LCS fournis par le laboratoire Pierre Fabre Dermo Cosmetis) ont été déposés dans un flacon puis le chloroforme a été évaporé. Ensuite, le film lipidique formé au fond du flacon a été irradié à travers des écrans solaires déposés sur une lame de CaF₂ (épaisseur = 21 µm). Après l'irradiation, 250 µL de la solution d'étalon interne (EI) (1-eicosanol (C₂₀H₄₂O) dissous dans du chloroforme) ont été ajoutés sur le film lipidique formé puis le chloroforme a été évaporé sous flux d'azote. Ensuite, les LCS irradiés et l'EI ont été silylés à l'aide de 200 µL de BSTFA/Pyridine (50/50) pendant 30 minutes à température ambiante. L'excès du réactif a été éliminé par évaporation sous flux d'azote puis le résidu sec a été dissous dans 250 µL de chloroforme (pour obtenir une solution finale d'une concentration initiale des LCS de l'ordre de 2 mg/mL) et analysé en HT-GC/MS (Figure 44).



Début d'incubation



Stratum Corneum incubé et irradié à travers les LCS et l'écran solaire

Figure 43 : Protocole d'irradiation du SC à travers des lipides cutanés de surface et des écrans solaires à humidité relative élevée.

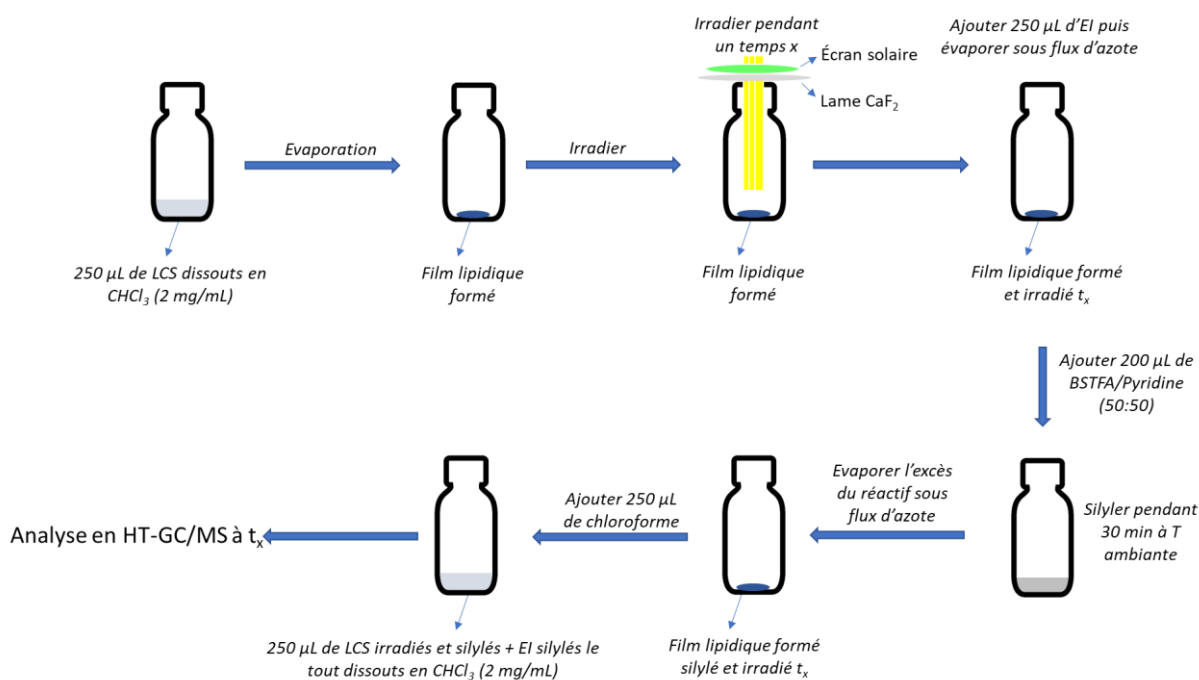


Figure 44 : Protocole d'analyse des LCS en HT-GC/MS après irradiation à travers des écrans solaires.

c) Analyse Raman de la cinétique de déshydratation :

i) Microspectromètre Raman :

Un microspectromètre confocal Raman LabRam HR Evolution (Horiba Scientific, Lille, France) a été utilisé pour l'acquisition spectrale. Une image vidéo de l'échantillon a été utilisée pour le positionnement précis du spot laser sur l'échantillon. Un laser He:Ne de 633 nm (Toptica Photonics, Munich, Allemagne) a été utilisé. La longueur d'onde d'excitation de 633 nm a été choisie car elle donne un signal Raman Stokes élevé à la fois dans l'empreinte et dans la région des nombres d'onde élevés. Un objectif 100X à longue focale/NA= 0,9 (Olympus, Tokyo, Japon) a été utilisé pour focaliser la lumière laser sur la surface de l'échantillon et pour collecter la lumière rétrodiffusée. Le trou confocal a été réglé à 200 µm. La profondeur de pénétration était de -10 à 30 µm avec un pas de 2 µm répété 21 fois.

La lumière collectée a été filtrée à travers un filtre Edge et dispersée avec une résolution spectrale de 4 cm⁻¹ en utilisant une fente de 300 µm et un réseau holographique de 300 traits/mm. Le signal Raman Stokes a été enregistré avec un détecteur CCD : Charge Coupled Device (Andor Technology, Belfast, UK) contenant 1024 x 256 pixels. L'acquisition spectrale a été réalisée à l'aide du logiciel Labspec 6 (Horiba Scientific, Lille, France). Les mesures Raman ont été effectuées sur chaque profondeur dans la gamme spectrale 400-3800 cm⁻¹. Pour chaque scan, un temps d'exposition de 5 secondes avec 2 accumulations a été utilisé.

ii) Spectroscopie Raman de la perte d'eau du SC :

L'analyse par spectroscopie Raman a été réalisée sur des échantillons de SC équilibrés à une humidité élevée (~100% RH) et ensuite placés dans un environnement sec pour étudier la désorption de l'eau. Une chambre à humidité contrôlée, basée sur un principe de flux d'air, a été construite autour du microscope. Un hygromètre/thermomètre (avec une précision de ± 2 %) a été utilisé pour mesurer l'humidité relative. L'humidité était réglée à 10 % HR. Pour obtenir l'humidité relative souhaitée, un flux d'air sec a été utilisé dans la chambre avec un débit de 3 L/min [192].

La cinétique de désorption de l'eau a été réalisée sur des SC isolés et fixés sur des lames de CaF₂. Étant donné que le SC est fixé sur une lame de CaF₂, la désorption ne se produit que d'un seul côté du SC, comme ce qui est le cas lors du séchage *in vivo* [216-218].

Des acquisitions de spectres Raman ont été réalisées sur des SC de -10 μm (avant la surface du SC) à 30 μm sous la surface, répétées 21 fois (du début du processus de séchage t_0 jusqu'à 4,25 heures de déshydratation).

Pour suivre le processus de séchage et surveiller la teneur relative en eau dans l'ensemble du SC, le rapport $v_{\text{OH}}/v_{\text{CH}}$ a été calculé à partir de chaque spectre des profils spectraux enregistrés en profondeur. La teneur relative globale en eau pour chaque profil spectral a été obtenue à partir de son aire sous la courbe entre 0 et 12 μm (limites du SC).

IV) Mise en place des analyses par spectroscopie Raman *in vivo* :

Les acquisitions spectroscopiques ont été effectuées avec un microspectromètre Raman LabramHR evolution (Horiba scientific, Lille, France). Pour effectuer les mesures *in vivo*, le microspectromètre est couplé à une sonde (superhead) portée par un bras articulé.

La configuration comprend une diode laser comme source d'excitation à 660nm, générant une source d'excitation d'environ 15mW sur l'échantillon. La sonde (superhead (Horiba scientific) comprend un filtre interférentiel pour filtrer la ligne de laser incidente et un filtre passe-haut laissant passer uniquement les raies Raman Stokes. La sonde est dotée d'un objectif de microscope longue distance MPLAN FLN 100X/NA 0.75 (Olympus, Japon) pour focaliser le faisceau d'excitation et capturer la lumière rétro diffusée. L'objectif est couplé à un système piézoélectrique permettant des déplacements en Z de 200µm avec un pas minimal de 100 nm. 2 fibres coaxiales relient la sonde au laser (excitation) pour la première et au spectromètre pour deuxième (collection). Le diamètre d'entrée de la fibre est de 5µm assurant la confocalité du système. Le faisceau de la lumière traversant la fibre collectrice est dispersé grâce à un réseau dispersif. Le signal est enregistré avec un détecteur CCD à haute sensibilité (Synapse, Horiba Jobin Yvon), refroidi à -70°C par effet Peltier. L'acquisition spectrale a été effectuée à l'aide du logiciel Labspec (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

| | Images spectrales |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Objectif | ×100 LF |
| Temps d'acquisition (s) | 2 |
| Accumulations | 2 |
| Trou confocal (µm) | 5 |
| Fente (µm) | -- |
| Réseau dispersif (traits/mm) | 300 |
| Gamme spectrale (cm ⁻¹) | 400-3800 |

Tableau 7 : Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses Raman *in vivo*.

Partie 3 : Travaux expérimentaux

Chapitre 1 : Caractérisation de la photo-oxydation des lipides cutanés de surface (LCS) sous rayonnements solaires par spectroscopie vibrationnelle.

Le rayonnement solaire a de nombreux effets bénéfiques sur le corps. Ils augmentent la vitalité, produisent des effets de bien-être, facilitent les processus circulatoires et métaboliques et stimulent la formation de la vitamine D.

Cependant, une surexposition peut avoir des effets aigus et chroniques sur la peau, les yeux et le système immunitaire. Une partie du rayonnement UV absorbé par le tissu cutané normal peut provoquer des lésions dont les conséquences vont de l'apparition de l'érythème solaire, en passant par l'accélération du vieillissement cutané, la photo-immunosuppression induite, jusqu'à l'apparition des cancers cutanés.

La peau continuellement exposée au rayonnement solaire ainsi qu'à de fortes concentrations en oxygène, est un tissu particulièrement sensible au stress oxydant.

Les lipides cutanés de surface (LCS) sont considérés comme la toute première cible des UV et des autres rayonnements environnementaux lors d'une exposition naturelle, professionnelle ou thérapeutique provoquant ainsi leurs oxydations.

La peroxydation des lipides est l'oxydation des lipides insaturés. Elle peut résulter de plusieurs voies réactionnelles : (1) l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres, (2) l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxigénase ou (3) la photooxydation initiée par l'énergie radiante telle que les UV et les rayonnements solaires.

Dans ce chapitre, l'objectif était d'étudier la photo-oxydation des lipides cutanés de surface initiée par les rayonnements solaires en utilisant les spectroscopies vibrationnelles Raman et infrarouge.

Dans un premier temps, les lipides cutanés de surface ont été irradiés individuellement, et l'effet des rayonnements solaires sur chaque classe lipidique qui constitue les LCS a été évalué par spectroscopies vibrationnelles. Cela a permis de déterminer des descripteurs spectraux afin de suivre les différentes modifications structurales au cours du processus de photo-oxydation, tel que l'abstraction d'hydrogène, la formation d'hydroperoxydes et de radicaux peroxydes comme produits d'oxydation primaires et la formation d'aldéhydes, de cétones, d'alcools comme produits d'oxydation secondaires.

Dans un deuxième temps, les techniques spectroscopiques (Raman et infrarouge) et séparatives (HT-GC/MS) ont été utilisées pour étudier l'impact des rayonnements solaires sur

l'ensemble des LCS afin de déterminer le comportement des lipides au sein du mélange des LCS.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de trois publications scientifiques (une parue (Journal of Raman Spectroscopy DOI : <https://doi.org/10.1002/jrs.6449>), deux à soumettre dans le même journal) portant sur l'effet des rayonnements solaires sur les LCS.

Article 1 : " Characterization of free fatty acids photo-oxidation under UV radiations: A stepwise Raman study"

Contexte :

La peroxydation lipidique est une détérioration oxydative lorsque des oxydants tels que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les lipides qui contiennent des doubles liaisons, notamment les acides gras polyinsaturés (AGPI). La peroxydation des lipides a été largement étudiée pendant plusieurs décennies et a fait l'objet d'une attention particulière dans le domaine de la médecine et de la biologie, et cela en raison de son rôle dans de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement. Le mécanisme de la peroxydation lipidique est composé de trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison. Il peut résulter de plusieurs voies réactionnelles : (1) auto-oxydation, (2) oxydation enzymatique et (3) photo-oxydation. L'objectif de cette étude est d'étudier l'impact des rayonnements solaires sur les acides gras, en d'autres termes la photo-oxydation des acides gras.

Matériels & Méthodes :

5 acides gras (palmitique, stéarique, oléique, sébaleique et linoléique) avec différents nombres de doubles liaisons et différentes longueurs de chaîne ont été irradié à différentes énergie en utilisant un simulateur solaire 16S-300 qui produit un spectre proche du spectre solaire. Puis, les acides gras ont été analysés par spectroscopies Raman et infrarouge.

Résultats :

Il a été démontré que les techniques vibrationnelles sont des techniques utiles pour suivre la peroxydation lipidique dans ses différentes étapes :

- L'étape d'initiation en suivant le rapport des bandes d'élongations CH_2/CH_3 qui diminue en raison de l'abstraction d'hydrogène en position alpha.
- L'étape de propagation où les produits d'oxydation primaires sont formés tels que les hydroperoxydes, a été évaluée en suivant le rapport $1165/1640 \text{ cm}^{-1}$ (δOH & νCO)/ $\nu\text{C=O}$ (Acide)) qui augmente pendant le processus d'oxydation.

- L'étape de terminaison qui est marquée par la formation d'aldéhydes, d'alcools, de cétones, de produits d'oxydation secondaires *trans* et autres a été surveillée en suivant le rapport $1730/1640\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C=O}$ (Ald.)/ $\nu\text{C=O}$ (Acide)) et le rapport $1670/1655\text{ cm}^{-1}$ (*trans* $\nu\text{C=C}$ / *cis* $\nu\text{C=C}$) qui augmentent indiquant la formation de produits d'oxydation secondaires

Conclusion :

L'utilisation des spectroscopies Raman et IR a montré l'utilité de ses techniques pour suivre, étape par étape, le processus de photo-oxydation des acides gras induit par différentes doses d'irradiations UV obtenues par un simulateur solaire.

Characterization of free fatty acids photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman study

Ali Assi, Rime Michael-Jubeli, Arlette Baillet-Guffroy, Ali Tfayli*

Author(s):

- 1- Ali Assi: ali.assi@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 2- Rime Michael-Jubeli: rime.michael-jubeli@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 3- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 4- Ali Tfayli: **This author accept correspondance and proofs**, ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.

To whom correspondence should be addressed : ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

Lip(Sys)², Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.

Abbreviations:

LPO: Lipid peroxidation.

MDA: Malondialdehyde.

PA: Palmitic acid.

SA: Stearic acid.

SB: Sebaleic acid.

OA: Oleic acid.

LA: Linolenic acid.

FWHM: Full width at half maximum.

Abstract

Lipid peroxidation (LPO) is an oxidative deterioration when oxidants such as reactive oxygen species attack lipids that contain double bonds especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The mechanism of lipid peroxidation is composed of three steps: initiation, propagation and termination. It can result from several reaction pathways : (1) auto-oxidation, (2) enzymatic oxidation or (3) photo-oxidation.

UV solar exposition is a major concern in skin research, dermatology and cosmetic science. Skin surface lipids (SSLs) and *stratum corneum* (SC) lipids are among the first skin components exposed to external insults such as UV radiations. Fatty acids represent a major lipid class in SSLs and SC. The aim of this paper is to study the photo-oxidation of fatty acids under UV solar radiations using Raman spectroscopy. Vibrational spectroscopies are useful techniques to follow the LPO in its different stages of oxidation : (1) the initiation step by following the CH₂/CH₃ stretching bands ratio which decreases due to the hydrogen abstraction in alpha position, (2) the propagation step where primary oxidation products are formed such as hydroperoxides was evaluated by following the 1165/1640 cm⁻¹ ((δ (OH) & ν (C-O))/ ν (C=O)) ratio which increases during oxidation process and finally the termination step that is marked by the formation of aldehydes, alcohols, ketone, *trans* secondary oxidation products and others were monitored by following the 1730/ 1640 cm⁻¹ (ν (C=O) (Ald.)/ ν (C=O) (Acid)) ratio and the *trans* ν (C=C)/*cis* ν (C=C) ratio which increases indicating the formation of secondary oxidation products. To our knowledge, this work is the first to put together different spectral descriptors enabling to follow, step by step, the different modifications of free fatty acids structures during the oxidation process.

Keywords: Fatty acids, Lipid Peroxidation, Solar radiation, Vibrational spectroscopy, Malondialdehyde.

Introduction

Lipids are defined as biological substances that are generally hydrophobic non soluble in water and soluble in organic solvents such as chloroform ^{1,2}.

Lipids are diverse hydrophobic or amphipathic organic compounds that act as structural components of cell membranes, sources of energy and important regulators of biological signaling pathways.

Characterization and separation of lipids by analytical and computational methods including liquid and gas chromatography coupled to Mass Spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance allowed the recognition of the essential role of lipids in the regulation of biological processes and in the progression of metabolic diseases including diabetes, obesity and even cancer ³.

Lipids are classified into eight groups: Fatty acyls, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, sterol lipids, prenol lipids, glycolipids and polyketides. Each class is also divided into classes and sub classes. Fatty acyls in turn, contain not only fatty acids (FAs) but also numerous other functional groups such as alcohols, aldehydes, amines and esters ¹.

Among all these classes and sub-classes, FAs are widely present in the human diet and are therefore predominant in human tissues. They consist of hydrocarbon chains of different lengths and degrees of saturations, with a carboxyl group at one end and a methyl group at the other ⁴. FAs can be classified based on the number of double bonds in the acyl chain into saturated FAs, monounsaturated FAs and polyunsaturated FAs ⁵. The number and orientation of these double bonds determine the biophysical properties of FAs and overall structure ^{4,5}. FAs can also be divided into short, medium or long-chain FAs based on the number of carbon atoms ¹.

In the skin, lipids are a principal constituent of the cutaneous skin barrier to prevent water loss, to protect skin from radiation and to prevent entry of harmful chemicals and organisms ⁶.

Free FAs constitute 10-20% of skin lipids (weight percent) which are mainly long-chain and saturated FAs localized in the epidermis ⁷. FAs composition of the lipid bilayer influences

membrane fluidity, interactions with membrane proteins, signal transduction pathways and defines cell type ⁴.

Lipid peroxidation (LPO) has been widely studied for several decades and has received an important attention in the field of medicine and biology, based on increasing evidence that LPO is implicated in the development of many chronic diseases such as cardiovascular disease, cancer, neurodegenerative diseases and aging ^{8,9}.

In the skin, the generation of ROS (reactive oxygen species) from LPO oxidizes glycerophospholipids, sphingolipids, unsaturated fatty acids and cholesterol, which are the principal cutaneous lipid classes, inducing an alteration in barrier function and skin disorders including photoaging, skin cancer, atopic, dermatitis and psoriasis ^{7,10,11}.

Therefore, the detection of modifications in lipid structure and analysis of lipid peroxidation products have garnered increased interest and have shown promising results in disease diagnosis where lipids can serve as potential biomarkers that not only aid in disease diagnosis but also provide prognostic insight into different diseases. This also highlights the importance of lipid-based studies in the design of targeted therapeutic strategies ^{12,13}.

The first thing that pops into mind when talking about LPO is when oxidants such as free radicals attack lipids containing carbon-carbon double bond, especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ¹⁴.

The general process of lipid peroxidation consists of three steps: initiation, propagation and termination. The initiation phase comprises hydrogen atom abstraction by free radicals (ROS) such as hydroxyl, alkoxyl and peroxy producing a lipid radical, which in turn reacts with oxygen to produce hydroperoxides (LOOH) as primary products of LPO. Cleavage of LOOH results in formation of a variety of aldehyde products as secondary products such as malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE), acrolein and other minor products. The PUFAs with two or more double bonds are more prone to peroxidation ^{15,16}.

Lipid peroxidation can result from several reaction pathways depending on the medium and the initiating agents: (1) auto-oxidation catalyzed by temperature, metal ions and free radicals, (2) enzymatic oxidation initiated by lipoxygenase or (3) photo-oxidation initiated by radiant energy such as UV, solar radiation or artificial light ^{8,9,17}.

Solar radiation contains infrared (700-2500 nm), visible (400- 700 nm), and ultraviolet radiation (UVR) (290-400 nm). There are three types of UVR: UV-C rays (280-320 nm) filtered out by the ozone layer, UV-B (200-280 nm) and UV-A (320-400 nm). 95% of UV rays reaching the ground level are UV_A¹⁸⁻²⁰.

Solar UV radiations are known to have beneficial effects on the body such as stimulating the production of vitamin D²¹.

However, ultraviolet (UV) radiation can induce oxidative stress that alters lipid composition. For example, studies show that UV radiation can affect FAs composition through dose-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) and induction of lipid peroxidation. In addition to promoting skin cancer through DNA damage, exposure to UV can alter the anti-cancer immune pathways which has been attributed to the change in lipid composition in the skin since lipids and lipid metabolism have been shown to directly affect immune cells phenotype. Acute UV exposure reduces free FAs and triglycerides in the epidermis which results in skin photoaging^{22,23}.

Oxidation of PUFAs is the main reaction responsible of the degradation of lipids²⁴. The oxidative deterioration of polyunsaturated fatty acids generates a variety of aldehydic products including malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) who can be a relevant indicator of lipid peroxidation²⁵.

Many methods have been used to determine the degree of lipid peroxidation. The most used method for determination of MDA is the spectrophotometric detection of MDA at 532-535 nm after derivatization with thiobarbituric acid (TBA) but many studies have shown that interfering products are formed during the reaction of TBA with products of lipid peroxidation, inducing a decrease in the sensitivity of this method²⁶.

To avoid the problems of interference, a lot of HPLC methods have been described for measuring the MDA-TBA adduct or the MDA without derivatization²⁵⁻²⁹.

Other authors described GC-MS methods using electron ionization (EI) for the measurement of MDA and other aldehydes²⁶.

Vibrational spectroscopy has also been used for the analyses of lipid peroxidation products^{24,30-32}. It is well adapted for biological samples because it is a non-invasive method that

requires little or no sample preparation and is rapid compared to time consuming chromatographic methods.

The generation of polar compounds (hydroperoxides) and carbonylic compounds (aldehydes) can be highly noticeable using FTIR while modifications upon the carbon skeleton and C=C bonds of the FAs during oxidation and the appearance of *trans* double bonds are predicted to be seen in spectral changes using Raman spectroscopy^{24,33}.

The aim of this paper was to monitor and evaluate the modifications which may take place after solar irradiation on fatty acids using vibrational spectroscopy. Saturated and unsaturated FAs with different number of double bonds as well as different chain lengths were used.

Materials and methods

Chemicals

Linolenic Acid (LA), Oleic Acid (OA), Stearic Acid (SA), and Palmitic Acid (PA) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) and Sebaeic acid (SB) was purchased from Larodan (Solna, Sweden). Chloroform was purchased from Carlo Erba (Chaussée du Vexin, Val-de-Reuil, France). Lipid films are prepared by dissolving fatty acids in chloroform to obtain solutions of 2 mg/mL concentration. 20 μ L of each solution was deposited on CaF₂ slides. The lipid films were then dried to remove residual solvent traces.

Samples irradiation

The four fatty acids were irradiated at different times using a solar simulator 16S-300 from a solar light company which produces a spectrum close to the solar spectrum. The power used for the irradiation was 0.52 W/cm². This power was measured using a pyranometer (Glenside, USA). Table 1 shows the different energies used during the irradiation process.

| Time (min) | 5 | 10 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 | 240 |
|--|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Total solar spectrum energy (J/cm ²) | 156 | 312 | 624 | 1248 | 1872 | 2808 | 3744 | 5616 | 7488 |
| UV-B energy (J/cm ²) | 0.45 | 0.9 | 1.8 | 3.6 | 5.4 | 8.1 | 10.8 | 16.2 | 21.6 |
| Minimal erythemat dose | 15 MED | 30 MED | 60 MED | 120 MED | 180 MED | 270 MED | 360 MED | 540 MED | 720 MED |

Table 1: The different UV solar radiation doses applied to fatty acids during irradiation in J/cm².

Raman spectroscopy

Raman spectral acquisitions were performed with an HR Labram microspectrometer (Horiba scientific, Palaiseau France). The excitation source is a 633-nm single-mode diode laser (TOPTICA PHOTONICS, Germany) with 35 mW laser power on the sample. The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope, and measurements were recorded using a \times 100 MPlan objective (Olympus, Japan). Light scattered by the sample is collected through the same objective. A Peltier cooled (-65 °C) multichannel coupled charge

device (CCD) detector (1024×256 pixels) detects the Raman Stokes signal dispersed with a 400- μm slit width and a 600 grooves per millimeter holographic grating enabling a spectral resolution of 2 cm^{-1} . A calibration procedure was applied daily prior to data collection as recommended by Horiba Scientific. The zero-order position and the laser line were daily checked. Raman relative shift was checked on silica wafer band at 521 cm^{-1} . For the study, the selected spectral range was $400 - 3800\text{ cm}^{-1}$. The acquisition of each spectrum required 3 min. Spectral acquisition was performed using Labspec6 software (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

FTIR measurement

Spectral data was recorded using a Spotlight 400 infrared Spectrum (Perkin Elmer Life Sciences, Great Britain equipped with a liquid nitrogen cooled 16-pixel mercury cadmium telluride (MCT) line detector . Before each acquisition, a background is recorded on a clean part of the CaF_2 slide. All spectra were recorded in the mid infrared region (4000 to 750 cm^{-1}) at 30 scans/spectrum with a spectral resolution of 2 cm^{-1} .

9 different spectra were recorded for each slide. Data were pre-processed using Spectrum Image software.

Data analysis

IR and Raman data were analyzed with a software developed in house, that operates in the Matlab environment (The Matworks, Inc., Natick, MA, USA). The background, due to the fluorescence, was corrected using a polynomial function with a polynomial order of 4³⁴. All spectra were smoothed using Savitzky-Golay filter on 9 points with a polynomial order of 4 and normalized to the AUC of the CH stretching band. Automatic determination of the peak positions was performed using second derivatives.

Results and discussion:

Spectral characterization of fatty acids films before oxidation

Raman spectroscopy provides useful information to characterize the different fatty acids. Different spectral features can be used to monitor simultaneously the identity, the conformational behavior and the lateral packing of fatty acids.

At room temperature, Raman spectra of different fatty acids present differences due to the molecular structure, the conformational order, and the lateral packing (Fig. 1 and 2).

From a structural point of view, the presence of double bonds in the alkyl chains of fatty acids can be directly observed on the spectra. Unsaturated FAs selected to study in this work differ in the position and number of the double bonds that are reflected in their Raman spectra ⁵.

For these FAs, the band centered at about 1657 cm^{-1} is assigned to the $\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching in *cis*-conformation while the bands arising at about 973 and 1267 cm^{-1} are associated with the $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ out-of-plane bending and the $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ in-plane bending respectively (Fig. 1.a, c and e).
^{5,35,36}

The $\nu(\text{C}=\text{O})$ stretching of the carboxylic acid presents a band at around 1640 cm^{-1} ($1590\text{--}1645\text{ cm}^{-1}$) that is overlapped by the strong $\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching band. In infrared spectra, this band arises at around 1710 cm^{-1} . As shown in Figure 2, a shift of this band to the lower wavenumber and a peak splitting can be observed for saturated fatty acids, this is due to the polymorphism behavior of fatty acids ³⁷.

On the other hand, for both infrared and Raman spectroscopy, the $\nu(=\text{CH})$ stretching modes can be identified by the vibration at about 3010 cm^{-1} . This band is attributed to the Vinyl CH stretch. (Supplementary data, Table 1 supp.).

Finally, the presence of the double bonds in the hydrocarbon chains has a significant impact on both, the hydrocarbon chain conformational freedom and the nature of the H-bonds in the head group region and, consequently, on the lateral packing ³⁸ (Supplementary data, Figure 1 supp. and 2 supp.).

Lateral packing and conformational descriptors:

C–C stretching mode

In the fingerprint region, the bands between 990-1150 cm^{-1} are attributed to the C–C skeleton stretching mode and are very sensitive to their *trans–gauche* conformation order (the intramolecular interactions). The peaks at 1060 cm^{-1} and 1130 cm^{-1} correspond respectively to the asymmetric and symmetric ν (C–C) in the *all-trans* chain segments. In addition, the band around 1100 cm^{-1} is also assigned to structures containing *trans* conformers. As for the *gauche* conformation, the bands in the skeletal optical region arise at about 1086 and 1113 cm^{-1} ^{5,35,36,38,39}.

This region in the Raman spectra of saturated fatty acids SA and PA are characterized by sharp peaks and dominated by *trans* conformers (Fig. 1.b).

On the opposite side, this region for unsaturated fatty acids (OA, LA and SB) becomes a series of overlapping broad bands dominated by a central band at 1084 cm^{-1} as shown in Figure 1 indicating the presence of *gauche* conformation, that could be related to a higher mobility of the hydrocarbon skeleton with presence of unsaturation.

A problem identified in the literature is the inability to obtain absolute values for each conformation from the band intensities/positions and the fact that the changes are not linear ³⁸.

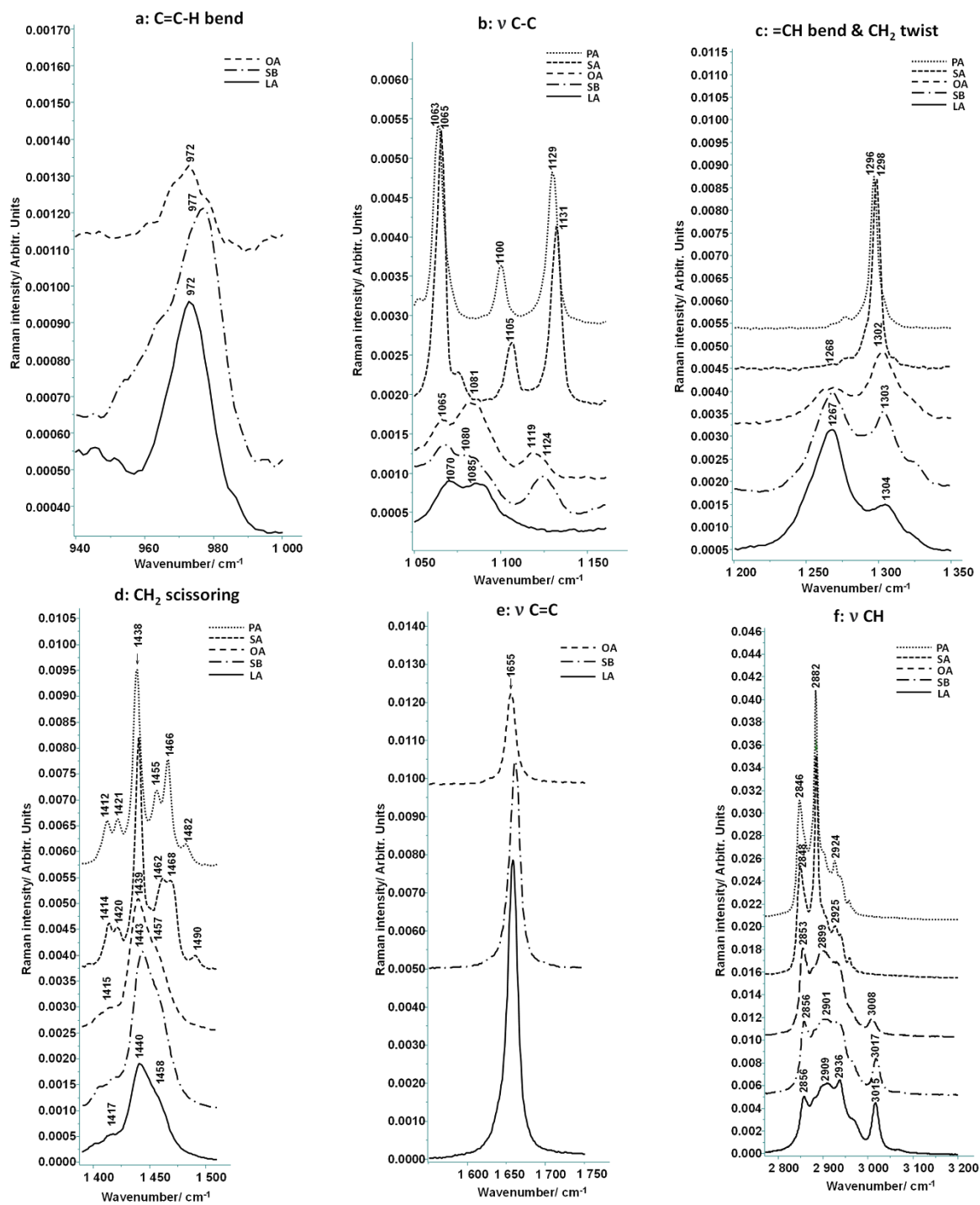


Figure 1 (a-f): Raman Spectra of PA, SA, OA, SB, LA before UV irradiation.

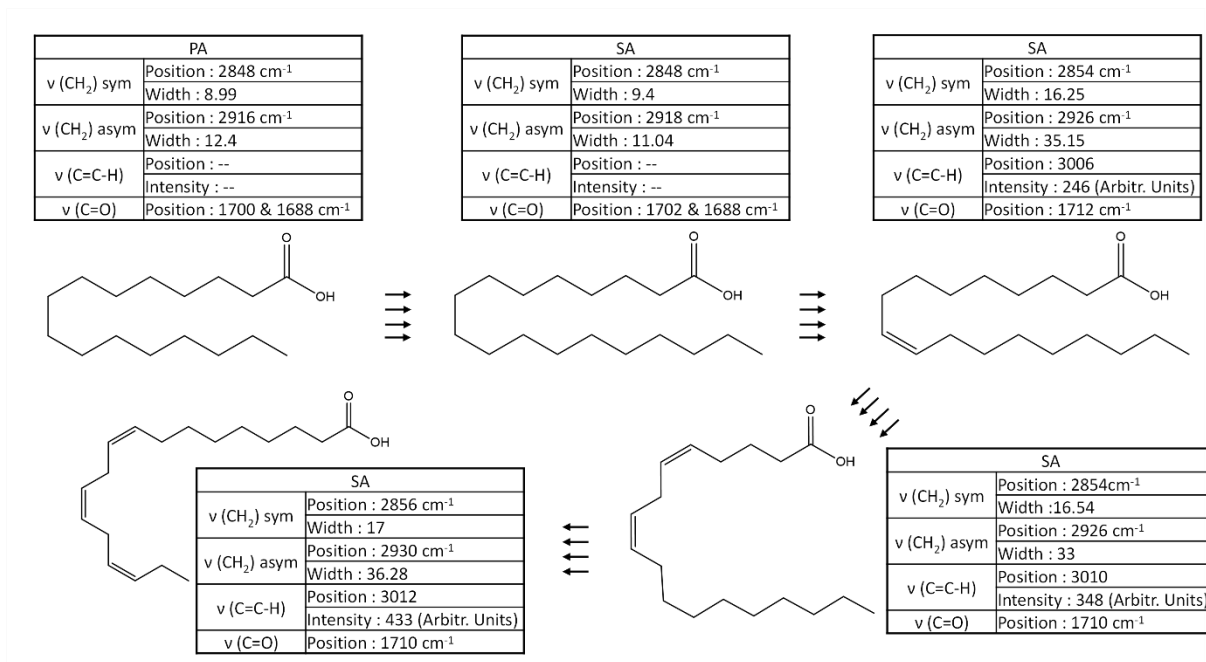


Figure 2: Infrared molecular descriptors of PA, SA, OA, SB, LA at room temperature.

CH₂ twisting

The Raman spectral feature at about 1300 cm⁻¹ (Fig. 1.c) is assigned to the twisting of the CH₂ group. This band is sensitive to the conformational disorder; a sharp peak indicates an oriented hydrocarbon chain with high content of *trans* conformers. A shift to higher wavenumbers and a broadening of the band are indicative of an increase of the disorder and higher gauche conformers content^{35,36}.

As shown in Figure 1.c, low positions of the 1300 were obtained for saturated fatty acids (PA, SA) revealing a high interchain order, contrariwise a shift of this band to higher wavenumbers was observed for unsaturated FAs (OA, LA) indicating a significant increase of the interchain disorder and higher gauche conformers content.

Moreover, the FWHM was calculated for all Fatty acids to follow the broadening of the CH₂ twisting feature. OA, SB and LA present a FWHM of 19.34, 20.16 and 21.4 cm⁻¹ respectively, almost three times the FWHM of PA (5.84 cm⁻¹) and SA (6.25 cm⁻¹). The values of FWHM confirm the information obtained from other spectral features on the conformational order/disorder, so with the increase of FWHM of CH₂ twisting the disorder increases.

CH₂ Scissoring

Furthermore, the vibrational spectroscopies are used not only to observe the conformational order of the chain and the intramolecular behavior but also are useful for the determination of intermolecular chain packing arrangements^{35,36}.

The CH₂ scissoring band (1410 - 1485 cm⁻¹) is related to the lateral packing state (orthorhombic order, hexagonal order, and liquid-like chain packing). This spectral region is complex, with two to six apparently resolved observed bands. In fact, these bands are themselves not composed of pure CH₂ scissoring modes but contain contributions from vibrations of all the CH units present^{35,36}.

For unsaturated FA, the scissoring region shows one dominant band at around 1440 cm⁻¹ with a strong shoulder at 1460 cm⁻¹ (Fig. 1.d).

In contrast, for saturated FA the situation is more complex, with up to six main bands present in the CH₂ scissoring region of the spectrum. (Fig. 1.d)³⁸.

Additionally, in the presence of orthorhombic perpendicular sub-cell packing, the Raman spectra exhibit the factor group splitting of the CH₂ scissoring vibration band (1421 cm⁻¹). The splitting in this vibrational mode is due to the Fermi resonance with CH₂ rocking. This band is present for unsaturated FA and absent for saturated ones (Fig. 1.d). Moreover, a shift of the 1440 cm⁻¹ band to higher wavenumbers is a manifestation of significant interchain disorder^{35,36}.

As illustrated in Figure 1.d, low positions of the 1440 were obtained for PA and SA revealing a high interchain order, contrariwise a shift of this band to higher wavenumbers was observed for unsaturated FAs (OA, SB, LA) indicating a significant interchain disorder.

Furthermore, the FWHM of the 1440 cm⁻¹ was calculated. OA, SB and LA present a FWHM of 16.07, 18.65 and 20.49 cm⁻¹, respectively, which are greater than the FWHM of PA (7.46 cm⁻¹) and SA (8.25 cm⁻¹). These values of FWHM confirm the information obtained from the band position of 1440.

CH₂ and CH₃ stretching

The 2800-3000 cm⁻¹ region is attributed to the stretching vibration of symmetric and asymmetric CH₂ and CH₃.

The bands at around 2850 cm⁻¹ and 2880 cm⁻¹ are associated with the symmetric and asymmetric CH₂ stretching, respectively in Raman spectra while in infrared, these bands occur at around 2850 and 2920 cm⁻¹ respectively for CH₂ symmetric and asymmetric stretching.

The CH₃ symmetric and asymmetric stretching bands occur near 2934 and 2962 cm⁻¹ respectively in Raman spectroscopy and at around 2870 and 2950 cm⁻¹ in infrared spectroscopy^{35,36,40-43}.

As shown in Figure 1.f, the band at about 2850 cm⁻¹, that is assigned to the CH₂ symmetric vibration, dominates for unsaturated FA (AL, AO) compared to the CH₂ asymmetric band, while for saturated FAs (PA, SA), the asymmetric vibration of CH₂ at about 2880 dominates⁴³.

Consequently, the broadening of the 2880 cm⁻¹ band indicates motional freedom in the backbone which could be explained by the increase of the degree of unsaturation.

Afterwards, the structure of the CH-stretching region depends upon the interactions, enhanced by Fermi resonance, of CH-stretching fundamentals with CH deformation overtones⁴⁴.

Furthermore, this region is sensitive to the lateral packing of lipids, so taking the intensity ratio of ($\nu(\text{CH}_2)_{\text{asym}}/\nu(\text{CH}_2)_{\text{sym}}$) is an essential standard in vibrational spectroscopy studies performed on lipids because this peak ratio has been found to be sensitive to the hydrocarbon conformational order^{35,36,45,46}.

In other words, more gauche conformation of lipid alkyl backbone leads to an increase in the disordered lateral chain packing, whereas more *trans* conformation of lipids leads to an increase in the ordered lateral chain packing³⁹.

A high value of this ratio was obtained for saturated fatty acids (SA and PA) indicating a high conformational order of lipids.

This information is also confirmed by the position of the symmetrical CH₂ stretching. A low position is linked to a more ordered acyl chain.

In addition, information about organization can be obtained in infrared spectroscopy. The position and the bandwidth of the symmetric CH₂ stretching band are sensitive markers of the chain conformational order, a shift of this band to lower wavenumbers and an increase of the FWHM reveal a high ordered lateral chain packing. Also, the position and the intensity of the asymmetric CH₂ stretching could be a marker for conformational order thus with the decrease in order, the band shifts towards higher wavenumbers and decreases in intensity (Fig. 2).

The second part of the study in this paper is devoted to the behavior in the oxidation

1) Stearic, palmitic and Oleic acids:

SA and PA are saturated fatty acids with 18 and 16 carbons, respectively. OA is an unsaturated fatty acid with one unsaturation and 18 carbons.

When talking about lipid oxidation it is only the polyunsaturated fatty acids with 2 or more double bonds which are of interest. Saturated fatty acids are less vulnerable to lipid peroxidation than their unsaturated counterparts ⁴⁷.

No modifications were observed in Raman and infrared spectra after an applied dose of 7488 J/cm² for the Palmitic and Stearic acids.

In addition, no significant variations of the *trans/gauche* ratio of the C-C stretching bond and of the $\nu(\text{CH}_2)_{\text{asym}}/\nu(\text{CH}_2)_{\text{sym}}$ ratio were noticed for the palmitic and stearic acid during the irradiation (Data not shown).

As known, monounsaturated fatty acids are less prone to UV oxidation, but inexplicable modifications were observed at high doses for Oleic acid. For example, a marked increase in the $1655\text{-}1675\text{ cm}^{-1}/2840\text{-}2890\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C}=\text{C})/\nu(\text{CH})$) ratio and a marked increase in $972\text{ cm}^{-1}/2840\text{-}2890\text{ cm}^{-1}$ ($\delta(\text{=CH})/\nu(\text{CH})$) ratio were noticed at high doses. (Data not shown)

2) Sebaleic and Linolenic acids:

Polyunsaturated fatty acids that contain two or more double bonds, are more prone to lipid oxidation.

Figure 3.I presents the classical mechanism of the oxidation of polyunsaturated fatty acids, the scheme presents the example of linolenic oxidation ⁴⁸⁻⁵³.

Oxidation mechanism: Linolenic acid *



Sebaleic acid

Linolenic acid

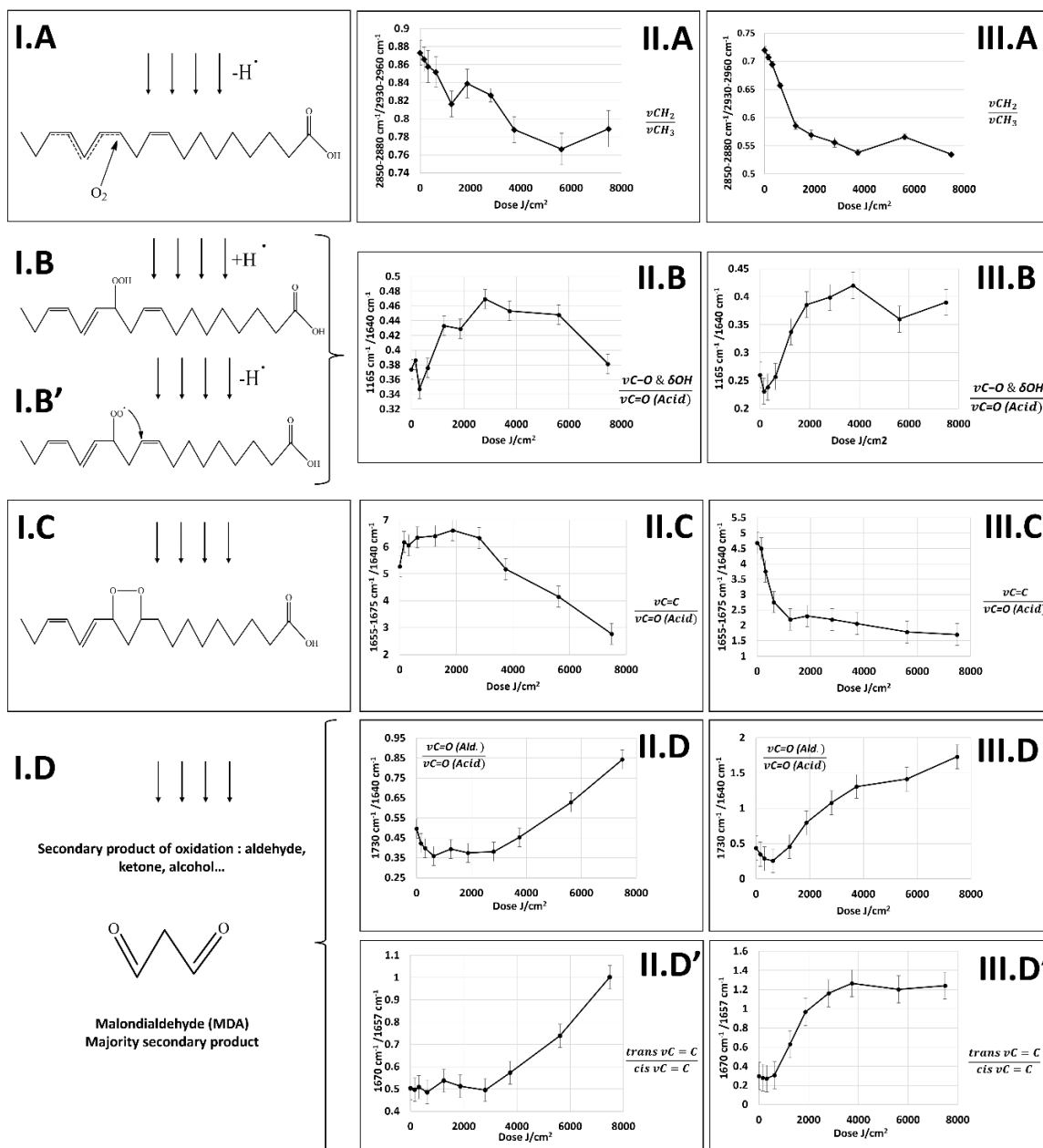


Figure 3: I. Oxidation mechanism of polyunsaturated fatty acids (* example of Linolenic acid) ⁴⁴⁻⁴⁹, [I.A. Hydrogen abstraction, I.B. Hydro-peroxidation. I.B'. peroxyl radicals formation. I.C. cyclisation. I.D. formation of secondary oxidation products]. II. Raman descriptors of Sebaleic acid (SB) oxidation. III. Raman descriptors of Linolenic acid (LA) descriptors. [II, III.A. $\nu\text{CH}_2/\nu\text{CH}_3$ stretching ratio. II, III.B. $(\delta(\text{OH}) \& \nu(\text{CO}))/\nu(\text{C}=\text{O})$ (acid) ratio. II, III.C. $\nu(\text{C}=\text{C})/\nu(\text{C}=\text{O})$ (acid) ratio. II, III.D. $\nu(\text{C}=\text{O})$ (Aldehyde)/ $\nu(\text{C}=\text{O})$ (acid) ratio. II, III.D'. $\text{trans } \nu(\text{C}=\text{C})/\text{cis } \nu(\text{C}=\text{C})$ ratio].

Firstly, the oxidation process involves hydrogen abstraction in alpha position (α), relative to the fatty acid chain double bond producing allylic radical (Fig. 3.I.A) ⁴⁸.

The hydrogen abstraction induces a loss in CH_2 numbers and that was observed by the decrease of the CH_2/CH_3 ratio at low doses. For higher doses, this decrease, is related to the decomposition of alkyl chains into shorter compounds. The evolution of this ratio is presented in Fig. 3.II.A and 3.III.A by following the CH_2/CH_3 stretching bands ratio.

Further decreases of this ratio at higher doses could be related to more advanced steps in the oxidation process as the formation of secondary oxidation products with short alkyl chain.

Then, the oxygen attack at the end carbon positions of the delocalized radicals (Fig. 3.I.A) would produce hydroperoxides (Fig. 3.I.B), the primary oxidation products.

The formation of hydroperoxides can be monitored by following the relative evolution of the band at 1165 cm^{-1} that is assigned to the δ (OH) bending and ν (C-O) stretching.

For relative monitoring this band was divided by the 1640 cm^{-1} band associated to ν (C=O) stretching specific of carboxylic moieties. The choice of 1640 cm^{-1} band as internal standard is related to the fact that the carboxylic function remains intact during the oxidation process ²⁴.

The $1165\text{ cm}^{-1}/1640\text{ cm}^{-1}$ ratio shows a significant increase after 624 and 156 J/cm^2 for SB and LA respectively indicating the beginning of hydro-peroxidation after these doses.

A plateau is then reached around 2808 J/cm^2 for SB and 1872 J/cm^2 for LA. This could be related to an equilibrium between hydro-peroxidation and the formation of peroxy radicals by hydrogen abstraction (Fig. 3.I.B').

A decrease in the ratio's values is observed at 7488 J/cm^2 for SB and 5616 J/cm^2 for LA. This may be explained by higher peroxy radicals formation. The variations in the 1165 cm^{-1} band are also observed directly on mean Raman spectra plotted in Fig. 4.A and 4.D.

The formation of hydroperoxides was also confirmed by the appearance of a broad band in the $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ region that is assigned to the OH stretching in infrared spectra (Fig. 5) (Supplementary data, Figure 3 supp. and 4 supp.).

Furthermore, the increase of this ratio and the appearance of the OH stretching band in infrared, are not only related to hydroperoxides but also to the formation of Alcohol as

minority secondary oxidation products. This could explain the further increase of the $1165\text{ cm}^{-1}/1640\text{ cm}^{-1}$ ratio at 7488 J/cm^2 for LA. No similar observation can be seen for SB. This can simply be connected to oxidation levels of both fatty acids at similar irradiation doses. LA with 3 double bonds is more prone to oxidation than SB with only 2 double bonds.

Hydroperoxides and peroxy radicals are unstable and decompose to a variety of volatile compounds, including aldehydes, ketones, hydrocarbons, and other secondary products⁵⁴. To lead to the formation of these secondary products, a cyclization mechanism is suggested (Fig. 3.I.C) to take place.

Cyclisation mechanism induces a loss of a double bond in the unsaturated fatty acid chain (Fig. 3.I.C). This can be followed by the relative evolution of the 1675 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})$). Thus, the $1655\text{-}1675/1640\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C}=\text{C}) / \nu(\text{C}=\text{O})$ Acid) was calculated and plotted in Fig. 3.II.C and 3.III.C.

For SB (Fig. 3.II.C), this ratio remains unchanged up to 2808 J/cm^2 dose of UV. After this dose, a marked decrease is observed in parallel with the up-described plateau in Fig. 3.II.B for the $\delta(\text{OH})$ bending and $\nu(\text{C}-\text{O})$ stretching relative evolution. This observation may confirm the balance between the different oxidation steps that may occur simultaneously.

In contrast, for LA (Fig. 3.III.C), the $\nu(\text{C}=\text{C}) / \nu(\text{C}=\text{O})$ ratio decreased directly after 156 J/cm^2 . The abrupt decrease is simultaneous with the increase in the hydroperoxidation markers. This can be explained by instability of the LA. Different steps of the oxidation mechanism take place simultaneously for the different LA molecules present in the irradiated film. After 1248 J/cm^2 a plateau is observed with a slightly descending slope.

As described before, the final steps of the oxidation mechanisms lead to the formation of aldehydes, ketone, alcohols, and other secondary products. Malondialdehyde (MDA) was described as the major secondary product for polyunsaturated fatty acids (Fig. 3.I.D).

The formation of these products can be observed by the appearance of a shoulder at around 1730 cm^{-1} (Fig. 4.B and 4.E). This band can be attributed to the $\nu(\text{C}=\text{O})$ stretching of aldehyde. Its relative evolution ($1730\text{ cm}^{-1}/1640\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C}=\text{O})\text{ Ald.} / \nu(\text{C}=\text{O})\text{ Acid}$)) shows a marked increase after 2808 J/cm^2 for SB and 624 J/cm^2 for LA (Fig. 3.II.D and 3.III.D)^{48,51,52}. This increase is observed up to 7488 J/cm^2 with a slight change in the slope after 3744 J/cm^2 for LA. Same observations were obtained from infrared measurements (data not shown).

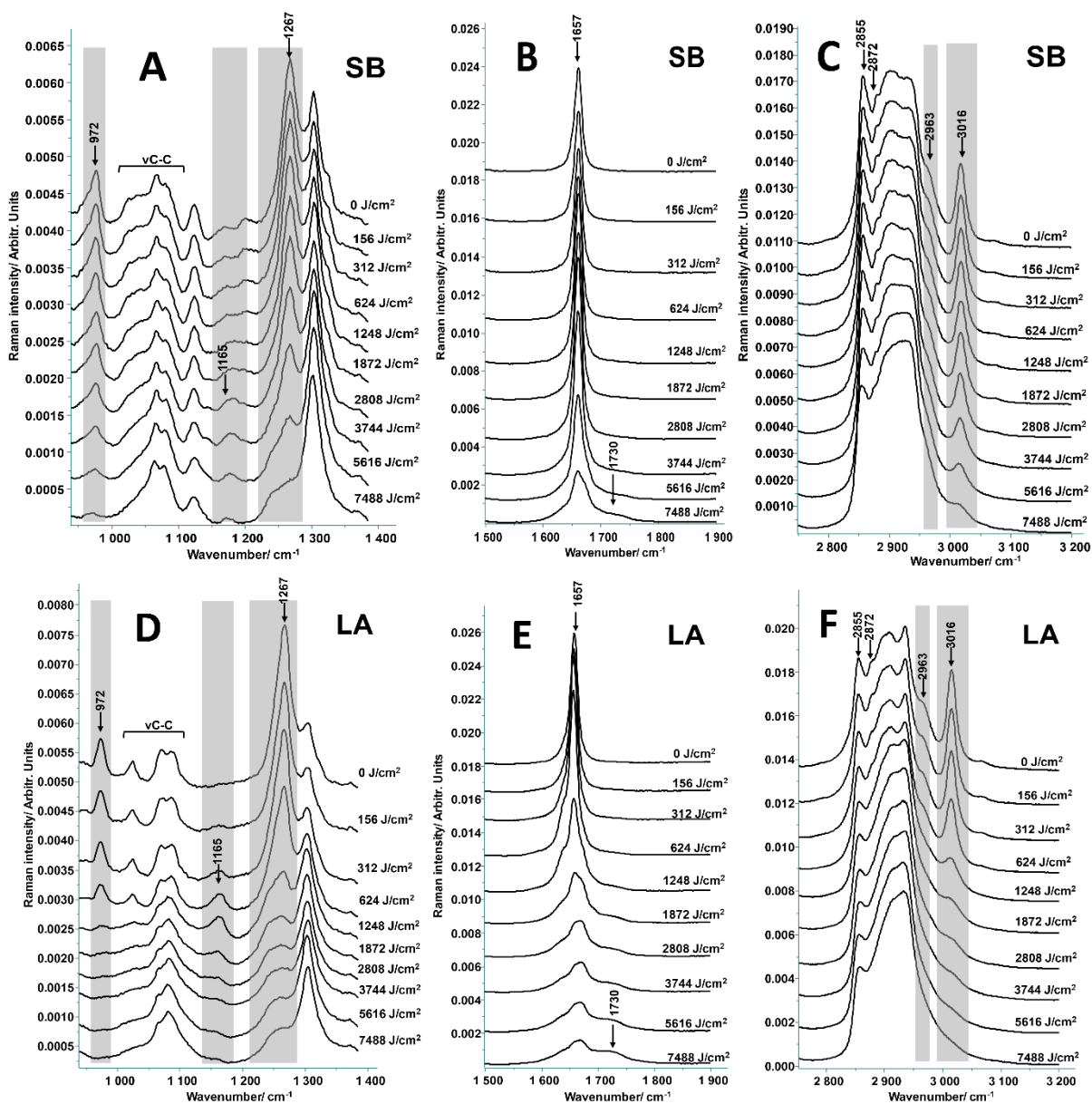


Figure 4 (A-F): Raman Spectra of SB and LA at different UV doses.

In parallel, the increase in the *trans* ν (C=C)/ *cis* ν (C=C) ratio (Fig. 3.II.D' and 3.III.D') is also observed. The increase in the *trans* conformers was described by Muik et al. and was related to the formation of *trans* secondary oxidation products²⁴. The conformers changes can also be seen by the broadening of the peak at around 1657 cm^{-1} in Raman spectra for both acids (Fig. 4.E and 4.A).

Furthermore, and as mentioned before, the fragmentation of the alkyl chain is confirmed by the decrease of the CH_2/CH_3 ratio after 2808 J/cm^2 and 1248 J/cm^2 for SB and LA, respectively (Fig. 3.II.B and 3.III.B).

In addition to the structural evolution, organizational and conformational changes are observed. Fig. 4.A and 4.D reveal an important broadening in the 1000-1125 cm^{-1} region indicating a significant intrachain disorder and a high content of *gauche* conformers after UV irradiations.

Fig. 4.C and 4F show the decrease of the $\nu(\text{CH}_2)$ asym shoulder at around 2870 cm^{-1} indicating higher interchain disorder along with irradiation. The decrease in the AUC of the 2870 cm^{-1} band may contribute in the observed decrease of the CH_2/CH_3 ratio.

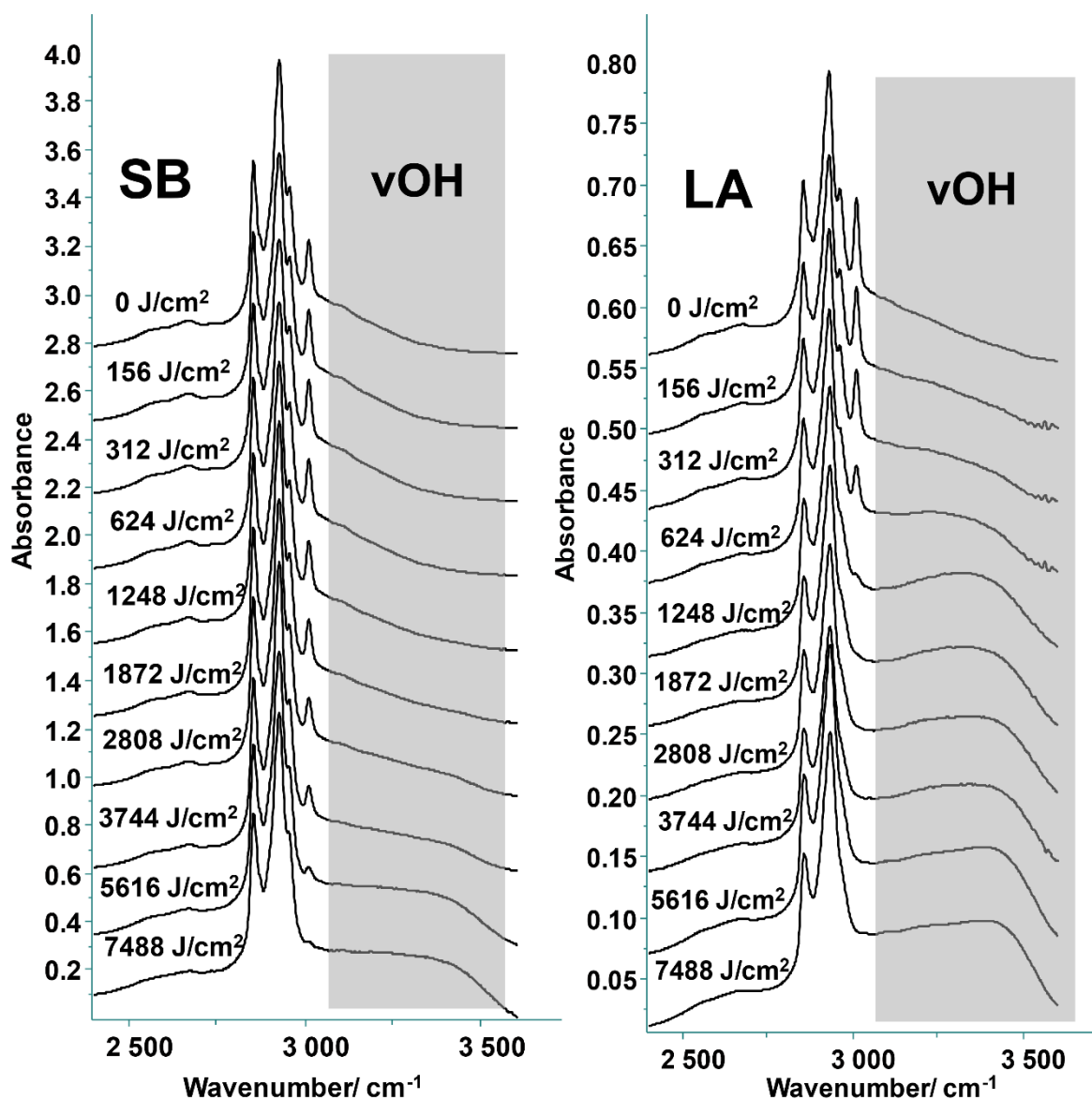


Figure 5: Infrared Spectra (νCH region) of SA and LA at different UV doses.

Conclusion:

Skin Surface Lipids (SSLs) and stratum corneum (SC) lipids represent the first barrier protecting our body against external insults. Fatty acids are among the three major lipid classes within the SC along with ceramides and cholesterol. FAs also represent an important class in SSLs.

Solar UV exposition and photo-oxydation represent a major concern in skin research, dermatology, and cosmetic science. Even though the effect of UV radiations on epidermal and dermal components is extensively studied, their effect on lipidic barrier is generally observed from a functional point of view, *i.e.* the observation of the increase of transepidermal water loss (TEWL) *in vivo*⁵⁵⁻⁵⁹. *In vitro* studies on lipid films applied one or two given doses⁶⁰⁻⁶³ and observations are made generally at the end of the oxidation process. In this paper, the use of Raman and Infrared spectroscopies enabled to monitor, step by step, the oxidation process of fatty acids induced by different doses of UV irradiations obtained under a solar simulator. Similar measurements will be performed on other lipid classes present in SSLs and SC.

To our knowledge, this work is the first to put together different spectral descriptors enabling to follow the different structural modifications during the oxidation process, *i.e.* hydrogen abstraction, formation of hydroperoxides and peroxy radicals as primary oxidation products and the formation of aldehydes, ketones, alcohol as secondary products.

These formed products were followed by evaluating different Raman descriptors such as 1165/1640 cm^{-1} ratio to monitor the formation of hydroperoxides and alcohols, the CH_2/CH_3 stretching bands ratio for hydrogen abstraction and to follow the decomposition of alkyl chains and the 1730/1640 cm^{-1} and *trans* $\nu(\text{C}=\text{C})/\text{cis}$ $\nu(\text{C}=\text{C})$ ratio to evaluate the formation of aldehydes and other *trans* secondary oxidation products, respectively.

The use of infrared spectroscopy confirmed the formation of hydroperoxides by a direct observation in the 3100-3600 cm^{-1} region assigned to OH stretching and the secondary oxidation products such as aldehydes at $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ associated to $\nu(\text{C}=\text{O})$ for aldehydes.

Compared to other techniques such as mass spectrometry, vibrational spectroscopy is a rapid, and non-destructive technique which would prove useful in future *in vivo* experiments that necessitate an unharmed method on living tissues and patients.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics for the financial support of this work.

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

References:

- [1] Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, 1811, 637.
- [2] Prache N, *PhD thesis, Université Paris Saclay (COMUE), France*, 2017.
- [3] Silva Barbosa Correia B, Torrinhas R, Ohashi W, Tasic L 2018, p <https://www.intechopen.com/online>.
- [4] Burdge GC, Calder PC *World Review of Nutrition and Dietetics* **2014**, 112, 1.
- [5] Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor A, Baranska M *Journal of Raman Spectroscopy* **2015**, 46, 4.
- [6] Nicolaou A, Harwood J *Lipid Technology* **2016**, 28, 36.
- [7] Sjövall P, Skedung L, Gregoire S, Biganska O, Clément F, Luengo GS *Scientific Reports* **2018**, 8, 16683.
- [8] Shichiri M, Yoshida Y, Niki E In *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health*; Watson RR, De Meester F, Eds.; Academic Press: Boston, 2014, p 31.
- [9] Spiteller G *Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, 95, 105.
- [10] Lasch J, Schonfelder U, Walke M, Zellmer S, Beckert D *Biochim Biophys Acta* **1997**, 1349, 171.
- [11] Niki E *Free radical research* **2014**, 49, 1.
- [12] Stephenson DJ, Hoferlin LA, Chalfant CE *Transl Res* **2017**, 189, 13.
- [13] Fuchs B, Bresler K, Schiller J *Chem Phys Lipids* **2011**, 164, 782.
- [14] Ayala A, Munoz MF, Arguelles S *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 2014, 360438.
- [15] Catalá A, Díaz M *Frontiers in physiology* **2016**, 7, 423.
- [16] Spickett CM *Redox Biol* **2013**, 1, 145.
- [17] Sylvie E, *PhD thesis, Ecole polytechnique de l'Université de Nantes, France*, 2003.
- [18] Johnson BE *Int J Cosmet Sci* **1983**, 5, 131.
- [19] Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA *Molecules* **2014**, 19, 6202.
- [20] Couteau C, Couteau O, Alami-El Boury S, Coiffard LJM *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 415, 181.
- [21] Berkey C, Oguchi N, Miyazawa K, Dauskardt R *Biochemistry and biophysics reports* **2019**, 19, 100657.
- [22] Tse BCY, Byrne SN *Photochem Photobiol Sci* **2020**, 19, 870.
- [23] Kim EJ, Jin XJ, Kim YK, Oh IK, Kim JE, Park CH, Chung JH *J Dermatol Sci* **2010**, 57, 19.
- [24] Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Ayora-Cañada MJ *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, 134, 173.
- [25] Karatas F, Karatepe M, Baysar A *Anal Biochem* **2002**, 311, 76.
- [26] Zelzer S, Oberreither R, Bernecker C, Stelzer I, Truschnig-Wilders M, Fauler G *Free radical research* **2013**, 47.
- [27] Young IS, Trimble ER *Ann Clin Biochem* **1991**, 28 (Pt 5), 504.
- [28] Dong X, Tang J, Chen X *Sci Rep* **2020**, 10, 3990.
- [29] Yonny ME, Rodríguez Torressi A, Nazareno MA, Cerutti S *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2017**, 2017, 4327954.
- [30] Machado NFL, de Carvalho LAEB, Otero JC, Marques MPM *Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, 43, 1991.
- [31] Guillén MD, Cabo N *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 709.
- [32] Agbenyega JK, Claybourn M, Ellis G *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1991**, 47, 1375.
- [33] Fan Y, Li S, Xu D-P *Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu* **2013**, 33, 3240.
- [34] Lieber CA, Mahadevan-Jansen A.
- [35] Guillard E, Tfayli A, Manfait M, Baillet-Guffroy A *Anal Bioanal Chem* **2011**, 399, 1201.
- [36] Tfayli A, Guillard E, Manfait M, Baillet-Guffroy A *Anal Bioanal Chem* **2010**, 397, 1281.

- [37] L. da Silva LF, Andrade-Filho T, Freire PTC, Filho JM, da Silva Filho JG, Saraiva GD, Moreira SGC, de Sousa FF *The Journal of Physical Chemistry A* **2017**, *121*, 4830.
- [38] Beattie JR, Bell SEJ, Moss BW *Lipids* **2004**, *39*, 407.
- [39] Choe C, Lademann J, Darvin ME *Analyst* **2016**, *141*, 1981.
- [40] Lin-Vien D, Ed.; Academic Press: Boston :, 1991.
- [41] Yellin N, Levin IW *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1977**, *489*, 177.
- [42] Bulkin BJ, Krishnamachari N *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 1109.
- [43] Larsson K *Chemistry and Physics of Lipids* **1973**, *10*, 165.
- [44] Verma SP, Wallach DFH *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1977**, *486*, 217.
- [45] Wegener M, Neubert R, Rettig W, Wartewig S *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, *128*, 203.
- [46] Snyder RG, Scherer JR, Gaber BP *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1980**, *601*, 47.
- [47] Rael L, Thomas G, Craun M, Curtis C *Journal of biochemistry and molecular biology* **2004**, *37*, 749.
- [48] Frankel EN *Progress in Lipid Research* **1984**, *23*, 197.
- [49] Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B *Journal of Biomedical Science* **2014**, *21*, 23.
- [50] Niki E *Free Radic Biol Med* **2009**, *47*, 469.
- [51] Girotti AW *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* **1985**, *1*, 87.
- [52] Porter NA, Caldwell SE, Mills KA *Lipids* **1995**, *30*, 277.
- [53] Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J, Thérond P *Annales de Biologie Clinique* **2008**, *66*, 605.
- [54] Cao J, Deng L, Zhu XM, Fan Y, Hu JN, Li J, Deng ZY *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 12545.
- [55] Meguro S, Arai Y, Masukawa K, Uie K, Tokimitsu I *Photochem Photobiol* **1999**, *69*, 317.
- [56] Gélis C, Mavon A, Delverdier M, Paillous N, Vicendo P *Photochemistry and Photobiology* **2002**, *75*, 598.
- [57] Takagi Y, Nakagawa H, Kondo H, Takema Y, Imokawa G *J Invest Dermatol* **2004**, *123*, 1102.
- [58] Yoon SH, Park JI, Lee JE, Myung CH, Hwang JS *Skin Pharmacol Physiol* **2019**, *32*, 254.
- [59] Mac-Mary S, Sainthillier J-M, Jeudy A, Sladen C, Williams C, Bell M, Humbert P *Clinical interventions in aging* **2010**, *5*, 277.
- [60] Trommer H *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2001**, *51*, 207.
- [61] Trommer H, Bottcher R, Poppl A, Hoentsch J, Wartewig S, Neubert RH *Pharm Res* **2002**, *19*, 982.
- [62] Merle C, Laugel C, Baillet-Guffroy A *Chem Phys Lipids* **2008**, *154*, 56.

Article 2 : " Characterization of triglycerides photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman study "

Contexte :

Les triglycérides et les acides gras libres constituent la majorité des lipides cutanés de surface (57,5 %). Les TG sont essentiels à la formation de la barrière hydrique de la peau. Dans la première partie de ce travail, une caractérisation de la photo-oxydation des acides gras libres a été réalisée, et différents descripteurs spectraux ont été utilisés pour suivre les différentes modifications structurelles au cours du processus de photo-oxydation. Dans cette deuxième partie, la photo-oxydation des triglycérides a également été évaluée à l'aide de spectroscopies vibrationnelles telles que le Raman et l'infrarouge.

Matériels & Méthodes :

5 triglycérides (Tripalmitolein, 1,2-Palmitolein-3-Palmitin, 1,2-Palmitin-3-Palmitolein, Trilinolein and Trilinolenin) ont été irradiés à différentes énergies en utilisant un simulateur solaire 16S-300 qui produit un spectre proche du spectre solaire. Puis, les triglycérides ont été analysés par spectroscopies Raman et infrarouge.

Résultats :

Une diminution du rapport des bandes d'élongation CH_2/CH_3 qui confirme l'abstraction d'hydrogène, une augmentation du rapport $1165/1740 \text{ cm}^{-1}$ ($\delta(\text{OH})$ et $\nu(\text{C-O})$)/ $\nu(\text{C=O})$ (ester)) indiquant la formation de produits d'oxydation primaires tels que les hydroperoxydes. Et enfin, une augmentation du rapport $1725/1740 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C=O})$ (ald.)/ $\nu(\text{C=O})$ (ester)) et du rapport *trans* $\nu(\text{C=C})$ /*cis* $\nu(\text{C=C})$ qui indique la formation d'aldéhydes, d'alcools, de cétones, de produits secondaires *trans* et autres.

Conclusion :

Les TG saturés et mono-insaturés ne sont pas sensibles à l'oxydation. La trilinoléine (C18:2/ C18:2/ C18:2) et la trilinoléine (C18:3/ C18:3/ C18:3) ont suivi un processus d'oxydation similaire à celui des acides sébaléique (C18:2) et linoléique (C18:3) avec des étapes d'oxydation qui se produisent à des doses plus faibles.

Characterization of triglycerides photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman study

Ali Assi¹, Rime Michael-Jubeli¹, Carine JACQUES-JAMIN², Arlette Baillet-Guffroy¹, Hélène DUPLAN², Ali Tfayli^{1*}

Author(s):

- 1- Ali Assi: ali.assi@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 2- Rime Michael-Jubeli: rime.michael-jubeli@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 3- Carine JACQUES-JAMIN: Carine.JACQUES@pierre-fabre.com, Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France
- 4- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 5- Hélène DUPLAN: helene.duplan@pierre-fabre.com, Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France
- 6- Ali Tfayli: **This author accept correspondance and proofs**, ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.

To whom correspondence should be addressed : ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

¹ Lip(Sys)², Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.

² Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France

Abbreviations:

LPO: Lipid peroxidation.

MDA: Malondialdehyde.

ROS : Reactive oxygen species

TG: Triglyceride

SSLs : Skin surface lipids

Abstract

TGs are one of the main components of the glycerolipid family. Their main task in cells is to store excess fatty acids. TG energy storage is mainly concentrated in adipocytes. Triglycerides and free fatty acids constitute the majority (57.5%) of the skin surface lipids (SSLs). TGs are essential for the formation of the skin water barrier. This work is the second part of a global study that aims to evaluate the effect of UV solar radiation on skin surface lipids using vibrational spectroscopy. In the first part of this work, a stepwise characterization of free fatty acids was performed, and different spectral descriptors were used to follow the different structural modifications during the photo-oxidation process, *i.e.*, hydrogen abstraction, formation of hydroperoxides and peroxy radicals as primary oxidation products and the formation of aldehydes, ketones, alcohol as secondary products. In this second part, the photo-oxidation of triglycerides was evaluated using Raman spectroscopy. A decrease in the CH_2/CH_3 stretching bands ratio that confirmed the hydrogen abstraction, an increase in the $1165/1740 \text{ cm}^{-1}$ ($\delta(\text{OH})$ and $\nu(\text{C-O})$)/ $\nu(\text{C=O})$ (ester)) ratio indicated the formation of secondary oxidation products such as hydroperoxides. And finally, an increase in the $1725/1740 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C=O})$ (ald.)/ $\nu(\text{C=O})$ (ester)) ratio and the *trans* $\nu(\text{C=C})$ / *cis* $\nu(\text{C=C})$ ratio highlighted the formation of aldehydes, alcohols, ketone, *trans* secondary products and others.

Keywords: Triglycerides, Lipid Peroxidation, Solar radiation, Vibrational spectroscopy, malondialdehyde, Skin surface lipids

Introduction

Lipids are heterogeneous biomolecules with many important roles. In humans, lipids can function as energy substrates, steroid hormones, inflammatory mediators, transporters, and as structural elements of cellular and organelle membranes [1]. They are generally hydrophobic soluble in organic solvents and are often defined as biological substances [2, 3].

Lipids include eight major classes with distinct chemical properties: fatty acids, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, sterols, prenol, glycolipid and polyketides [1, 4].

Lipid peroxidation (LPO) is the most studied biologically relevant free radical chain reaction [5]. It generates reactive oxygen species (ROS) that oxidize the poly unsaturated lipids and it is thus considered as a critical step in the pathogenesis of several disease states [6-8]. In the skin, LPO is mainly related to photooxidation. It induces an alteration in the barrier function and may lead to skin diseases such as photoaging, psoriasis, atopy, and skin cancer [9-12].

Thus, the study of changes in the structure of lipids and the analysis of LPO products have received significant attention in recent years in the field of medicine and biology.

Polyunsaturated lipids with two or more double bonds are more prone to lipids peroxidation. LPO is initiated by free radicals (ROS) and produces hydroperoxides as primary products. These latter are unstable and decompose rapidly into a variety of aldehyde products as secondary products especially malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) and others minor products [13-15].

LPO can be produced by auto-oxidation, enzymatic oxidation or photo-oxidation initiated by radiant energy, such as ultraviolet, solar radiation or artificial light [7, 8, 15, 16].

Even though solar UVRs are essential to the body such as stimulating the production of vitamin D, they can induce oxidative stress that alters lipid composition. For example, solar UV exposure can reduce FAs and TGs in the epidermis, which results in skin photoaging [17].

Many methods described in the literature have been used to determine the degree of LPO including spectrophotometry, high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to the mass spectrometry [18-23].

In addition, vibrational spectroscopy has also been used to characterize LPO products [15, 24-27]. It is well suited for use with biological samples because it is a non-invasive method, and it is faster compared to chromatographic methods.

In the first part of this study, vibrational spectroscopy was used to monitor and evaluate the modifications in FFAs [15]. Saturated and unsaturated FFAs with different numbers of double bonds and different chain lengths were used. The formed oxidation products were followed by evaluating different Raman descriptors such as the 1165/1640 cm^{-1} ratio to monitor the formation of hydroperoxides and alcohols, the CH_2/CH_3 stretching bands ratio for hydrogen abstraction and to follow the fragmentation of alkyl chains, and the 1730/1640 cm^{-1} and *trans* $\nu(\text{C}=\text{C})/\text{cis } \nu(\text{C}=\text{C})$ ratio to evaluate the formation of aldehydes and other *trans* secondary oxidation products [15].

The use of IR spectroscopy confirmed the formation of hydroperoxides by a direct observation in the 3100–3600 cm^{-1} region assigned to OH stretching and the secondary oxidation products such as aldehydes at $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ associated to $\nu(\text{C}=\text{O})$ for aldehydes [15].

In this part, the effect of solar radiations on triglycerides was investigated. Triglycerides (TG) are one of the main components of the glycerolipid family [28]. They are the major metabolic energy and fatty acid storage molecules in most organisms [29]. TGs are a heterogeneous group of molecules with a glycerol backbone and three FAs linked by ester bonds. Their physical and chemical properties differ depending on the chain length and degree of unsaturation of their FAs [29].

TGs serve multiple important functions in living organisms. Due to their highly anhydrous property, TGs are the primary storage molecules of FAs for energy utilization and the synthesis of membrane lipids. TGs in plants are the main constituent of seed oils and are an important resource in food consumption and industrial uses. Also, they can be used for biofuels [29].

In animals, the energy storage of TG is mainly concentrated in adipocytes. In addition to their role in storing energy, TGs synthesis in cells protects them from the potentially toxic effects of excess FAs. Although TGs are essential for normal physiology, excessive accumulation of TGs in human adipose tissue contributes to obesity and is associated with organ dysfunction in non-adipose tissue [29].

Triglycerides and free fatty acids constitute the largest part of the skin surface lipids (57,5%). TGs is essential for the formation of the skin water barrier [30] and act as a mechanical cushion around joints and internal organs, and collections of TG in adipose tissue provide insulation for organisms [29].

The aim of this paper was to monitor and evaluate the modifications and changes that may take place after solar irradiation on TGs using Raman spectroscopy. Saturated and unsaturated TGs with different numbers of double bonds and different chain lengths were used.

Materials and methods

Chemicals

Tripalmitolein, 1,2-Palmitolein-3-Palmitin, 1,2-Palmitin-3-Palmitolein, Trilinolein, and Trilinolenin (table 6) were purchased from Larodan (Solna, Sweden). Chloroform was purchased from Carlo Erba (Chaussée du Vexin, Val-de-Reuil, France). Lipid films are prepared by dissolving fatty acids in chloroform to obtain solutions of 2 mg/mL concentration. 20 μ L of each solution was deposited on CaF₂ slides. The lipid films were then dried to remove residual solvent traces.

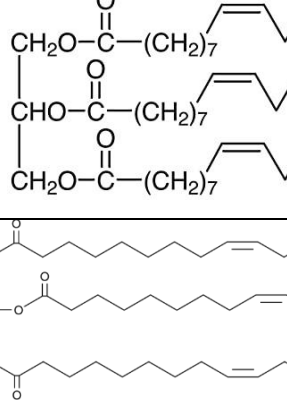

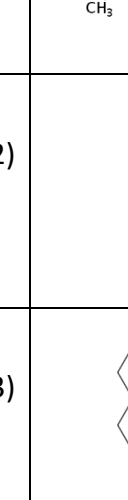
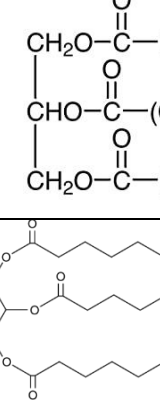
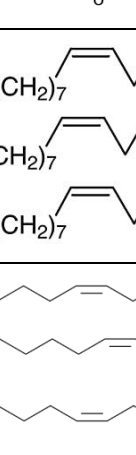
| | | | |
|-----------------|----------------------------|---------------------|---|
| TG ₁ | Tripalmitolein | (C16:1/C16:1/C16:1) |  |
| TG ₂ | 1,2-Palmitolein-3-Palmitin | (C16:1/C16:1/C16:0) |  |
| TG ₃ | 1,2-Palmitin-3-Palmitolein | (C16:0/C16:0/C16:1) |  |
| TG ₄ | Trilinolein | (C18:2/C18:2/C18:2) |  |
| TG ₅ | Trilinolenin | (C18:3/C18:3/C18:3) |  |

Table 1 : The 5 triglycerides used in this study

Samples irradiation

The five TG were irradiated at different times using a solar simulator 16S-300 (Solar Light, Glenside, Pennsylvania, USA) which produces a spectrum close to the solar spectrum. The

power used for the irradiation was 0.45 W/cm². This power was measured using a pyranometer (Glenside, USA). Table 2 shows the different energies used during the irradiation process.

| Time (min) | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 | 240 |
|--|---------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Total solar spectrum energy (J/cm ²) | 67.5 | 135 | 270 | 540 | 1080 | 1620 | 2430 | 3240 | 4860 | 6480 |
| UV-B energy (J/cm ²) | 0.225 | 0.45 | 0.9 | 1.8 | 3.6 | 5.4 | 8.1 | 10.8 | 16.2 | 21.6 |
| Minimal erythema dose | 7.5 MED | 15 MED | 30 MED | 60 MED | 120 MED | 180 MED | 270 MED | 360 MED | 540 MED | 720 MED |

Table 2: The different UV solar radiation doses applied to TG during irradiation in J/cm².

Raman spectroscopy

Raman spectral acquisitions were performed with a HR Labram microspectrometer (Horiba scientific, Palaiseau France). The excitation source is a 633-nm single-mode diode laser (TOPTICA PHOTONICS, Germany) with 35 mW laser power on the sample. The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope, and measurements were recorded using a ×100 MPlan objective (Olympus, Japan). Light scattered by the sample is collected through the same objective. A Peltier cooled (−65 °C) multichannel coupled charge device (CCD) detector (1024×256 pixels) detects the Raman Stokes signal dispersed with a 400-μm slit width and a 600 grooves per millimeter holographic grating enabling a spectral resolution of 2 cm^{−1}. A calibration procedure was applied daily prior to data collection as recommended by Horiba Scientific. The zero-order position and the laser line were daily checked. Raman relative shift was checked on silica wafer band at 521 cm^{−1}. For the study, the selected spectral range was 400 - 3800 cm^{−1}. The acquisition of each spectrum required 3 min. Spectral acquisition was performed using Labspec6 software (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

Data analysis

Raman data were analyzed with a software developed in house, that operates in the Matlab environment (The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA). The background, due to the fluorescence, was corrected using a polynomial function with a polynomial order of 4 [31]. All spectra were smoothed using Savitzky-Golay filter on 9 points with a polynomial order of 4 and normalized to the AUC of the CH stretching band. Automatic determination of the peak positions was performed using second derivatives.

Results and discussion:

Solar radiations effects on Tripalmitolein, 1,2-palmitolein -3- palmitin and 1,2-palmitin -3-palmitolein :

Triglycerides are tri-esters consisting of a glycerol bound to three fatty acid molecules. Hence, the oxidation takes place on the fatty acids chain as the ester function remains intact during the oxidation process [24].

As explained in the introduction, only the polyunsaturated fatty acids with 2 or more double bonds are prone to oxidation. Saturated and monounsaturated fatty acids are less vulnerable to lipid peroxidation [15, 32].

As expected, no LPO related modification was observed in Raman spectra of Tripalmitolein (TG₁), 1,2-palmitolein -3- palmitin (TG₂) and 1,2-palmitin -3- palmitolein (TG₃) after applied doses up to 6480 J/cm² (Data not shown).

In addition to oxidation descriptors, conformational order and lateral packing descriptors were also monitored. No significant variations of the *trans/gauche* ratio of the C-C stretching bond and of the $\nu(\text{CH}_2)$ asym/ $\nu(\text{CH}_2)$ sym ratio were noticed for the TG1 and TG2 during the irradiation (Data not shown).

For TG3 (1,2-palmitin -3- Palmitolein), a change in the state was observed during irradiation (crystal to amorphous). This change was more associated to heating under solar radiations rather than photooxidation.

The spectra of both crystal and amorphous states were presented in Figure 1. For crystal form, the 2800-3000 cm⁻¹ region was dominated by the CH₂ symmetric stretching at about 2880 cm⁻¹. This indicated the presence of a high density of *trans* conformers. For the amorphous form, this band disappeared and a broadening in the 2800-3000 cm⁻¹ region was observed revealing an increase of the *gauche* conformers (Figure 1C).

Same observations were obtained from C-C stretching bands at 900-1150 cm⁻¹. At the crystal state, the region was characterized by sharp peaks and dominated by *trans* conformers (at ~1065 cm⁻¹ and ~1130 cm⁻¹), while the amorphous form presented a series of overlapping broad bands dominated by a central band at 1080 cm⁻¹ (Figure 1.A).

In addition to the chain conformational order, the intermolecular chain packing arrangements were affected (Figure 1.A). The doublet at $\sim 1440\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1470\text{ cm}^{-1}$ were used as a marker of the presence of crystal form. Moreover, the presence of the factor group splitting band ($\sim 1420\text{ cm}^{-1}$) indicated a highly organized orthorhombic perpendicular subcell packing [33, 34]. In amorphous liquid like state, these bands were replaced by a unique band at almost 1445 cm^{-1} .

The Raman signature of the C=O stretching of the ester was also impacted by the state change with a shift from $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ for crystal form to $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ for amorphous state [35].

The crystal to liquid like state change was observed gradually according to the irradiation time. Indeed, the observation of individual spectra after each cumulative dose revealed an increasing number of TG3 amorphous spectra in function of the irradiation time. For example, after 10 minutes of irradiation the 2 first spectra corresponded to the amorphous state and 7 spectra to the crystal form against 3 to 6 amorphous to crystal spectra for 20 minutes. This can be explained by the return to crystal organized form during spectral acquisition. After 1 hour or longer continuous irradiation, the amorphous state remained.

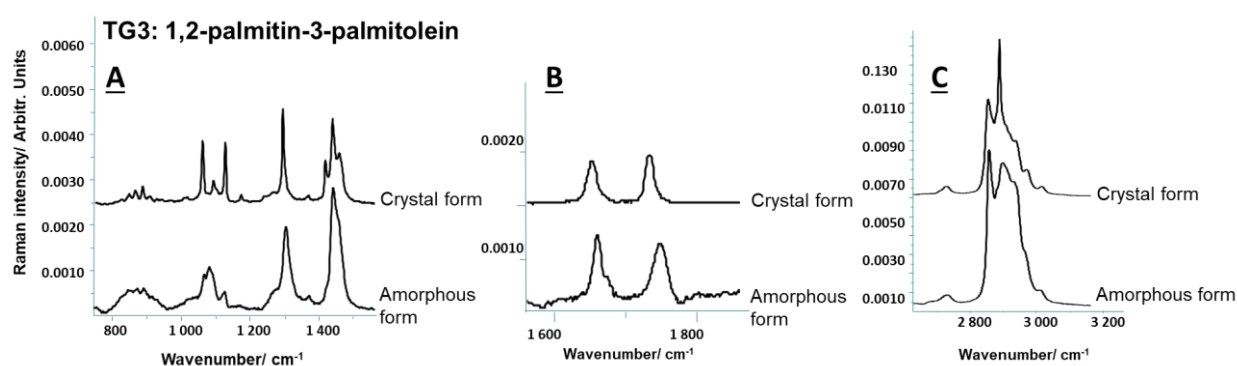


Figure 1 : Raman spectra of 1,2-palmitin -3- Palmitolein.

Solar radiations effects on Trilinolein and Trilinolenin:

Trilinolein and Trilinolenin are homogeneous triglycerides that contain three identical fatty acids. The former contains fatty acids with double unsaturations and the latter fatty acids with triple unsaturations.

The mechanism of the oxidation of TG with polyunsaturated fatty acids is presented in Figure 2.I with the example of Trilinolenin oxidation [36-41]. Figures 2.II and 2.III presented the evolution of Raman oxidation descriptors for trilinolein and trilinolenin respectively.

The production of allylic radicals by hydrogen abstraction in alpha position (α), relative to the fatty acid chain double bond is the first step in the oxidation process (Figure 2.I.A) [15, 36]. This induces a loss in CH₂ numbers and thus the decrease of CH₂ stretching/ CH₃ stretching ratio (Figure 2.II.A and 2.III.A). At further steps of oxidation, the decrease is related to the fragmentation of the alkyl chains.

It is worthy to notice the CH₂ stretching/ CH₃ stretching ratio values before irradiation. For Trilinolein, the ratio is almost 0.87 (Figure 2.II.A) for a CH₂/CH₃ = 12.6 (38 CH₂ to 3 CH₃). In our previous study, the same ratio (~0.87) was obtained for Sebaeic acid with a CH₂/CH₃ ratio equal to 12 [15].

In contrast, for Trilinolenin (CH₂/CH₃ = 10.6 (32 CH₂ to 3 CH₃)) and Linolenic acid (CH₂/CH₃ = 10) the CH₂ stretching/ CH₃ stretching ratio values were 0.63 and 0.72 respectively. The low ratio observed for trilinolenin can be explained by its high auto-oxidation rate. The Hydrogen abstraction started before irradiation and thus the number of CH₂ was lower [42, 43].

In the second step, hydroperoxides were produced as primary oxidation products (Figure 2.I.B) [15]. This can be monitored by following the relative evolution of the band at 1165 cm⁻¹ (δ (OH) bending and ν (C-O) stretching). For relative monitoring, this band was divided by the 1740 cm⁻¹ band associated to ν (C=O) stretching specific of esters. The choice of 1740 cm⁻¹ band as internal standard was related to the fact that the ester function remains intact during the oxidation process [24].

For trilinolein, the 1165 cm⁻¹/1740 cm⁻¹ ratio showed an increase from ~0.45 before irradiation up to ~1.3 after irradiation at 2430 J/cm² indicating the formation of hydroperoxides at these doses (Figure 2.II.B). After 2430 J/cm², the ratio decreased to reach a plateau at ~0.5. This decrease indicated the fragmentation of hydroperoxides and the formation of higher peroxy radicals [15, 44]. The plateau after 4860 J/cm² was at almost the same value before irradiation, which indicated that the observation included the beginning of the formation of hydroperoxydes, the increase of their number, then their fragmentation and complete decomposition.

For Trilinolenin, the 1165 cm⁻¹/1740 cm⁻¹ ratio was ~1.5 before irradiation. It increased up to ~1.7 135 J/cm² and followed by a marked decrease to reach a plateau at ~0.35 after 1080 J/cm² (Figure 2.III.B). The high values observed before irradiation were indicative to the

presence of hydroperoxides and confirmed the auto-oxidation that was observed by hydrogen abstraction descriptor. The same information was obtained from the variations in the 1165 cm^{-1} band observed on the Raman spectra plotted in Figure 3.A and 3.D.

As described in our previous work on free fatty acids oxidation [15], hydroperoxides and peroxy radicals are unstable and decompose to a variety of volatile compounds, including aldehydes, ketones, hydrocarbons, and other secondary products [44].

To lead to the formation of these secondary products, a cyclization mechanism (Figure 2.I.C) takes place.

The loss of a double bond due to the cyclisation mechanism (Figure 2.I.C) can be monitored by the relative evolution of the 1675 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})$). Thus, cyclisation should be related to a decrease in the 1655-1675/1740 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C}) / \nu(\text{C}=\text{O})$ ester) ratio and a decrease in the AUCs of the bands at around 970 cm^{-1} (out of plane vinyl CH bending, $\delta(\text{=CH})$), 1267 cm^{-1} (in plane vinyl CH bending, $\delta(\text{=CH})$) and 3010 cm^{-1} (vinyl CH stretch, $\nu(\text{=CH})$) (Figure 3.A.C.D.F).

For Trilinolein (Figure 2.II.C), an increase was observed from 0 to 1080 J/cm^2 followed by a plateau until 2403 J/cm^2 . At these doses, no modification was observed for the 970, 1267 and 3012 cm^{-1} bands (Figure 3.A.C.D.F). Based on this, the relative increase of the AUC of the 1675 cm^{-1} band cannot be related to variations in the number of double bonds. It can rather be associated to the conjugated double bonds that were generated during the oxidation process (Figure 2.I.B and Figure 2.I.B') [45].

After 2403 J/cm^2 , a marked decrease was observed. This decrease can be associated to the loss of double bond and was confirmed by the decrease in the AUC of the out of plane vinyl CH bending (970 cm^{-1}), the in-plane vinyl CH bending (1267 cm^{-1}) and the vinyl CH stretch (3010 cm^{-1}) (Figure 3.A.C.D.F). It is important to note the parallel evolution between the decomposition of hydroperoxides and peroxy radicals (Figure 2.II.B and Figure 3.II.B) and the cyclisation (Figure 2.II.C).

Trilonelenin cyclisation (Figure 2.III.C) started after 67.5 J/cm^2 . An abrupt decrease of, the $\nu(\text{C}=\text{C}) / \nu(\text{C}=\text{O})$ ester ratio was observed after 135 J/cm^2 simultaneously with the increase in the hydroperoxidation markers.

In the final steps of the oxidation mechanisms, aldehydes, ketone, alcohols, and other secondary products were produced. Malondialdehyde (MDA) was described as the major secondary product (Figure 2.I.D) [15].

The formation of these products can be followed by the evolution of the $1725\text{ cm}^{-1}/1740\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C}=\text{O})$ ald./ $\nu(\text{C}=\text{O})$ ester) ratio. For both triglycerides, this ratio showed an increase, simultaneously with other oxidation steps. The maximum values were obtained at 3240 J/cm^2 and 540 J/cm^2 for Trilinolein and Trilinolenin respectively (Figure 3.II.D and Figure 3.III.D). After these doses, the balance between the production of the volatile compounds and their evaporation was inverted resulting in a decrease in the ratio values.

Finally, the increase in the *trans* conformers was described by Muik et al. as related to the formation of *trans* secondary oxidation products [24]. The *trans* $\nu(\text{C}=\text{C})$ / *cis* $\nu(\text{C}=\text{C})$ ratio was presented in Figure 2.II.D' and 2.III.D'. For Trilinolein, a marked increase was observed after 3240 J/cm^2 (Figure 2.II.D') with a dose decay compared to the decrease in the global $\nu(\text{C}=\text{C})$ content (Figure 2.II.C). The continuous increase of the *trans/cis* ratio was associated to the presence to other *trans* secondary oxidation products than the volatile compounds.

Similar observations were obtained for trilinolenin (Figure 2.III.D') with a plateau for higher doses. This was related to the higher oxidation rate of this triglyceride. The conformers changes were also seen by the broadening of the peak at around 1657 cm^{-1} in Raman spectra for both triglycerides (Figure 3.B and 3.E).

In addition to the structural evolution, organizational and conformational changes were observed. Figure 3.C and 3.F showed a decrease of the $\nu(\text{CH}_2)$ asym shoulder at around 2870 cm^{-1} indicating higher interchain disorder along with irradiation. As mentioned in our previous study, the decrease in the AUC of the 2870 cm^{-1} band may contribute to the observed decrease of the CH_2/CH_3 ratio [15].

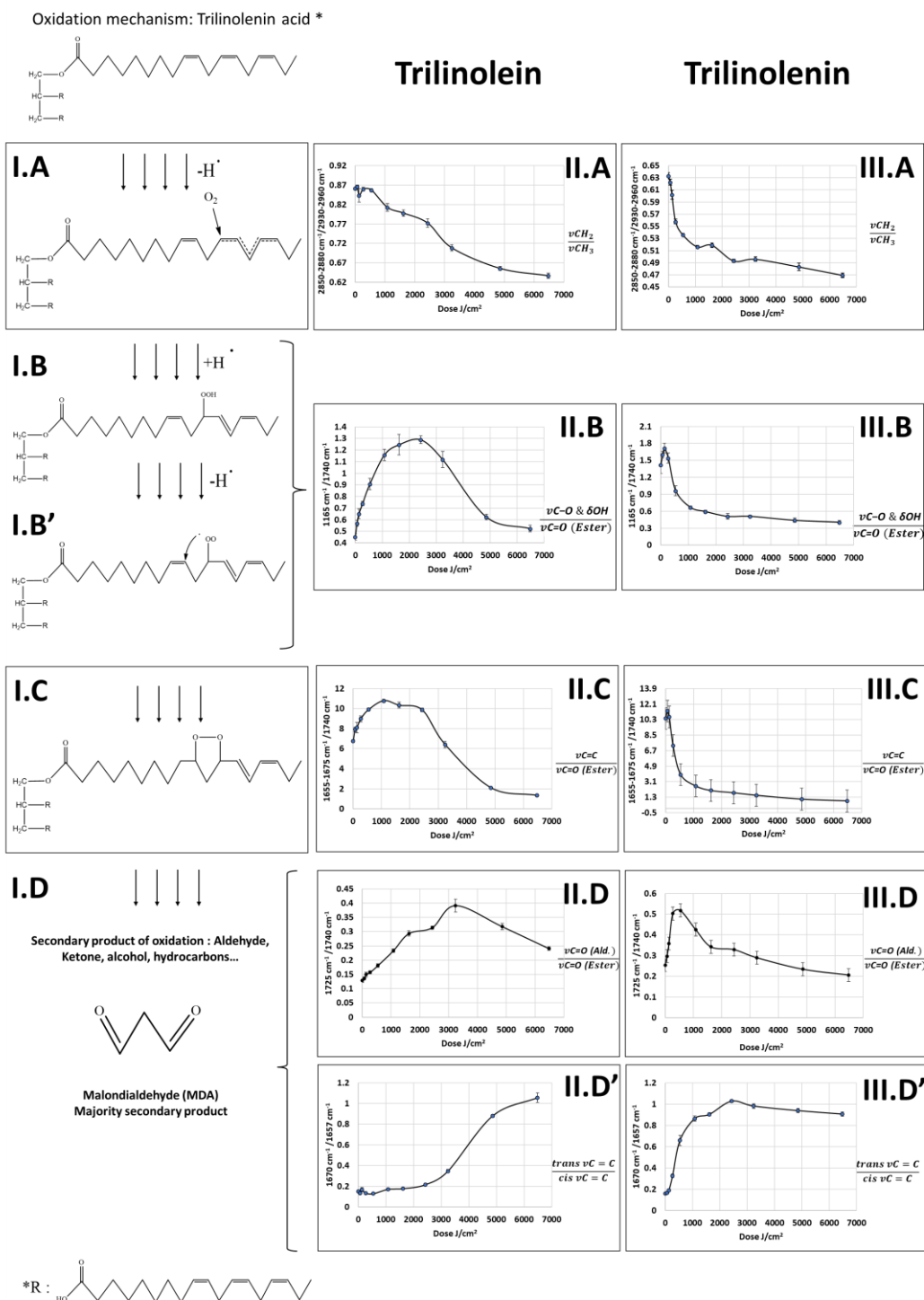


Figure 2 : I. Oxidation mechanism of polyunsaturated alkyl chain in TG (* example of tri-linolenin) [(I.A) Hydrogen abstraction. (I.B) Hydro-peroxidation. (I.B') Peroxyl radicals formation. (I.C) Cyclization. (I.D) Formation of secondary oxidation products]. II. Raman descriptors of Trilinolein oxidation. III. Raman descriptors of Trilinolenin descriptors [(II.A, III.A) CH₂/CH₃ stretching ratio. (II.B, III.B) (δ(OH) and ν(C-O)) / ν(C=O) (ester) ratio. (II.C, III.C) ν(C=C) / ν(C=O) (ester) ratio. (II.D, III.D) ν(C=O) (aldehyde) / ν(C=C) ratio. (II.D', III.D') trans ν(C=C) / cis ν(C=C) ratio] [32, 36, 37, 46-48]

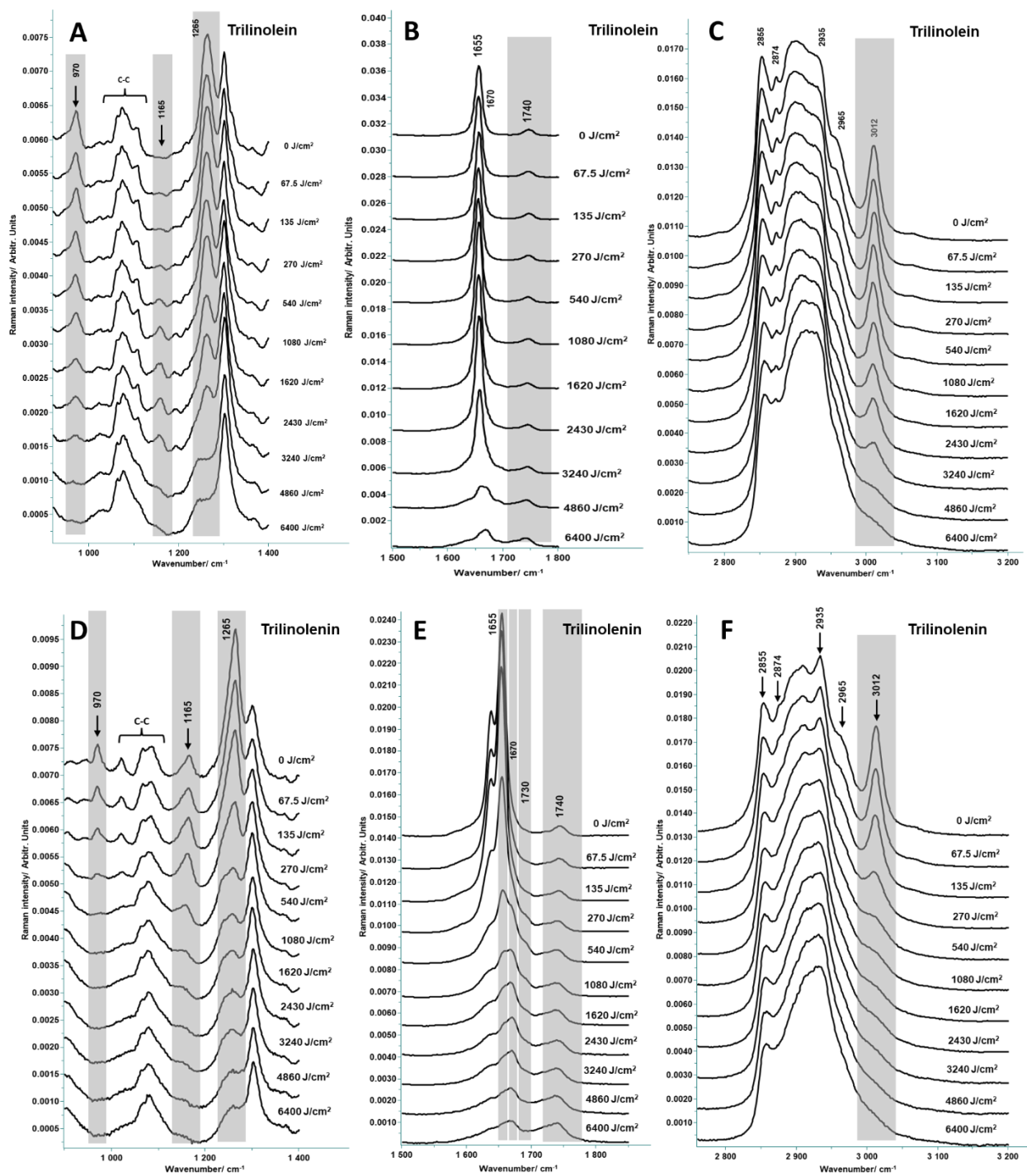


Figure 3 : (A–F) Raman spectra of Trilinolein and Trilinolenin at different UV doses.

Conclusion:

Skin Surface Lipids (SSLs) and stratum corneum (SC) lipids represent the first barrier protecting our body against external insults. Even though the effect of solar radiations on skin is well documented, their effect on Skin SSLs and SC lipids is generally observed at the end of the oxidation process [49-52].

This paper is the second part of a global study that aims to put together different spectral descriptors to follow the different structural modifications during the photo-oxidation process, *i.e.* hydrogen abstraction, formation of hydroperoxides and peroxy radicals as primary oxidation products and the formation of aldehydes, ketones, alcohol as secondary products. In the first part, the use of vibrational spectroscopies enabled to monitor, step by step, the oxidation process of fatty acids induced by different doses of UV irradiations obtained under a solar simulator [15]. In this part, photo-oxidation of 5 triglycerides, Tripalmitolein, 1,2-palmitolein -3- palmitin and 1,2-palmitin -3- palmitolein, trilinolein and trilinolenin was studied. Saturated and mono-unsaturated TG were not prone to oxidation. Trilinolein and trilinolenin followed an oxidation process similar to sebaleic and linolenic acids with oxidation steps occurring at lower doses.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics for the financial support of this work.

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

References

1. Correia, B.S.B., et al., *Analytical Tools for Lipid Assessment in Biological Assays*. Advances in Lipid Metabolism, 2020.
2. Fahy, E., et al., *Lipid classification, structures and tools*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 637-47.
3. Smith, A.D., *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. 2003, Oxford ; New York: Oxford University Press. 738 p.
4. Fahy, E., et al., *A comprehensive classification system for lipids*. (0022-2275 (Print)).
5. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. (0002-9165 (Print)).
6. Mylonas, C.G. and D. Kouretas, *Lipid peroxidation and tissue damage*. In vivo, 1999. **13** **3**: p. 295-309.
7. Shichiri, M., Y. Yoshida, and E. Niki, *Chapter 4 - Unregulated Lipid Peroxidation in Neurological Dysfunction*, in *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health*, R.R. Watson and F. De Meester, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 31-55.
8. Spitteller, G., *Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **95**(2): p. 105-162.
9. Sjövall, P., et al., *Imaging the distribution of skin lipids and topically applied compounds in human skin using mass spectrometry*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 16683.
10. Lasch, J., et al., *Oxidative damage of human skin lipids. Dependence of lipid peroxidation on sterol concentration*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1349**(2): p. 171-81.
11. Niki, E., *Revised Special Issue on "Recent Progress in Lipid Peroxidation Based on Novel Approaches" Lipid oxidation in the skin*. Free radical research, 2014. **49**: p. 1-34.
12. Niki, E., *Lipid oxidation in the skin*. Free Radical Research, 2015. **49**(7): p. 827-834.
13. Catala, A. and M. Diaz, *Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 423.
14. Spickett, C.M., *The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis*. Redox Biol, 2013. **1**(2213-2317 (Electronic)): p. 145-52.
15. Assi, A., et al., *Characterization of free fatty acids photo-oxidation under UV radiations: A stepwise Raman study*. Journal of Raman Spectroscopy, 2022.
16. Sylvie, E., *Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (Trachurus trachurus) : choix des procédés*. 2003, PhD thesis, Ecole polytechnique de l'Université de Nantes, France.
17. Kim, E.J., et al., *UV decreases the synthesis of free fatty acids and triglycerides in the epidermis of human skin in vivo, contributing to development of skin photoaging*. J Dermatol Sci, 2010. **57**(1): p. 19-26.
18. Karatas, F., M. Karatepe, and A. Baysar, *Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 2002. **311**(1): p. 76-9.
19. Zelzer, S., et al., *Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry—Comparison with high-performance liquid chromatography methodology*. Free radical research, 2013. **47**.
20. Young, I.S. and E.R. Trimble, *Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. Ann Clin Biochem, 1991. **28** (Pt 5)(0004-5632 (Print)): p. 504-8.
21. Dong, X., J. Tang, and X. Chen, *Sensitive determination of malondialdehyde in rat prostate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 3990.

22. Ma, L. and G. Liu, *Simultaneous Analysis of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-hexenal, and 4-Hydroxy-2-nonenal in Vegetable Oil by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*. J Agric Food Chem, 2017. **65**(51): p. 11320-11328.
23. Yonny, M.E., et al., *Development of a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2017. **2017**: p. 4327954.
24. Muik, B., et al., *Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy*. Chemistry and Physics of Lipids, 2005. **134**(2): p. 173-182.
25. Machado, N.F.L., et al., *The autooxidation process in linoleic acid screened by Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2012. **43**(12): p. 1991-2000.
26. Guillén, M.D. and N. Cabo, *Usefulness of the Frequency Data of the Fourier Transform Infrared Spectra To Evaluate the Degree of Oxidation of Edible Oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(2): p. 709-719.
27. Agbenyega, J.K., M. Claybourn, and G. Ellis, *A study of the autoxidation of some unsaturated fatty acid methyl esters using Fourier transform Raman spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1991. **47**(9): p. 1375-1388.
28. Li, N., et al., *A Protective Role for Triacylglycerols during Apoptosis*. (1520-4995 (Electronic)).
29. Yen, C.L., et al., *Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis*. (0022-2275 (Print)).
30. Coleman, R.A. and D.G. Mashek, *Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling*. (1520-6890 (Electronic)).
31. Lieber, C.A. and A. Mahadevan-Jansen, *Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra*. (0003-7028 (Print)).
32. Rael, L., et al., *Lipid Peroxidation and the Thiobarbituric Acid Assay: Standardization of the Assay When Using Saturated and Unsaturated Fatty Acids*. Journal of biochemistry and molecular biology, 2004. **37**: p. 749-52.
33. Tfyali, A., et al., *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(3): p. 1281-96.
34. Guillard, E., et al., *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part II: effect of chains lengths and head group structures*. Anal Bioanal Chem, 2011. **399**(3): p. 1201-13.
35. Bresson, S., M.E. Marssi, and B. Khelifa, *Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides*. Chemistry and Physics of Lipids, 2005. **134**(2): p. 119-129.
36. Frankel, E.N., *Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids*. Progress in Lipid Research, 1984. **23**(4): p. 197-221.
37. Shah, D., et al., *Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus*. Journal of Biomedical Science, 2014. **21**(1): p. 23.
38. Niki, E., *Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(5): p. 469-84.
39. Girotti, A.W., *Mechanisms of lipid peroxidation*. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine, 1985. **1**(2): p. 87-95.
40. Porter, N.A., S.E. Caldwell, and K.A. Mills, *Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids*. Lipids, 1995. **30**(4): p. 277-290.
41. Michel, F., et al., *Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques*. Annales de Biologie Clinique, 2008. **66**(6): p. 605-620.
42. Orlova, Y., et al., *Review of the kinetics and simulations of linseed oil autoxidation*. Progress in Organic Coatings, 2021. **151**: p. 106041.
43. Marshall, G.L., *The analysis of cured drying oils by swollen state ¹³C-NMR spectroscopy*. European Polymer Journal, 1986. **22**(3): p. 231-241.
44. Cao, J., et al., *Novel approach to evaluate the oxidation state of vegetable oils using characteristic oxidation indicators*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(52): p. 12545-52.
45. !!! INVALID CITATION !!!

46. Larsson, K., *Conformation-dependent features in the raman spectra of simple lipids*. Chemistry and Physics of Lipids, 1973. **10**(2): p. 165-176.
47. Verma, S.P. and D.F.H. Wallach, *Raman spectra of some saturated, unsaturated and deuterated C18 fatty acids in the HCH-deformation and CH-stretching regions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1977. **486**(2): p. 217-227.
48. Wegener, M., et al., *Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. I. ceramides*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **128**(1): p. 203-213.
49. Trommer, H., *The examination of skin lipid model systems stressed by ultraviolet irradiation in the presence of transition metal ions*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001. **51**(3): p. 207-214.
50. Trommer, H., et al., *Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation*. Pharm Res, 2002. **19**(7): p. 982-90.
51. Merle, C., C. Laugel, and A. Baillet-Guffroy, *Spectral monitoring of photoirradiated skin lipids: MS and IR approaches*. Chem Phys Lipids, 2008. **154**(1): p. 56-63.
52. Merle, C., C. Laugel, and A. Baillet-Guffroy, *Effect of UVA or UVB irradiation on cutaneous lipids in films or in solution*. Photochem Photobiol, 2010. **86**(3): p. 553-62.

Article 3 : “ Skin Surface Lipids photo-oxidation : a vibrational spectroscopy study”

Contexte :

Le film hydrolipidique représente l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement. Les Lipides Cutanés de Surface (LCS) qui le constituent, résultent de l'activité des glandes sébacées et de la desquamation de l'épiderme. Alors que les propriétés de barrière cutanée sont situées au niveau du *Stratum Corneum* (SC), les LCS sont également impliqués dans cette fonction en renforçant la barrière de la couche cornée. Ainsi, les LCS jouent un rôle important dans les fonctions essentielles de la peau humaine, telle que la photo-protection ; en effet ils constituent la première ligne de défense contre les rayonnements solaires. L'objectif de ce travail s'organise en deux étapes : la première étape consiste à étudier la photo-oxydation, initiée par les rayonnements solaires, de chacune des classes lipidiques qui constituent les LCS et la deuxième étape concerne l'évaluation de l'impact des rayonnements solaires sur l'ensemble du mélange des LCS et la vérification de leurs capacités à protéger la peau.

Matériels & Méthodes :

Des solutions de squalène, de cholestérol, de vitamine E, de Palmitoleyl Palmitate et du mélange des LCS ont été irradiés à différentes énergies en utilisant un simulateur solaire 16S-300 qui produit un spectre proche du spectre solaire. Par la suite, les solutions ont été analysées par spectroscopies Raman et infrarouge. De plus, le mélange des LCS a été analysé et caractérisé en HT-GC/MS avant et après irradiation.

Résultats :

Aucune modification n'a été observée après irradiation ni au niveau de la cire (Palmitoleyl Palmitate), ni au niveau du cholestérol. Cependant, dans le cas de la vitamine E, la formation d'hydroperoxydes comme produits d'oxydation primaires a été observée par spectroscopie Raman. En plus, la formation de produits d'oxydation secondaires de l'alpha tocophérol qui contiennent une fonction carbonyle, tels que les quinones, les époxyquinones, les cétones et autres a été détectée à l'aide des spectroscopies Raman et infrarouge. En revanche, le squalène et le mélange des LCS ont montré les mêmes modifications après irradiation telles que la diminution de nombre des groupements méthylènes (-CH₂-) à la suite de l'abstraction

de l'hydrogène. En plus, un changement dans le degré d'insaturation du Squalène a été clairement observé pendant l'oxydation. Par ailleurs, le rôle antioxydant du squalène au sein du mélange des LCS a été mise en évidence en utilisant la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Conclusion :

Premièrement, les différentes classes lipidiques des LCS ne présentent pas la même sensibilité aux rayonnements solaires. Deuxièmement, des descripteurs Raman et infrarouge ont été déterminés permettant de suivre la photo-oxydation initiée par les rayonnements solaires du squalène, de la vitamine E ainsi que des LCS. Finalement à l'aide de la HT-GC/MS, il a été démontré que les lipides présentent un comportement différent quand ils sont irradiés individuellement par rapport au cas où ils sont irradiés dans le mélange des LCS. En effet, lorsque le film des LCS est irradié, les modifications les plus marquées ont été observées sur le squalène. Ceci confirme son rôle antioxydant en éliminant les radicaux libres générés par l'oxydation des acides gras poly-insaturés.

Skin Surface Lipids photo-oxidation : a vibrational spectroscopy study

Ali Assi¹, Rime Michael-Jubeli¹, Carine JACQUES², Hélène DUPLAN², Arlette Baillet-Guffroy¹,

Ali Tfayli^{1*}

Author(s):

- 1- Ali Assi: ali.assi@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 2- Rime Michael-Jubeli: rime.michael-jubeli@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 3- Carine JACQUES-JAMIN: Carine.JACQUES@pierre-fabre.com, Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France
- 4- Hélène DUPLAN: helene.duplan@pierre-fabre.com, Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France
- 5- Arlette Baillet-Guffroy: arlette.baillet-guffroy@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.
- 6- Ali Tfayli: **This author accept correspondance and proofs**, ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr, Lipides : systèmes analytiques et biologiques, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.

To whom correspondence should be addressed : ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

¹ Lip(Sys)², Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91400, Orsay, France.

² Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France

Abbreviations:

LPO: Lipid peroxidation.

SQ: Squalene

FFA: Free fatty acid

TG: Triglyceride

Chol: Cholesterol

VitE: Vitamine E

MDA: Malondialdehyde

SSLs: Skin Surface Lipids

SC: Stratum Corneum

UV: Ultraviolet

PUFA: Poly Unsaturated Fatty Acids

Abstract

Skin surface lipid (SSL) film is a mixture of sebum and epidermal lipids protecting skin from environment such as solar radiation. SSLs are a suitable target and scavenger for all reactive oxygen species (ROS) generated in the skin. In the skin, vitamin E has been identified as the main antioxidant, which can capture reactive oxygen species (ROS). This paper is the third part of a global study that evaluate the effect of solar radiations on the lipid classes that constitute SSLs. In the first two part, the effect of solar radiations on fatty acids and triglycerides was studied using vibrational spectroscopy. In this part, the effect on the other lipid classes such as squalene (SQ), cholesterol (Chol) and wax ester (WE) (Palmitoleyl Palmitate) was studied then the behavior of vitamin E under solar radiation was monitored. Finally, SSLs were irradiated and analyzed using vibrational spectroscopy and HT-GC/MS to respectively follow the oxidation process and to identify the first target of solar radiations in SSLs.

When irradiated alone, SQ oxidation process was detectable only after 2430 J/cm² dose. Similar observations were obtained for vitamin E (after 1620 J/cm²). No changes were observed on the cholesterol and on the wax ester (Palmitoleyl Palmitate).

In contrast, when extracted human SSLs film was irradiated, the more marked modifications were observed on SQ. This confirmed the antioxidant role of SQ by scavenging free radicals generated from the oxidation of poly unsaturated fatty acids (PUFA).

Keywords: Skin surface lipids, Lipid Peroxidation, Solar radiation, Vibrational spectroscopy.

Introduction

The *stratum corneum*, the upper layer of the epidermis consists of corneocytes embedded in a lipid matrix [1-3]. It is responsible for the formation and maintenance of skin barrier against water loss and environmental stresses such as UV solar radiation [4-6]. The protective role of SC against UV is mainly due to the reflection or the absorption of the radiation [7].

At the surface of the SC the hydrolipidic film, composed of sweat and skin surface lipids (SSLs) represents the utmost barrier with the external environment [8].

SSLs are composed from a mixture of non-polar lipids of epidermal and sebaceous origin [9]: triglycerides (TG) (20-60%), wax esters (23-29%), squalene (10-14%), free fatty acids (FFA) (5-40%), small amounts of cholesterol and cholesterol esters (1-5%) and diglycerides (DG) (1-2%) [8, 10-12].

The penetration of UV light through the skin leads to the formation of free radicals, which immediately interact with living cells. The generated free radicals can cause oxidation of epidermal proteins, lipids, and epidermal DNA [13-19].

While the protective properties of the skin against solar radiations are mainly based on melanin and *stratum corneum* components, skin surface lipids (SSLs) are also involved in this barrier [20-26]. They represent the first target of UV and other environmental radiations during natural or therapeutic exposure [27].

UV absorption by SSLs was evidenced by spectrophotometry with maximal absorption at 215 nm and an estimation of a 10 % reduction of the transmission at 300 nm [28].

Besides representing a first line of defense by direct UV absorption, SSLs constitute a suitable target and scavenger for all reactive oxygen species (ROS) generated in the skin by different molecular mechanisms, during irradiation [29].

In addition to SSLs, the hydrolipidic film also contains antioxidants that protect the skin from the negative effects of oxidative stress. Among these, vitamin E has been identified as the main antioxidant in human skin, which can capture reactive oxygen species (ROS) [30, 31].

This paper is the third part of a study that aimed to evaluate the impact of solar radiations on SSLs using vibrational spectroscopy. In the first and second parts, cumulative doses were applied on free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG) with different number of double bonds in the alkyl chains. In this paper, the effect of cumulative doses of solar radiations were studied on squalene (SQ), cholesterol (Chol) and a wax ester (WE: Palmitoleyl Palmitate). The behavior of Vitamin E (VitE) was also monitored.

Finally, natural human extracts of SSLs were irradiated and analyzed by Raman spectroscopy to follow the step wise evolution of vibrational descriptors. High temperature gas chromatography coupled to mass spectrometry (HT-GC/MS) was also used to identify the first targets of solar radiations among the lipid classes of the SSLs.

Materials and methods

Chemicals

Squalene, cholesterol, and vitamin E (α -tocopherol) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, United states). Palmitoleyl Palmitate (16:1(9Z)/16:0) was purchased from Larodan (Solna, Sweden).

Human SSLs extracts were provided from the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics (PFDC, Toulouse, France). Chloroform was purchased from Carlo Erba (Chaussée du Vexin, Val-de-Reuil, France).

For Raman measurements, lipids were dissolved in chloroform to obtain solutions of 2 mg/mL concentration. 20 μ L of each solution was deposited on CaF₂ slides. The lipid films were then dried to remove residual solvent traces.

For HT-GC/MS analyses 250 μ L of SSLs solution was prepared in chloroform. SSLs were derivatized in prior by trimethylsilylation. This reagent consisted of BSTFA/pyridine, 50:50 (v/v). SSLs were trimethylsilylated at room temperature for 30 min with 200 μ l of reagent. The excess reagent was then removed under nitrogen flow, and the dried residue was dissolved in 250 μ l of Chloroform.

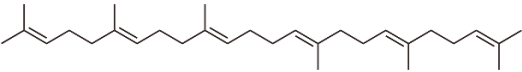
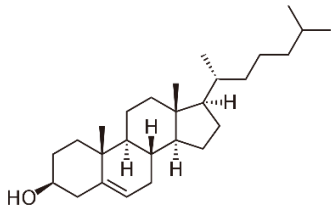
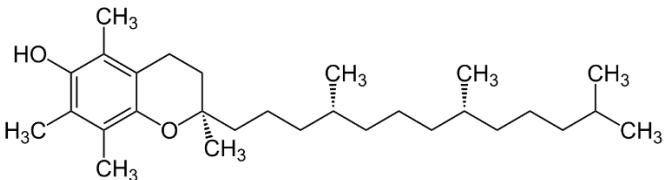
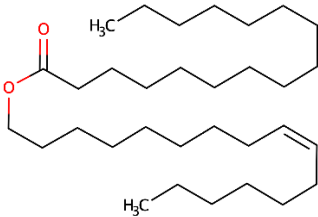
| Lipids | Formula | Structure |
|--------------------------|-------------------|--|
| Squalene | $C_{30}H_{50}$ |  |
| Cholesterol | $C_{27}H_{46}O$ |  |
| Vitamin E | $C_{29}H_{50}O_2$ |  |
| Palmitoleyl Palmitate | $C_{36}H_{62}O_2$ |  |

Table 1 : The lipids used in this study

Samples irradiation

Samples were irradiated at different times using a solar simulator 16S-300 (Solar Light, Glenside, Pennsylvania, USA) which produces a spectrum close to the solar spectrum. The power used for the irradiation was 0.45 W/cm^2 . This power was measured using a pyranometer (Glenside, USA). Table 1 shows the different energies used during the irradiation process.

| Time (min) | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 | 240 |
|--|---------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Total solar spectrum energy (J/cm ²) | 67.5 | 135 | 270 | 540 | 1080 | 1620 | 2430 | 3240 | 4860 | 6480 |
| UV-B energy (J/cm ²) | 0.225 | 0.45 | 0.9 | 1.8 | 3.6 | 5.4 | 8.1 | 10.8 | 16.2 | 21.6 |
| Minimal erythema dose | 7.5 MED | 15 MED | 30 MED | 60 MED | 120 MED | 180 MED | 270 MED | 360 MED | 540 MED | 720 MED |

Table 2: The different UV solar radiation doses applied to SSLs during irradiation in J/cm².

Raman spectroscopy

Raman spectral acquisitions were performed with an HR Labram microspectrometer (Horiba scientific, Palaiseau France). The excitation source is a 633-nm single-mode diode laser (TOPTICA PHOTONICS, Germany) with 35 mW laser power on the sample. The microspectrometer is equipped with an Olympus microscope, and measurements were recorded using a $\times 100$ MPlan objective (Olympus, Japan). Light scattered by the sample is collected through the same objective. A Peltier cooled (-65 °C) multichannel coupled charge device (CCD) detector (1024 \times 256 pixels) detects the Raman Stokes signal dispersed with a 400- μ m slit width and a 600 grooves per millimeter holographic grating enabling a spectral resolution of 2 cm⁻¹. A calibration procedure was applied daily prior to data collection as recommended by Horiba Scientific. The zero-order position and the laser line were daily checked. Raman relative shift was checked on silica wafer band at 521 cm⁻¹. For the study, the selected spectral range was 400 - 3800 cm⁻¹. The acquisition of each spectrum required 3 min. Spectral acquisition was performed using Labspec6 software (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

FTIR measurement

Spectral data was recorded using a Spotlight 400 infrared Spectrum (Perkin Elmer Life Sciences, Great Britain equipped with a liquid nitrogen cooled 16-pixel mercury cadmium telluride (MCT) line detector . Before each acquisition, a background was recorded on a clean part of the CaF₂ slide. All spectra were recorded in the mid infrared region (4000 to 750 cm⁻¹) at 30 scans/spectrum with a spectral resolution of 2 cm⁻¹.

9 different spectra were recorded for each slide. Data were pre-processed using Spectrum Image software.

High temperature gas chromatography-mass spectrometry (HTGC-MS):

A Thermo Scientific (Austin, TX) gas chromatography unit (Trace GC Ultra) equipped with an on-column injector was coupled to a quadrupole DSQII mass spectrometer via a high-temperature interface. The separation was achieved using a 30 m × 0.32 mm ZB-5HT capillary column (Phenomenex, Torrance, CA) coated with 0.1 μm of 5% diphenyl/95% dimethylpolysiloxane, connected to a 5-m 0.32-mm HT-deactivated tubing guard column.

Helium was used as a carrier gas at a constant flow of 2 mL/min. The injector and transfer line temperatures were set to 80°C and 350°C, respectively. The oven temperature was programmed from 60°C to 240°C at 5°C/min; 240°C to 320°C at 2.5°C/min; and 320°C to 350°C at 1°C/min. The operating conditions for electronic impact mass spectrometry (EI-MS) were source temperature at 250°C, ionizing energy at 70 eV, and scan range from m/z 45 to 1,000 with a period of 1 s. EI mass spectra were recorded in the total ion current (TIC) monitoring mode.

Data analysis

IR and Raman data were analyzed with a software developed in house, that operates in the Matlab environment (The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA). The background, due to the fluorescence, was corrected using a polynomial function with a polynomial order of 4 [32]. All spectra were smoothed using Savitzky-Golay filter on 9 points with a polynomial order of 4 and normalized to the AUC of the CH stretching band. Automatic determination of the peak positions was performed using second derivatives.

Results and Discussion

Squalene

Squalene (SQ) is suggested to be the initial target of skin lipid oxidation [33]. It is considered as the major photo-protective component of SSLs and works as sacrificing antioxidants [34].

SQ (C₃₀H₅₀) is a lipid that is highly sensitive to oxidation. This property is obviously linked to the presence of six carbon double bonds (C=C), making it the most unsaturated molecule in the SSLs [35].

The first step of the oxidation process of SQ involves hydrogen abstraction from the CH₂ groups rather than the CH₃ groups, which is expected since the C–H positions adjacent to a double bond are known to be especially vulnerable to oxidation [36, 37].

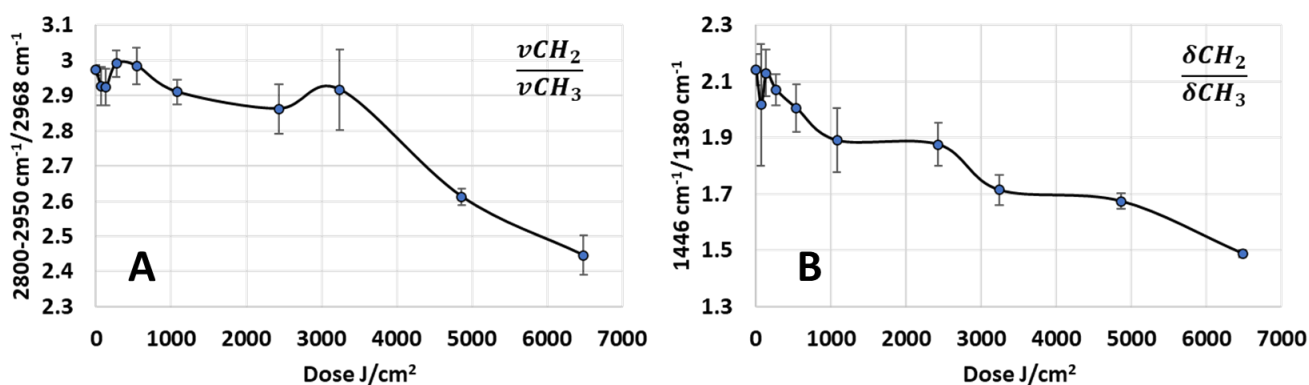


Figure 1: Infrared descriptors of squalene oxidation [(A) $\nu CH_2/\nu CH_3$, (B) $\delta CH_2/\delta CH_3$]

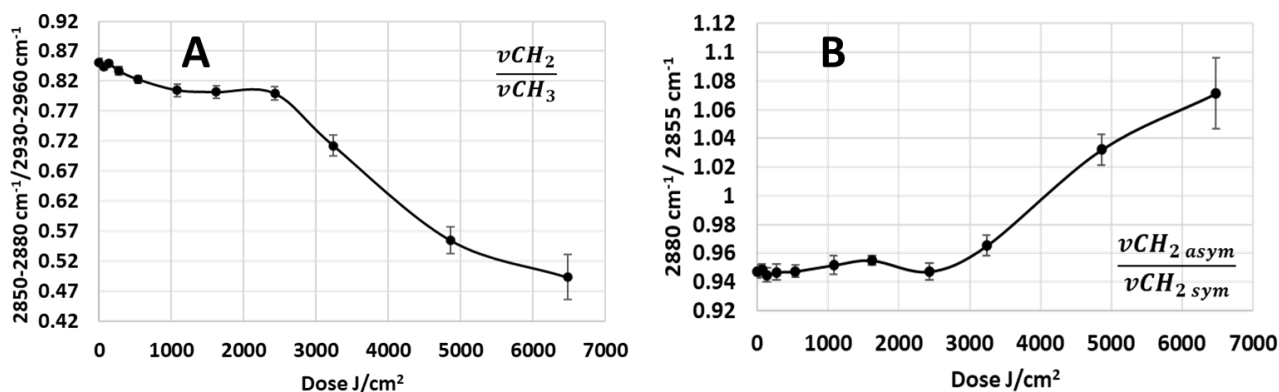


Figure 2: Raman descriptors of squalene oxidation [(A) $\nu CH_2/\nu CH_3$, (B) $\nu_{asym}CH_2/\nu_{sym}CH_2$]

In a SSL mixture, hydrogen abstraction from SQ can be produced either by direct solar radiation, or by free radicals in particular peroxy radicals produced during the oxidation of poly unsaturated fatty acids (PUFA) given that squalene is an important antioxidant that inhibits lipid peroxidation by scavenging peroxy and oxygen singlet radicals [38-41].

Thus, to confirm that direct solar radiations can be initiators of the first step of the oxidation process of SQ, this latter was irradiated then analyzed using vibrational spectroscopy.

As known, the bands at around 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} are associated with the symmetric and asymmetric CH_2 stretching respectively in infrared spectra, while in Raman, these bands occur at around 2850 and 2880 cm^{-1} for CH_2 symmetric and asymmetric stretching respectively [42, 43]. CH_3 symmetric and asymmetric stretching bands occur near 2870 and 2950 cm^{-1} respectively in infrared spectra and at around 2934 and 2962 cm^{-1} in Raman spectra.

The loss in CH_2 numbers was observed by the decrease of the $\nu\text{CH}_2/\nu\text{CH}_3$ ratio in both, infrared, and Raman spectra (Figure 1.A and 2.A). For higher doses, this decrease may be also related to the decomposition of alkyl chains into shorter compounds.

This decrease in CH_2 numbers was confirmed by following the CH_2 scissoring to CH_3 bending ratio ($1446\text{ cm}^{-1}/1380\text{ cm}^{-1}$) in infrared spectra (Figure 1.B) [44].

After hydrogen abstraction, the oxygen attack would produce hydroperoxides, the primary oxidation products. The formation of hydroperoxides after a dose of 2430 J/cm^2 was confirmed by the appearance of a new absorption band assigned to OH stretching in the $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ region (Figure 3.C) and a shoulder at around 1070 cm^{-1} , assigned to C-O stretching of alkyl peroxides, in infrared spectra (Figure 3.A) [45].

In addition, an increase in the intensities at 850 cm^{-1} was observed in Raman spectra. This could be related to the O-O stretching (Figure 4.A) [45].

Hydroperoxides and peroxy radicals are unstable, a cyclization mechanism takes promptly place and lead to their decomposition and the production of the secondary oxidation products. The cyclization induces a reduction in the number of double bonds.

The reduction in the degree of SQ unsaturation was observed by the decrease in the AUC at 1667 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching) in Raman spectra (Figure 4.B). This was also confirmed by the

decrease of the band assigned to the vinyl CH stretch that arises at about 3010 cm^{-1} and 3050 cm^{-1} respectively in Raman and infrared spectroscopy.

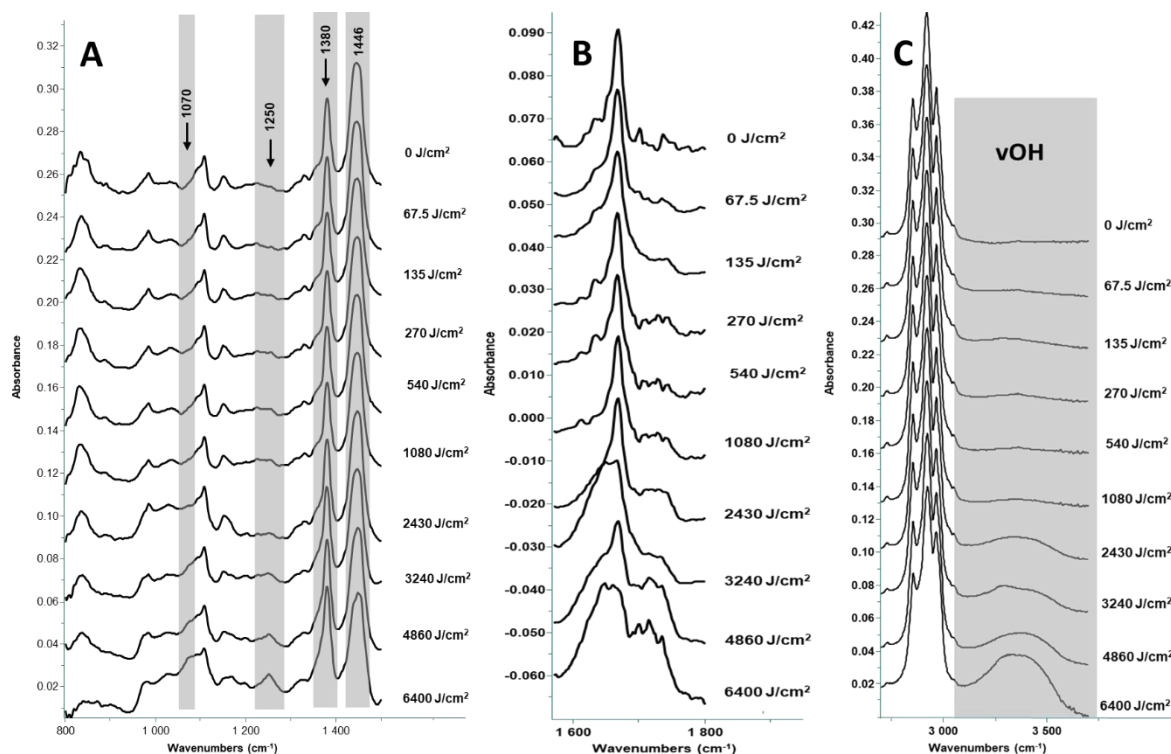


Figure 3: (A–C) Infrared spectra of squalene at different doses

The final steps of the oxidation mechanisms lead to the formation of Aldehydes including formaldehyde and malonaldehyde [46, 47], ketones, alcohols, and other secondary products [33, 44]. This was observed by the appearance of an overlap of many bands in the carbonyl region ($1600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) in infrared spectra, indicating that many functional groups containing carbonyl groups have been formed (Figure 3.B). This was confirmed in Raman spectra by the appearance of a band at around 675 cm^{-1} after an irradiation dose of 3240 J/cm^2 . This band can be assigned to C-CO-C stretching vibration (aliphatic ketones) and C-C-CO in plane bending vibration (aliphatic aldehydes) (Figure 4.A) [45].

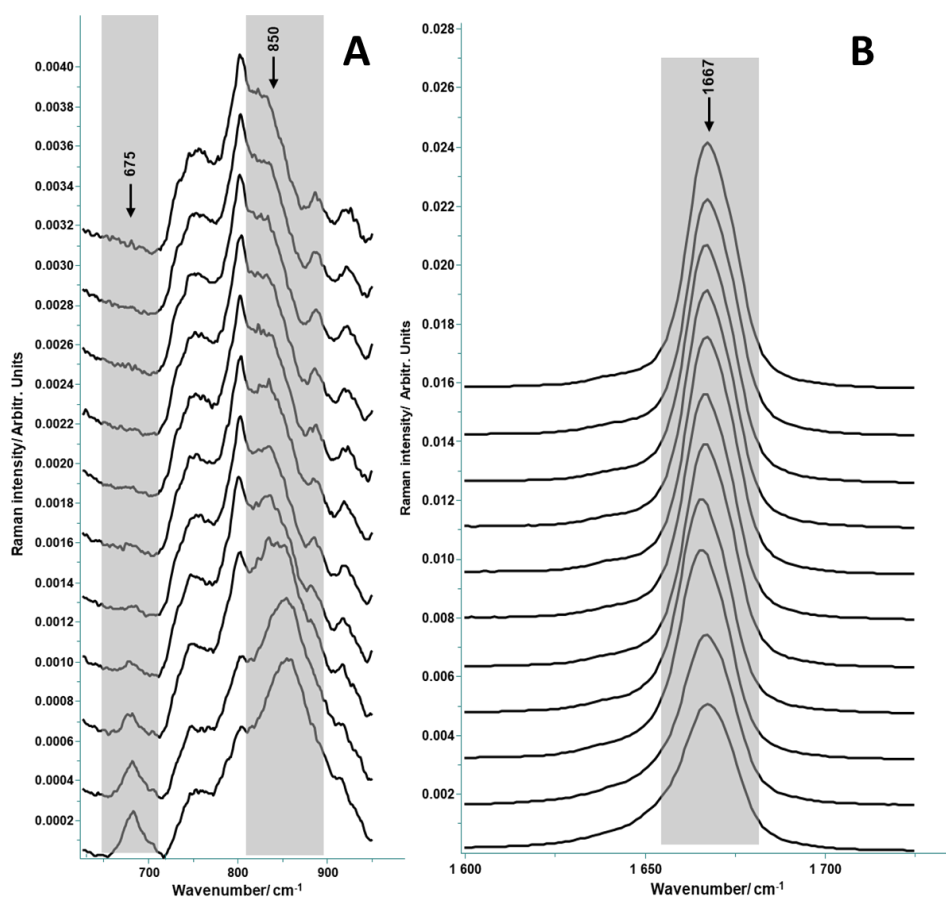


Figure 4: Raman spectra of squalene at different doses

In addition, the appearance of a band in infrared spectra at around 1250 cm^{-1} (OH bending) at the same dose (3240 J/cm^2) (Figure 3.A) indicated the formation of alcohols as secondary oxidation products.

In addition to the structural evolution, organizational and conformational changes were observed. An increase in the $(\nu(\text{CH}_2)\text{ asym}/\nu(\text{CH}_2)\text{ sym})$ ratio in Raman spectra after oxidation was observed indicating a high conformational order, that can be explained by the loss of double bonds (Figure 2.B).

It is worthy to note, that the oxidation descriptors observed in Figures 1 and 2, showed a significant evolution only after an applied dose of 2500 J/cm^2 , which means that the oxidation process started only from this dose. In the first part of this work [48], we have shown that the oxidation markers of PUFA evolved after application much lower solar doses, which confirmed that they oxidize faster than squalene. This can be explained by the fact that, unlike PUFA, such as sebaleic acid and linolenic acid, squalene does not have bis-allyl hydrogen, making it

relatively stable [14]. More importantly, this indicated that in an SSL mixture, PUFA oxidation products promptly produced can be scavenged by the squalene [38-41].

Cholesterol:

Cholesterol has a characteristic arrangement of four interconnected cycloalkane rings, one of which is attached to the hydroxyl group in the third position, while the other end of this molecule is a side chain with eight carbon atoms (Table 1) [49].

Infrared and Raman spectra of free cholesterol show different features. The bands between 2800–3000 cm^{-1} are associated with the asymmetric and symmetric stretching vibrations of CH_2 and CH_3 groups in Raman and infrared spectroscopy [49, 50]. The intense and broad band at 3400 cm^{-1} in infrared spectra is attributed to OH stretching [50]. Cholesterol has one double band (C=C) in the second ring. It is prominently shown at 1670 cm^{-1} in Raman spectrum. The band at 1440 cm^{-1} in Raman spectra is attributed to the CH_2 scissoring, and the bands at 1378 cm^{-1} and 1464 cm^{-1} are assigned to the CH_2 and CH_3 bending vibration of cholesterol molecule. In the lower wavenumber range of Raman spectra, several almost equally intense bands are seen at 1087, 1124 and 1176 cm^{-1} , associated with the C–C stretching modes. In addition, the bands that appear in the 800 – 1000 cm^{-1} region, are also associated to the C-C vibrational modes [49]. The range between 400 cm^{-1} and 800 cm^{-1} in Raman spectra is characteristic for cholesterol. Thus, the band at 701 cm^{-1} is associated with the in-plane bending of the ring, whereas the bands at 424 and 548 cm^{-1} are assigned to the bending vibrations of the C–H groups in the chain and rings [49].

In addition, the sharp peak at 1055 cm^{-1} in infrared spectra can be assigned to the ring deformation of cholesterol [50].

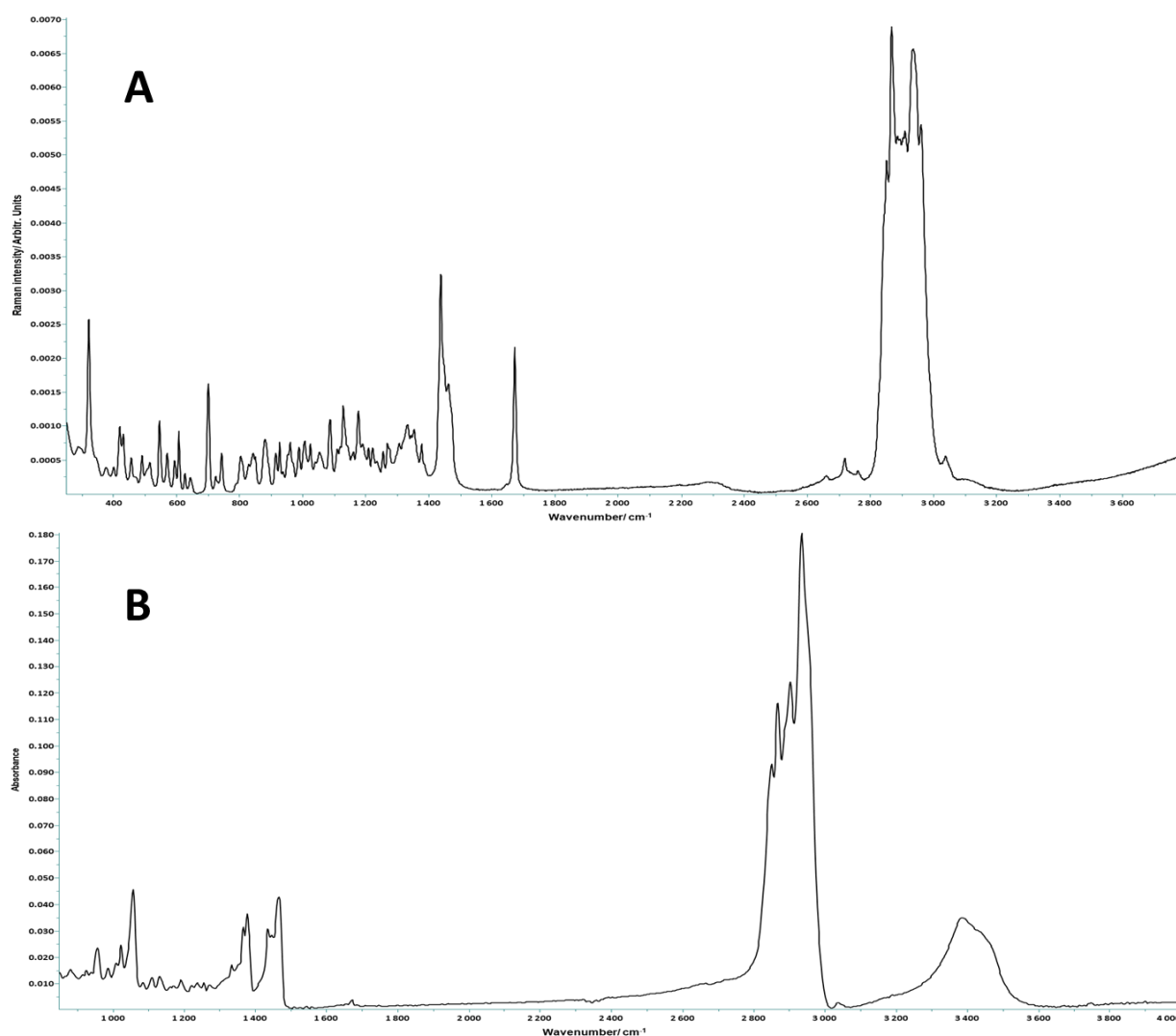


Figure 5: Raman (A) and infrared (B) spectra of cholesterol before oxidation.

The chemical oxidation of cholesterol is frequently initiated by reactions involving reactive oxygen species (ROS) in particular free radicals such as lipid peroxy radicals generated from the oxidation of PUFA that may react with cholesterol to form cholesterol peroxy radicals, which are precursors of several cholesterol oxidation products [51].

The interaction of cholesterol with peroxy radicals leads to the abstraction of the hydrogen from the C-7 (reactive site in the first oxidation step of Cholesterol) and the formation of cholesterol radical [52]. The latter can react with oxygen to form a cholesterol peroxy radical. This radical can abstract a hydrogen from other lipid molecules leading to the formation of a relatively stable cholesterol hydroperoxide [53].

PUFA oxidize faster than cholesterol under direct solar radiations, because the abstraction of a hydrogen from the -methylene group in PUFA (bis allylic) would be thermodynamically more favorable than hydrogen abstraction from the C7 methylene group of cholesterol [54].

Thus, to study the direct impact of solar radiations, and to confirm that the hydrogen abstraction is mostly due to the interaction with free radicals, cholesterol was directly irradiated and analyzed using vibrational spectroscopy.

No modifications were observed in Raman and infrared spectra after an irradiation dose of 6400 J/cm². This can confirm that the oxidation of cholesterol is initiated (hydrogen abstraction) by free radicals including peroxy radicals generated from PUFA during their oxidation and one can conclude that cholesterol may act as an antioxidant like vitamin E by capturing free radicals and quenches lipid peroxidation chain reaction.

Wax esters :

Wax esters are formed by combining one fatty acid with one fatty alcohol. Waxes could be saturated and unsaturated in which the acid moiety and/or the alcohol moiety could be unsaturated [20]. Only chains with 2 or more double bonds which are prone to oxidation. Saturated and monosaturated ones are less vulnerable to lipid peroxidation than their unsaturated counterparts [55].

Only random non-significant variations in the 2885/2850cm⁻¹ ($\nu(\text{CH}_2)$ asym/ $\nu(\text{CH}_2)$ sym), the 1655-1675 cm⁻¹/2840-2890 cm⁻¹ ($\nu\text{C}=\text{C}/\nu\text{CH}$), the 972 cm⁻¹/2840-2890 cm⁻¹ ($\delta=\text{CH}/\nu\text{CH}$) and the 1266 cm⁻¹/2840-2890 cm⁻¹ ($\delta=\text{CH}/\nu\text{CH}$) ratios were observed in Raman spectra. (Data not shown).

Vitamin E

Alpha tocopherol is the major biologically active vitamin E homologue. It has a chromane ring and a saturated hydrocarbon chain. There are eight methyl groups in alpha tocopherol which four are attached to the chromane head and other four are attached to the hydrocarbon chain. This molecule contains eleven methylene groups [56].

Raman and infrared spectra of Vitamin E were collected and presented characteristic features. In the 1500-1800 cm⁻¹ region, the observed bands at around 1585 and 1617 cm⁻¹ in Raman spectra are assigned to the CC stretching vibrations of the ring part of chromane head [56, 57]. The 950-1500 cm⁻¹ region is generally dominated by the wagging, scissoring, twisting, and

rocking vibrations of CH₂ and CH₃ groups. In addition, bands assignable to the stretching vibrations of C-O and C-C also appear in this region. Finally, the region below 950 cm⁻¹ has main contribution from torsion, rocking and bending modes and especially the bands assignable to the chromane head vibration [56, 57].

Oxidation mechanisms of vitamin E with peroxy radicals, superoxide radical and singlet oxygen have been extensively studied [58, 59]. It is generally regarded as the most important lipid-soluble antioxidant in human tissues such as skin. It prevents the propagation of lipid peroxidation by scavenging highly reactive peroxy radicals that are quenched by the hydrogen of phenolic OH group of alpha-tocopherol leading to the formation of alpha-tocopherol radical [60-63]. The reaction of alpha-tocopherol radical with a second peroxy radical leads to the formation of many oxidation products such as quinones, epoxyquinones, ketones and hydroperoxides that serve as markers of the antioxidant reactions of alpha-tocopherol [60, 62-65].

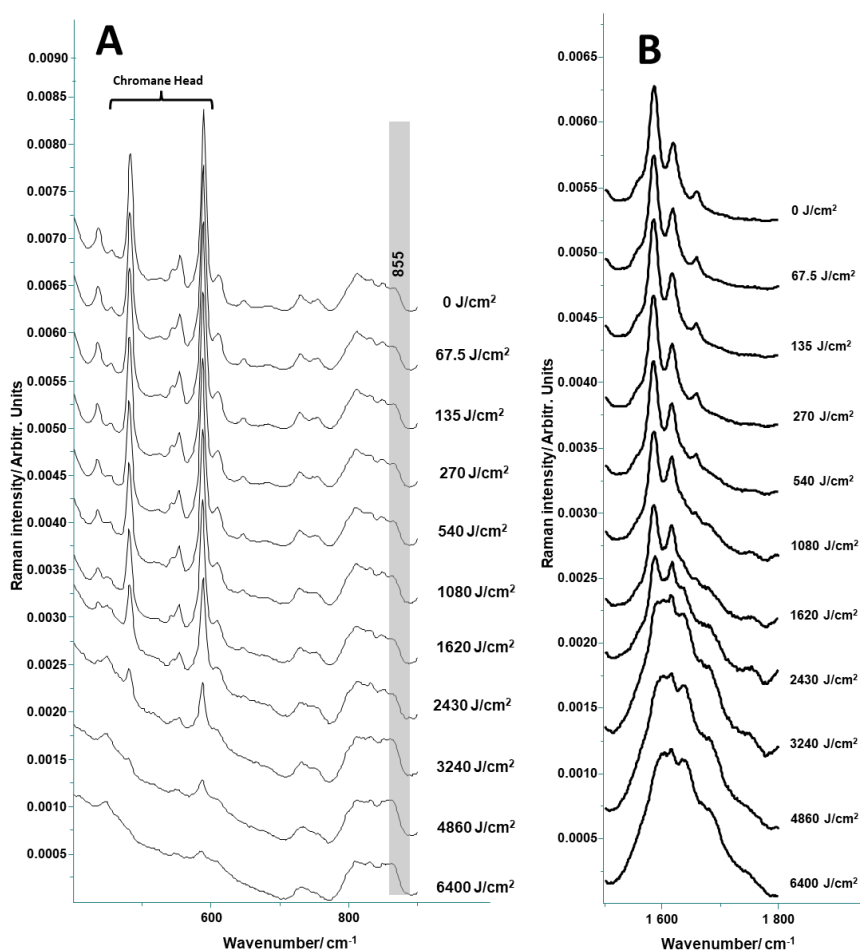


Figure 6: (A–B) Raman spectra of Vitamin E at different doses

Vitamin E oxidation can be also initiated by UV light with the abstraction of the hydrogen of the phenolic OH (homolytic cleavage of O-H bond) group which leads to the formation of alpha-tocopherol radical and the oxidation mechanism begins [51].

Hence, to evaluate the direct impact of solar radiations, vitamin E was irradiated at different doses and was analyzed using infrared and Raman spectroscopy.

After solar irradiation (1620 J/cm²), a broadening in the 1500-1800 cm⁻¹ region of Raman spectra was observed (Figure 6.B). This broadening indicates the formation of oxidation products of alpha tocopherol that contain carbonyl function such as quinones, epoxyquinones, ketones and others. The formation of these products was confirmed by the appearance of new bands in the 1500-1800 cm⁻¹ region of infrared spectra (Figure 7.B). In addition, an increase in the intensities at around 855 cm⁻¹ in Raman spectra which can be assigned to the O-O stretching (Figure 6.A). This increase could be due to the formation of hydroperoxides after oxidation. Moreover, the disappearance of the bands below 950 cm⁻¹ in Raman and infrared spectra may be due to chromane ring degradation after oxidation and the formation of oxidation products (Figure 6.A and 7.A).

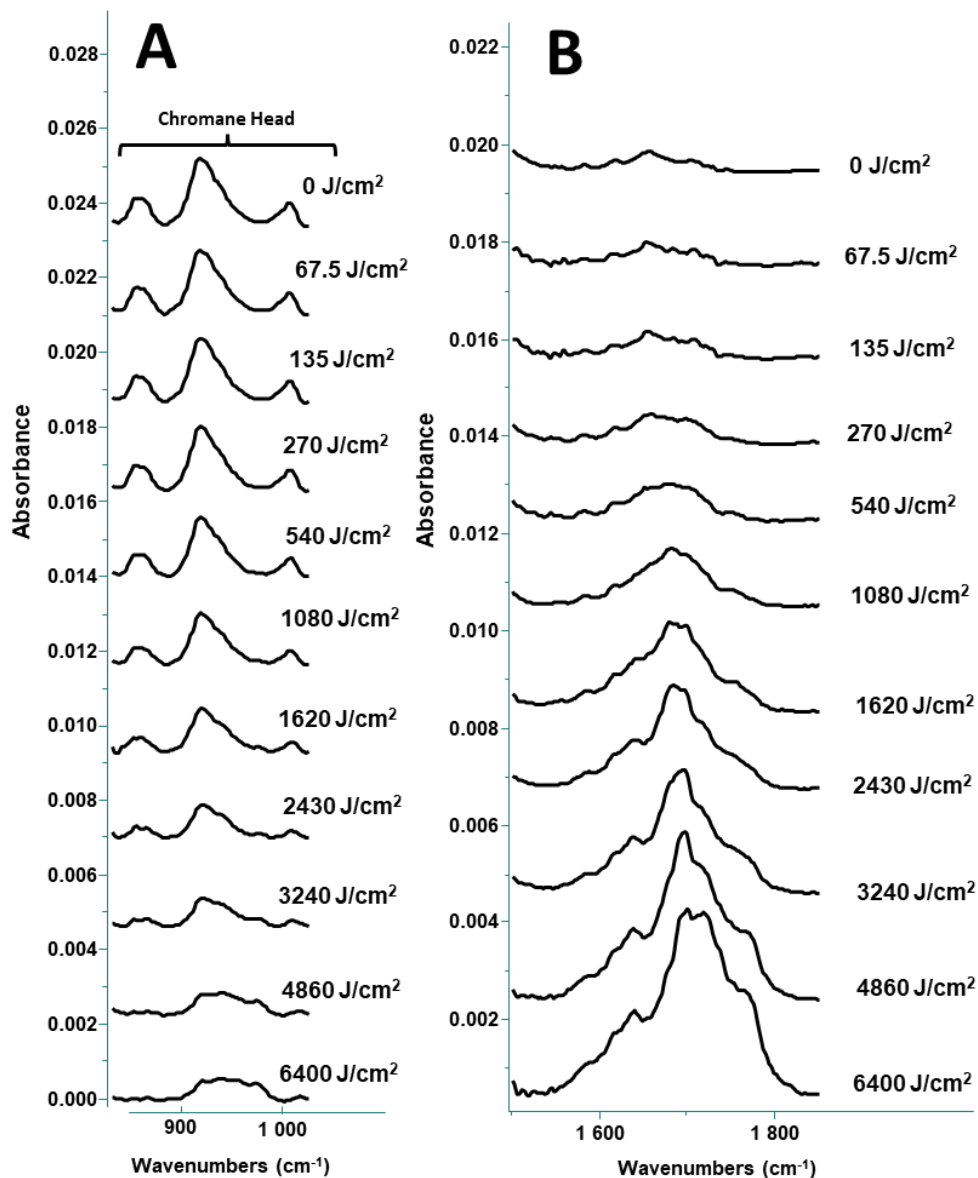


Figure 7: (A–B) Infrared spectra of vitamin E at different doses

Skin surface lipids (SSLs):

Based on solar irradiations of different SSLs components individually, unsaturated FFA [66] and unsaturated FA chains in triglycerides have shown an initiation of their oxidation process at lower doses than SQ. Meanwhile, it has been shown previously that when the human hydrolipidic film is subjected to high-dose irradiations *in vitro*, SQ is significantly degraded compared to triglycerides, mono-di-unsaturated FFA or cholesterol [29].

Thus, to confirm that SQ is the first target of solar radiation in SSLs and the more degraded, SSLs were irradiated for 3 hours (4860 J/cm²) then analyzed using HT-GC/MS (Figure 8).

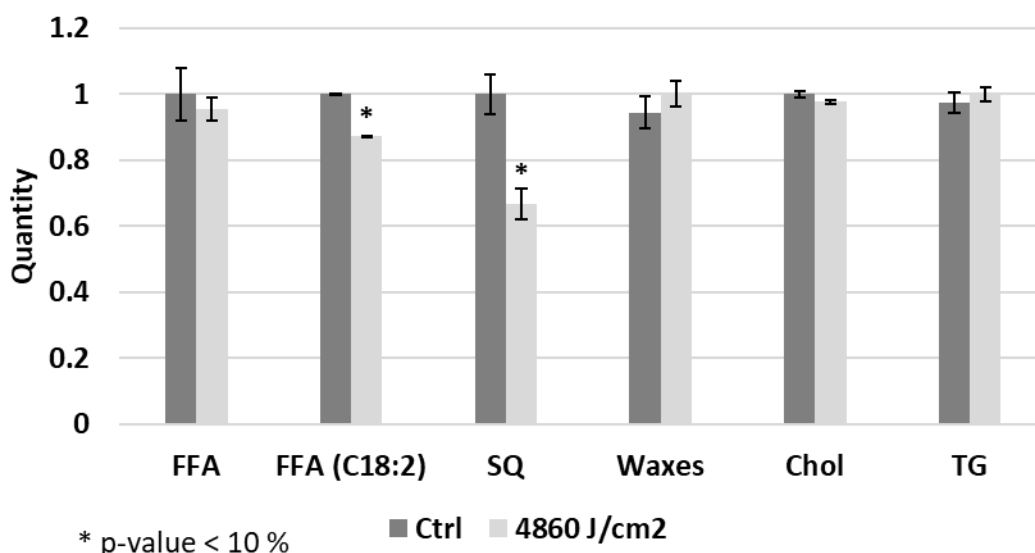


Figure 8: Histograms of the mean ($n = 3$) quantity of lipid classes for SSLs before and after irradiation. Each lipid class quantity was normalized by the value before irradiation.

The used HT-GC/MS method didn't enable to detect the vitamin E in the chromatogram. Thus, only SSLs were observed. As seen in Figure 8, no significant changes in the amount of the whole class of FFA, waxes, Chol and TG were observed after irradiation. However, a marked decrease of di-unsaturated FFA and a significant decrease of SQ were observed. The decrease in the amount of SQ was much more important than FFA (C18:2). This can be explained by the fact that SQ is the most abundant class in the SSLs [34], and due to its antioxidant role, PUFA oxidation products promptly produced can be scavenged by the SQ.

This confirms that in the SSLs, squalene is the first line defense against UV solar radiation and is the more oxidized component as compared to other lipidic classes. Furthermore, the behavior of lipid classes in SSLs against solar radiations may be different than if the lipids were irradiated individually.

In addition, SSLs were irradiated at different doses then analyzed using vibrational spectroscopy.

As previously mentioned, the first step of the oxidation involves hydrogen abstraction inducing a loss in CH₂ numbers that was observed by the decrease of the $\nu\text{CH}_2/\nu\text{CH}_3$ ratio in both, infrared, and Raman spectra of SSLs Figure 9.A and 10.A.

This hydrogen abstraction was confirmed by the decrease of the $1446\text{ cm}^{-1}/1380\text{ cm}^{-1}$ ratio (CH₂ scissoring) / (CH₃ bending) in infrared spectra (Figure 9.B).

Infrared and Raman spectra obtained at different doses showed no detectable descriptors related to the production of hydroperoxides. However, a decrease in the intensity at 1667 cm^{-1} was observed in the Raman spectra (Figure 11), this peak is assigned to the $\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching of squalene in trans-conformation. The loss of unsaturation was confirmed by the decrease of the band assigned the $=\text{C}-\text{H}$ stretching (Vinyl CH stretch) that arises at about 3012 cm^{-1} and 3050 cm^{-1} respectively in Raman and infrared spectroscopy.

Finally, an increase in the $(\nu(\text{CH}_2)_{\text{asym}}/\nu(\text{CH}_2)_{\text{sym}})$ ratio in Raman spectra after oxidation was observed (Figure 10.B). This evolution indicated a higher organizational order of SSLs film after irradiation.

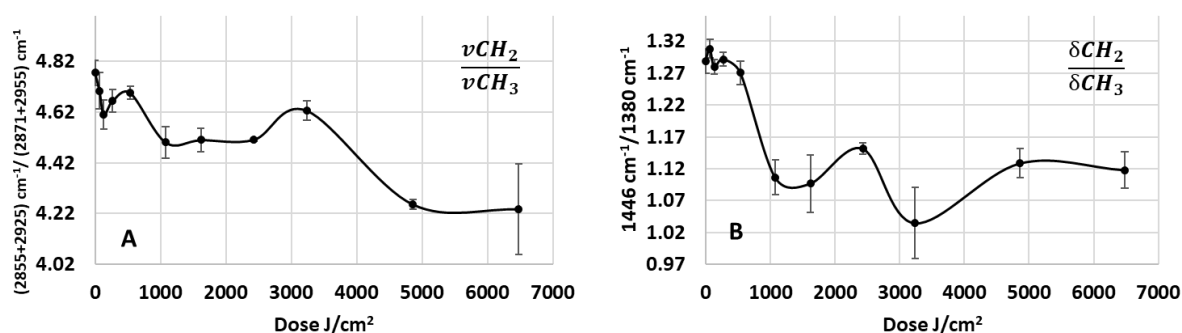


Figure 9: Infrared descriptors of SSLs oxidation [(A) $\nu\text{CH}_2/\nu\text{CH}_3$, (B) $\delta\text{CH}_2/\delta\text{CH}_3$]

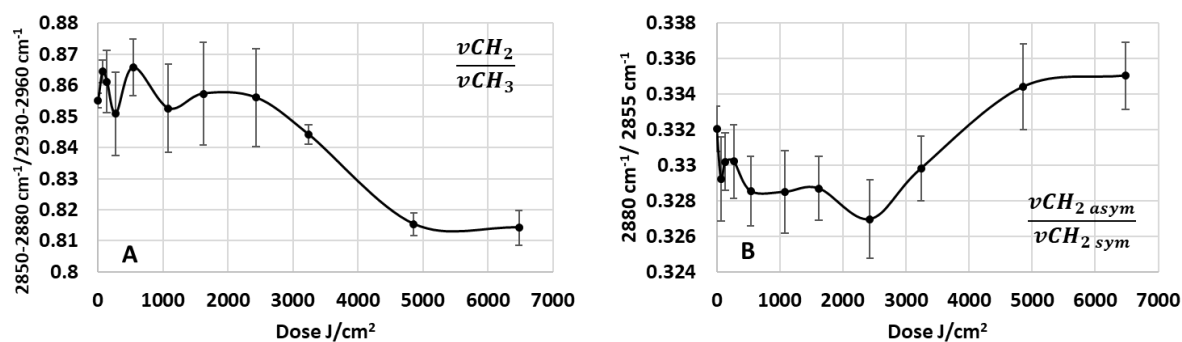


Figure 10: Raman descriptors of SSLs oxidation [(A) $\nu\text{CH}_2/\nu\text{CH}_3$, (B) $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2/\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$]

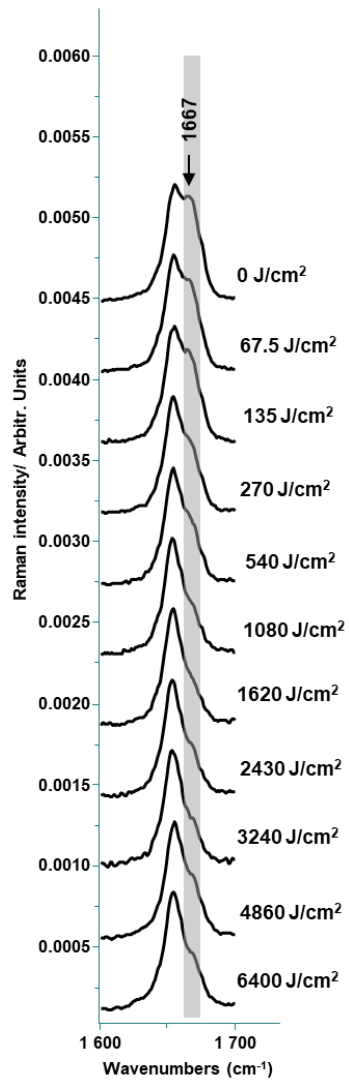


Figure 11 : Raman spectra of vitamin E at different doses

Conclusion:

This paper is the third part of a study focused on the effect of solar radiations on SSLs. In the first part PUFA showed direct oxidation after the application of low radiation doses. In the second part, the FA chains in triglycerides showed similar evolution with modification occurring more promptly compared to FFA.

In this part, when irradiated alone, SQ oxidation process was detectable only after 2430 J/cm² dose. Similar observations were obtained for vitamin E (after 1620 J/cm²). No changes were observed on the cholesterol on the wax ester (Palmitoleyl Palmitate).

The HT-GC/MS analysis of extracted human SSLs didn't enable to detect the vitamin E in the chromatogram. When extracted film was irradiated, the more marked modifications were observed on SQ in contrast to the irradiation of individual lipids.

The behavior of lipids under solar radiation was different either they were irradiated individually or in the mixture. In the SSLs mixture, a synergistic action took place. The abundance of squalene puts it in the first line of defense by absorbing a part of the energy of irradiation and by scavenging free radicals generated from the oxidation of PUFA.

References

1. Bakar, J., et al., *Stratum corneum ceramide profiles in vitro, ex vivo, and in vivo: characterization of the α -hydroxy double esterified ceramides*. (1618-2650 (Electronic)).
2. Madison, K.C., *Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis*. Journal of Investigative Dermatology, 2003. **121**(2): p. 231-241.
3. Jiang, S.J., et al., *Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation*. Journal of Dermatological Science, 2006. **44**(1): p. 29-36.
4. Sahle, F.F., et al., *Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy*. Skin Pharmacol Physiol, 2015. **28**(1): p. 42-55.
5. van Smeden, J. and J.A. Bouwstra, *Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients*. Current Problems in Dermatology, 2016. **49**: p. 8-26.
6. Mlitz, V., 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): p. 983-90.
7. Gniadecka, M., et al., *Photoprotection in vitiligo and normal skin. A quantitative assessment of the role of stratum corneum, viable epidermis and pigmentation*. Acta dermato-venereologica, 1996. **76**(6): p. 429-432.
8. Rigal, A., et al., *Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age*. LID - 10.1684/ejd.2020.3753 [doi]. (1952-4013 (Electronic)).
9. Greene, R.S., et al., *Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid*. J Invest Dermatol, 1970. **54**(3): p. 240-7.
10. Downing, D.T. and J.S. Strauss, *Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1974. **62**(3): p. 228-244.
11. Stewart, M.E., et al., *Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls*. (0003-987X (Print)).
12. Pappas, A., *Epidermal surface lipids*. Dermatoendocrinol, 2009. **1**(2): p. 72-6.
13. Biniek, K., R.H. Levi K Fau - Dauskardt, and R.H. Dauskardt, *Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin*. (1091-6490 (Electronic)).
14. Niki, E., *Lipid oxidation in the skin*. Free Radical Research, 2015. **49**(7): p. 827-834.
15. Thurstan, S.A., et al., *Chemical consequences of cutaneous photoageing*. Chemistry Central Journal, 2012. **6**(1): p. 34.
16. Bickers, D.R. and M. Athar, *Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease*. (1523-1747 (Electronic)).
17. Nicolaou, A., et al., *The eicosanoid response to high dose UVR exposure of individuals prone and resistant to sunburn*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2012. **11**(2): p. 371-380.
18. Rhodes, L.E., et al., *The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases*. The FASEB Journal, 2009. **23**(11): p. 3947-3956.
19. Nishigori, C., S. Hattori Y Fau - Toyokuni, and S. Toyokuni, *Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis*. (1523-0864 (Print)).
20. Michael-Jubeli, R., J. Bleton, and A. Baillet-Guffroy, *High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling*. J Lipid Res, 2011. **52**(1): p. 143-51.
21. Fluhr, J.W., et al., *Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice*. (0022-202X (Print)).
22. Mavon, A., et al., *Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 1997. **8**(3): p. 147-155.
23. Thiele, J.J., S.U. Weber, and L. Packer, *Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1006-10.

24. Pilgram, G.S.K., et al., *The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2001. **1511**(2): p. 244-254.
25. Man, M.Q., et al., *Variation of Skin Surface pH, Sebum Content and Stratum Corneum Hydration with Age and Gender in a Large Chinese Population*. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2009. **22**(4): p. 190-199.
26. Choi, E.H., et al., *Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans?* (0022-202X (Print)).
27. Hayakawa, K. and I. Matsuo, *Effects of PUVA therapy on skin surface lipids: skin surface lipid peroxidation in psoriasis vulgaris and its biological significance*. (0385-0005 (Print)).
28. Beadle, P.C. and J.L. Burton, *Absorption of ultraviolet radiation by skin surface lipid*. *British Journal of Dermatology*, 1981. **104**(5): p. 549-551.
29. De Luca, C. and G. Valacchi, *Surface Lipids as Multifunctional Mediators of Skin Responses to Environmental Stimuli*. *Mediators of Inflammation*, 2010. **2010**: p. 321494.
30. Packer, L. and G. Valacchi, *Antioxidants and the Response of Skin to Oxidative Stress: Vitamin E as a Key Indicator*. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2002. **15**(5): p. 282-290.
31. Nachbar, F. and H.C. Korting, *The role of vitamin E in normal and damaged skin*. (0946-2716 (Print)).
32. Lieber, C.A. and A. Mahadevan-Jansen, *Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra*. (0003-7028 (Print)).
33. Shimizu, N., et al., *Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 9116.
34. Kostyuk, V., et al., *Photo-Oxidation Products of Skin Surface Squalene Mediate Metabolic and Inflammatory Responses to Solar UV in Human Keratinocytes*. *PLOS ONE*, 2012. **7**(8): p. e44472.
35. Pham, D.M., et al., *Oxidization of squalene, a human skin lipid: a new and reliable marker of environmental pollution studies*. (1468-2494 (Electronic)).
36. Chi, Y.-S. and S. Kay Obendorf, *Aging of oily soils on textiles. Chemical changes upon oxidation and interaction with textile fibers*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1998. **1**(3): p. 371-380.
37. Jiang, Z.Y., S.P. Woollard Ac Fau - Wolff, and S.P. Wolff, *Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method*. (0024-4201 (Print)).
38. Kohno, Y., et al., *Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol*. (0006-3002 (Print)).
39. Warleta, F., et al., *Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells*. (1873-6351 (Electronic)).
40. Kim, S.-K. and F. Karadeniz, *Biological importance and applications of squalene and squalane*. *Advances in food and nutrition research*, 2012. **65**: p. 223-233.
41. Amarowicz, R., *Squalene: A natural antioxidant?* *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009. **111**(5): p. 411-412.
42. Guillard, E., et al., *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part II: effect of chains lengths and head group structures*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **399**(3): p. 1201-13.
43. Tfayli, A., et al., *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **397**(3): p. 1281-96.
44. Naziri, E., R. Consonni, and M.Z. Tsimidou, *Squalene oxidation products: Monitoring the formation, characterisation and pro-oxidant activity*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014. **116**(10): p. 1400-1411.
45. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts. 3rd ed By George Socrates (The University of West London, Middlesex, U.K.). J. Wiley and Sons: Chichester. 2001. xviii + 348 pp. \$185.00. ISBN: 0-471-85298-8*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(8): p. 1830-1830.

46. Yeo, H.C. and T. Shibamoto, *Formation of formaldehyde and malonaldehyde by photooxidation of squalene*. (0024-4201 (Print)).
47. Dennis KJ Fau - Shibamoto, T. and T. Shibamoto, *Production of malonaldehyde from squalene, a major skin surface lipid, during UV-irradiation*. (0031-8655 (Print)).
48. Assi, A., et al., *Characterization of free fatty acids photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman study*. Journal of Raman Spectroscopy, 2022. **n/a**(n/a).
49. Czamara, K., et al., *Raman spectroscopy of lipids: a review*. Journal of Raman Spectroscopy, 2015. **46**(1): p. 4-20.
50. Gupta, U., et al., *Spectroscopic Studies of Cholesterol: Fourier Transform Infra-Red and Vibrational Frequency Analysis*. Materials Focus, 2014. **3**(3): p. 211-217.
51. Medina, M.E., A. Galano, and Á. Trigos, *Theoretical study on the oxidative damage to cholesterol induced by peroxy radicals*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2015. **28**(7): p. 504-508.
52. Brown, A.J. and W. Jessup, *Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis*. Molecular Aspects of Medicine, 2009. **30**(3): p. 111-122.
53. Kulig, W., et al., *Cholesterol oxidation products and their biological importance*. (1873-2941 (Electronic)).
54. Iuliano, L., *Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms*. (1873-2941 (Electronic)).
55. Rael, L., et al., *Lipid Peroxidation and the Thiobarbituric Acid Assay: Standardization of the Assay When Using Saturated and Unsaturated Fatty Acids*. Journal of biochemistry and molecular biology, 2004. **37**: p. 749-52.
56. Singh, G., et al., *Structure and vibrational spectroscopic study of alpha-tocopherol*. Journal of Molecular Structure, 2017. **1144**: p. 347-354.
57. Cai, T., et al., *A Combined Normal Raman, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), and Theoretical Calculation (DFT and PED) Study of Alpha-Tocopherol*. Applied Spectroscopy, 2012. **66**: p. 114 - 121.
58. Kamal-Eldin, A. and D.B. Min, *Lipid oxidation pathways*. 2003.
59. YU, W., L. YANG, and Z.L. LIU, *Photooxidation of α -Tocopherol in Micelles. A New Singlet Oxygen Oxidation Product*. Chinese Chemical Letters, 2022. **9**(9): p. 823-826.
60. Kramer, K.A. and D.C. Liebler, *UVB induced photooxidation of vitamin E*. (0893-228X (Print)).
61. Ekanayake-Mudiyanselage, S., et al., *Vitamin E delivery to human skin by a rinse-off product: penetration of alpha-tocopherol versus wash-out effects of skin surface lipids*. (1660-5527 (Print)).
62. Pekiner, B.D. *VITAMIN E AS AN ANTIOXIDANT : E VİTAMİNİNİN ANTIÖKSİDAN ROLÜ*. 2003.
63. Grams, G.W., *Oxidation of alpha-tocopherol by singlet oxygen*. Tetrahedron Letters, 1971. **12**(50): p. 4823-4825.
64. De Vaugelade, S., et al., *UV-vis degradation of α -tocopherol in a model system and in a cosmetic emulsion—Structural elucidation of photoproducts and toxicological consequences*. Journal of Chromatography A, 2017. **1517**: p. 126-133.
65. Tang, C., et al., *Identification of α -Tocopherol and Its Oxidation Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020. **68**(2): p. 669-677.
66. Assi, A., et al., *Characterization of free fatty acids photo-oxidation under UV radiations: A stepwise Raman study*. Journal of Raman Spectroscopy, 2022. **n/a**(n/a).

Chapitre 2 : Effets des rayonnements solaires sur l'hydratation du *Stratum Corneum* : Rôle protecteur des lipides cutanés de surface et efficacité des filtres solaires

L'hydratation de la peau joue un rôle important dans les propriétés physiques optimales et les fonctions physiologiques de la peau.

La peau assure plusieurs fonctions physiologiques telles qu'une barrière protectrice contre la perte d'eau et les stress environnementaux, y compris les rayonnements solaires. Le *Stratum Corneum*, la couche la plus superficielle de la peau, constitue le principal élément dans l'assurance de la fonction barrière. Avec ses constituants cellulaires et extracellulaires, il représente une membrane limitant les échanges moléculaires dans les deux sens. Ses particularités limitent le passage transcutané des produits exogènes. La perte d'eau physiologique est aussi limitée permettant le contrôle de l'hydratation.

Le maintien du taux de l'eau au niveau du SC est assuré principalement par le ciment lipidique extracellulaire du SC, ainsi que les agents NMF qui sont des molécules hygroscopiques capables d'absorber les molécules d'eau.

Les LCS participent également à la fonction barrière et représentent un modulateur important des fonctions cutanées, notamment dans l'hydratation des SC.

Un équilibre entre ces fonctions permet de maintenir une hydratation équilibrée du SC. Toutefois, une modification de cet équilibre peut conduire à une peau sèche, qui peut donner lieu à diverses infections, allergies et eczémas.

La déshydratation peut apparaître dans le cas où la fonction barrière est altérée suite à des agressions exogènes telles que les rayonnements solaires qui engendrent la photo-oxydation des lipides et la perturbation du processus naturel d'hydratation de la peau.

Comme indiqué précédemment, les Lipides Cutanés de Surface (LCS) sont l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement. Ils constituent la première ligne de défense contre les rayonnements solaires ainsi ils permettent de protéger la fonction barrière cutanée au niveau du SC.

Cependant, cette fonction protectrice peut être limitée, elle n'est pas homogène sur la surface du corps et elle est variable selon les individus. Il est donc important d'ajouter une protection supplémentaire qui préserve l'intégrité de la peau et l'équilibre du système des LCS par l'application des filtres solaires.

Ainsi, il existe plusieurs façons de protéger la peau des rayonnements solaires. La principale recommandation est d'appliquer un écran solaire. En fait, leur structure chimique réduit les effets nocifs des rayonnements solaires en absorbant, diffusant ou réfléchissant le rayonnement ultraviolet (UV) et la lumière visible.

Cette étude est divisée en deux parties :

- La première partie consiste à étudier l'effet des rayonnements solaires sur l'hydratation du SC et également à évaluer le rôle protecteur des LCS contre les rayonnements solaires.
- La deuxième partie concerne l'évaluation de la limite de protection des lipides cutanés de surface et investigation de l'action protectrice d'un filtre solaire à la fois sur la composition des LCS et également sur l'hydratation du SC.

Afin de réaliser ces objectifs, la spectroscopie Raman et la HT-GC/MS ont été utilisées.

Les résultats obtenus font l'objet de deux publications scientifiques à soumettre dans *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.

Article 4 : “ Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration:
part I, protective role of Skin surface lipids”

Contexte :

L'hydratation du SC (la couche la plus superficielle de l'épiderme) reflète la qualité de la fonction barrière cutanée et la capacité de cette fonction de maintenir l'homéostasie de l'eau dans l'épiderme vivant. Une forte exposition aux rayonnements solaires pourrait diminuer l'hydratation du SC et ainsi altérer la fonction barrière. Par ailleurs, les LCS participent à l'hydratation du SC et représentent un modulateur important des fonctions cutanées. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet des rayonnements solaires sur l'hydratation du SC et explorer le rôle protecteur des Lipides Cutanés de Surface.

Matériels & Méthodes :

Dans cette étude, nous avons proposé une nouvelle approche *ex vivo* pour évaluer l'impact des rayonnements solaires sur le SC. Elle est basée sur la cinétique d'hydratation et de déshydratation qui utilise la spectroscopie Raman en calculant le rapport vOH/vCH pour surveiller la teneur en eau relative dans l'ensemble du SC pendant le processus de séchage. La composition des LCS a été analysée par HT-GC/MS.

Résultats :

Nos résultats ont montré une altération du captage et de l'homéostasie de l'eau dans le SC après l'irradiation solaire. De plus, nous avons montré que les LCS confèrent une protection du mécanisme d'absorption d'eau et du processus de perte d'eau dans le SC

Conclusion :

Les LCS confèrent une protection contre les rayonnements solaires. Ce rôle protecteur des LCS est considéré comme un filtre optique qui absorbe une partie de l'énergie de la lumière solaire.

Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration: part I, protective role of Skin
surface lipids

Ali ASSI¹, Rime MICHAEL-JUBELI¹, Hélène DUPLAN², Arlette BAILLETGUFFROY¹, Carine JACQUES², Ali TFAYLI^{1*}

ali.assi@universite-paris-saclay.fr ; rime.michael-jubeli@universite-paris-saclay.fr ;
helene.duplan@pierre-fabre.com ; arlette.baillet-guffroy@universite-paris-saclay.fr ;
Carine.JACQUES@pierre-fabre.com ; ali.tfayli@universite-paris-saclay

1- Lip(Sys)², Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91400 Orsay, France.

2- Pierre Fabre Dermo-cosmétique, Centre R&D Pierre Fabre, Avenue Hubert Curien, Cedex 01, 31025 Toulouse, France

*Corresponding author:

ali.tfayli@universite-paris-saclay

Abstract

Skin is the largest organ of the body and plays several physiological functions such as a protective barrier against water loss and environmental stresses including solar radiations. In this study we propose a novel approach to evaluate *ex vivo* the impact of solar radiations on the SC. It is based on the *stratum corneum* (SC) hydration and the dehydration kinetics using Raman spectroscopy by calculating the $\nu\text{OH}/\nu\text{CH}$ ratio to monitor the relative water content in the whole SC during the drying process.

In addition to that, the role Skin surface lipids (SSLs) in the protection against solar radiations insults were studied. Skin surface lipids (SSLs) film is a mixture of sebum and residual lipids from SC desquamation that covers the surface of the skin. It is composed of a complex mixture of free fatty acids (FFAs) and other lipids that come from sebaceous secretion such as triglycerides, wax esters, and squalene, or from desquamation such as free and esterified cholesterols with FFAs. SSLs participate to the barrier function and represent an important modulator of cutaneous functions.

Our results showed an alteration in the water caption and water homeostasis within the SC after solar radiations. SSLs conferred a protection of the water uptake mechanism and water loss process of the SC. We have also shown that the protective role of SSLs against solar radiations is more as an optical filter by absorbing a part of the energy of the solar light either directly on the surface of the SC or on a slide (not in contact with the SC). This was confirmed by HT-GC/MS analyses that revealed a decrease of squalene, polyunsaturated fatty acids, and cholesterol after irradiating the SSLs.

Key words:

Stratum Corneum, Skin Surface lipids, Solar radiations, Hydration, HT-GC/MS

1. Introduction

The upper layer of the skin, the *stratum corneum* (SC) represents the main barrier against external chemical and biological aggressions and regulates water loss [1-5]. It is the body's first line of defense against environmental stresses such as solar radiations. 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 [6-8].

SC hydration has been widely studied to understand the phenomena influencing skin dryness disorders usually found in dermatology and in cosmetic applications [9]. It is well established that water plays an important role for maintaining a normal functioning of the skin and especially the SC [10]. In return, the latter is responsible for controlling the skin hydration by three different mechanisms: barrier function, water binding and water diffusion within the SC [9]. The organization and the lateral packing of SC lipids are essential to maintain the barrier function properties. A pure liquid crystal system or a solid system of SC lipids induces rapid water loss through the bilayer. Thus, to prevent water loss and to maintain an optimal barrier function, it is necessary to maintain the balance between these two phases [11, 12]. In addition, the presence of natural moisturizing factors (NMFs) which are hygroscopic molecules helps water absorption and binding [9].

A balance between these mechanisms maintains equilibrated SC hydration. However, changes in this balance may lead to a dermatologic condition known as "dry skin" which may give rise to various infections, allergies, and eczemas [13].

Although they can have beneficial effects such as by stimulating the production of vitamin D [14], solar irradiation effect on human health depends on the amount and type of radiations that reaches the body [15]. They can result in the formation of free radicals and contribute in the deterioration of epidermal and dermal structures inducing photoaging or, in extreme cases, skin cancer [16].

On the SC, UV solar radiations are among the external insults that alter the skin barrier. *In-vivo* studies showed their impact on the decrease of carotenoids [1, 17-21] and the isomerization of the Urocanic acid (UCA) from its *trans* form to its *cis* form [22, 23]. Other studies highlighted the thickening of the SC [24]. Finally, the increase of the transepidermal

water loss was commonly highlighted [25-29], indicating an altered barrier against water loss and thus a deterioration in the water homeostasis and water holding capacities may be suggested.

Contrary to *in vivo* observations, the effect of UV irradiations on the barrier function of excised SC sheets is only observable when using very high doses. Biniek et. al [30] applied $\sim 160 \text{ J/cm}^2$ of UV_B and showed a decrease in the CH₂ symmetric and asymmetric stretching on the infrared spectra of the irradiated samples indicating a decrease in the barrier function. The applied doses are over 5000 times higher than Minimal Erythema Dose (MED). It is thus important to highlight the effect of regularly used UV doses on SC.

In the current study, we firstly proposed a new approach to evaluate the effect of solar radiations on the SC. It is based on the SC water homeostasis, in particular the water caption and dehydration kinetics. *Ex vivo* measurements were performed on isolated SC using Raman microspectroscopy. The global water content was evaluated using the AUC of the OH stretching band ($3100\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$). The $\nu\text{OH}/\nu\text{CH}$ ratio was calculated in order to follow-up the drying process and to monitor the relative water content in the whole SC. The AUC of CH stretching band was measured in the range of $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ [31-33].

Even though the barrier property of skin is localized in the SC, the hydrolipidic film participates to this barrier function [12, 34-37]. It is composed of sweat and skin surface lipids (SSLs). SSLs are composed of a complex of lipids that come either from sebaceous secretion such as triglycerides, wax esters, and squalene, from desquamation such as free and esterified cholesterols, or from both, like free fatty acids (FFAs) [38-41]. In addition, triglycerides are partially hydrolyzed, producing FFAs, diglycerides, monoglycerides, and glycerol under the effect of lipase-producing microorganisms of human skin flora [42-44]. Moreover, antioxidants like vitamin E can be found within the hydrolipidic film [35, 45-47].

In a second time, we explored the role of skin surface lipids in the protection of water homeostasis in the SC against solar radiations. SSLs films were added directly at the surface of the SC before irradiation or deposited on a CaF₂ slide. For the latter, the irradiation was performed through the SSLs layer on the slide.

Finally, to understand the effect of solar radiations on skin surface lipids (SSLs), high temperature gas chromatography-mass spectrometry (HTGC-MS) analyses were performed

on control and irradiated SSLs with different doses. HT-GC/MS is a widely used method for analyzing complex mixtures and is well adapted for a comprehensive study of SSLs [47, 48].

2. Materials and Methods

a. Stratum corneum samples preparation

The SC layers were prepared from human abdominal skin using a method described previously [9]. 3 SC samples from 3 different donors were used for each experiment condition. 3 repetitions per condition were performed to monitor the water desorption kinetics of hydrated SC.

To study the impact of UV solar radiations on the hydration properties of the SC and to evaluate the protective role of SSLs against these radiations, 5 experimental conditions were prepared as follow:

| | | |
|---|---|--------------|
| 1 | SC non-coated with SSLs and non-irradiated | Ctrl-SC |
| 2 | SC non-coated with SSLs and irradiated | Irr-SC |
| 3 | SC coated with SSLs and non-irradiated | Ctrl SC+SSLs |
| 4 | SC coated with SSLs and irradiated | Irr-SC+SSLs |
| 5 | SC irradiated through SSLs placed on CaF2 slide | SC-Irr-SSLs |

Table 1: prepared experimental conditions

b. Skin surface lipids preparation

SSLs were provided from the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics (PFDC, Toulouse, France) and obtained from the forehead zone of healthy volunteers.

For Raman measurements, 250 μL of SSL were diluted in physiological serum to obtain a concentration of 2 mg/mL. For SC coated with SSLs experiments, 2.5 μL were spread on the surface of the SC.

For HTGC/MS analyses, 250 μL of this solution was prepared in chloroform. SSLs were derivatized in prior by trimethylsilylation. This reagent consisted of BSTFA/pyridine, 50:50 (v/v). SSLs were trimethylsilylated at room temperature for 30 min with 200 μl of reagent. The excess reagent was then removed under nitrogen flow, and the dried residue was dissolved in 250 μl of Chloroform.

a. Solar irradiation of SC and SSLs

SC were irradiated 15 min using a solar simulator 16S-300 from solar light company which produces a spectrum close to the solar spectrum. The power used for the irradiation was 0.45 W/cm². This power was measured using a pyranometer (Glenside, USA).

Likewise, the natural skin surface lipids SSLs were irradiated at different time using the same solar simulator with the same power. Table 2 shows the different energies used during the irradiation process for both SC and SSLs.

| | | | |
|--|--------|---------|----------|
| Time (min) | 15 | 180 | 360 |
| Sample | SC | SSLs | SSLs |
| Analyses | Raman | GC/MS | GC/MS |
| E (J/cm ²), Total solar spectrum | 405 | 4860 | 9720 |
| E (J/cm ²), total UV radiations | 8.55 | 102.6 | 205.2 |
| E (J/cm ²), UV _B radiations | 1.35 | 16.2 | 32.4 |
| E (J/cm ²), UV _A radiations | 7.2 | 86.4 | 172.8 |
| Minimal erythemal dose | 45 MED | 540 MED | 1080 MED |

Table 2: The different doses applied to skin surface lipids during irradiation in J/cm²

b. High temperature gas chromatography-mass spectrometry (HTGC-MS):

A Thermo Scientific (Austin, TX) gas chromatography unit (Trace GC Ultra) equipped with an on-column injector was coupled to a quadrupole DSQII mass spectrometer via a high-temperature interface. The separation was achieved using a 30 m × 0.32 mm ZB-5HT capillary column (Phenomenex, Torrance, CA) coated with 0.1 μm of 5% diphenyl/95% dimethylpolysiloxane, connected to a 5 m 0.32 mm HT-deactivated tubing guard column.

Helium was used as a carrier gas at a constant flow of 2 mL/min. The injector and transfer line temperatures were set to 60°C and 350°C, respectively. The oven temperature was programmed from 60°C to 240°C at 5°C/min; 240°C to 320°C at 2.5°C/min; and 320°C to 350°C

at 1°C/min. The operating conditions for electronic impact mass spectrometry (EI-MS) were source temperature at 220°C, ionizing energy at 70 eV, and scan range from m/z 45 to 1,000 with a period of 1 s. EI mass spectra were recorded in the total ion current (TIC) monitoring mode.

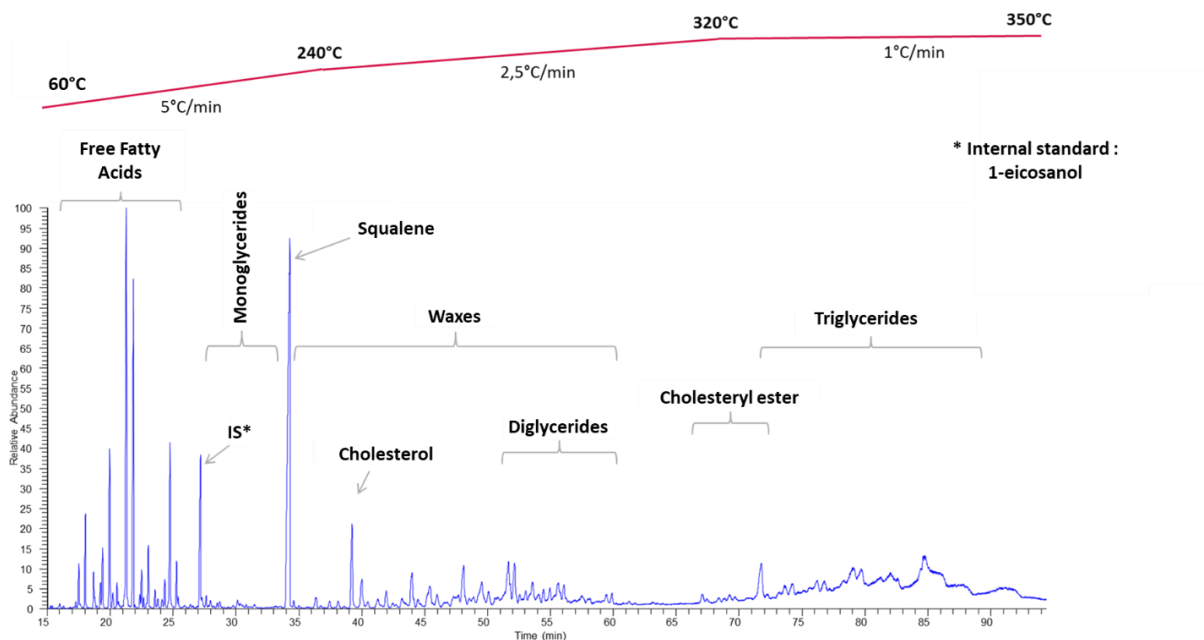


Figure 1: HTGC-MS profile of a trimethylsilylated SSL sample.

c. Raman microspectrometer:

A confocal Raman microspectrometer LabRam HR Evolution (Horiba Scientific, Lille, France) was used for spectral acquisition. A video image of the sample was used for accurate positioning of the laser spot on the sample. A 633 nm He:Ne laser (Toptica Photonics, Munich, Germany), was used. A long focal 100X objective/ NA= 0.9 (Olympus, Tokyo, Japan) was used to focus the laser light on the surface of the sample and to collect the back scattered light. The confocal pinhole was set to 200 μm . The penetration depth was from -10 to 30 μm with a step size of 2 μm repeated 21 times.

The collected light was filtered through an edge filter and dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution using a 300 μm slit and a holographic grating of 300 grooves/mm. The Raman Stokes signal was recorded with a Synapse Charge-Coupled Device detector: CCD camera (Andor Technology, Belfast, UK) containing 1024 x 256 pixels. Spectral acquisition was performed using Labspec 6 software (Horiba Scientific, Lille, France). Raman measurements were performed on each depth in the 400–3800 cm^{-1} spectral range. For each scan, a 5 sec

exposure time with 2 accumulations was used. All spectra were smoothed using Savitzsky-Golay algorithm and baseline corrected using an automatic polynomial function.

d. Raman Spectroscopy of SC Water Loss

Raman spectroscopy was performed on SC samples equilibrated at high humidity (~100% RH) and then placed in a dry environment to study water desorption. A humidity-controlled chamber, based on an airflow principle, was built around the microscope. A hygrometer/thermometer (with $\pm 2\%$ accuracy) was used to measure relative humidity. The humidity was set to 10 % RH. To obtain the desired relative humidity a dry airflow was used in the chamber with a flow rate of 3 L/min [49].

The water desorption analysis was carried out on isolated SC settled onto CaF₂ slides. As the SC is fixed on a glass slide, desorption occurs only from one side of the SC, similar to *in vivo* drying [31-33]. Water desorption kinetics of hydrated SC samples in a dry environment were studied.

Raman profiles acquisitions were performed on SC from -10 μm (before the SC surface) to 30 μm under the surface repeated 21 times (from the beginning of the drying process (t_0) to 4.25 hours) of dehydration).

To follow-up the drying process and to monitor the relative water content in the whole SC, vOH/vCH ratio was calculated from each spectrum in the spectral profiles. The global relative content for each spectral profile was obtained from its AUC between 0 and 12 μm (limits of the SC). A unique value is thus obtained for each in-depth profile.

Water desorption kinetics were repeated 3 times for each experimental condition. The final dehydration profile kinetic can be represented as the plot of the mean \pm standard error values against time (Figure 01).

e. Statistical analyses:

Analysis of variance (ANOVA) is one of the most widely used tests for experimental data. It is a powerful method to compare differences between the means of several groups. The test compares the variability of each population (intra-group variances) and that of grouped populations (inter-group variance) and thus determines whether the groups are significantly different. A pairwise comparison based on Bonferroni test was performed. For each

experimental condition, the average results of the measurements on SC were presented as mean \pm standard deviation.

Results and discussion

c. Characterization of dehydration kinetics

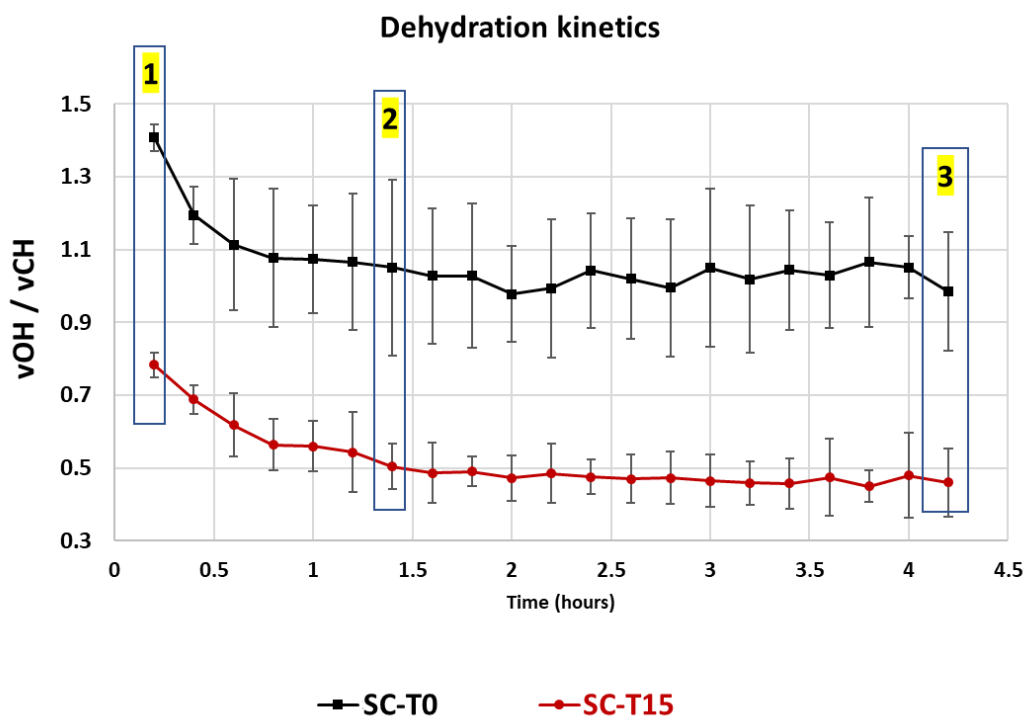


Figure 1: variation of the global water content in the SC during a drying process. mean \pm standard error values of vOH/vCH ratios are plotted against time.

As described in the material and methods, “Raman spectroscopy of SC water loss” paragraph, the global water is represented in Y-axis by plotting the ratio between OH stretching band (water) and CH stretching band (lipids and proteins). The X axis represents the time.

Different information can be obtained from the drying profiles *i.e.*:

- 1- The **water caption (WC)** capacity can be obtained after 24 hours of SC stabilization at 100 % relative humidity. WC can be obtained when data is registered directly after the 100 % RH stabilization. This corresponds to the point at the beginning of the drying process (flag n°1).

- 2- The **water retention (WR)** capacity represents the remaining water after 1.5 hours of the beginning of the drying process. This delay corresponds to the end of the sharp decrease in water content (flag n°2).
- 3- The **water desorption (WD%)** percentage can be obtained by calculating the ratio: $(WC-WR)/WC * 100$. Low values indicate good resistance to water desorption while an increase is associated to an alteration in the barrier properties against water loss.
- 4- The **long-term water holding (LTWH)** capacity represents the water ratio observed at the end of the drying process (flag n°3).
- 5- The **global water loss (GWL%)** percentage is obtained by calculating the ratio: $(WC-LTWH)/WC * 100$. Low GWL% values are correlated to good water holding capacities.

In order to evaluate the effect of solar radiations on dehydration kinetics (Irr-SC) and the impact of adding SSLs at the surface of the SC (Ctrl SC+SSLs and Irr-SC+SSLs) or irradiation through a SSLs layer; (SC-Irr-SSLs) water caption (WC), water retention (WR) and long-term water holding (LTWH) of all drying kinetics profiles are plotted in figure 02.A for WC, 02.B for WR and 02.C for LTWH.

Table 03 displays the water desorption percentage (WD%) and the global water loss (GWL%).

| | Ctrl-SC | Irr-SC | Ctrl SC+SSLs | Irr-SC+SSLs | SC-Irr-SSLs |
|---------------------------------|----------------|---------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Water Desorption (WD%) | 26 % | 36 % | 26 % | 26 % | 29 % |
| Global water loss (GWL%) | 30 % | 42 % | 31 % | 28 % | 27 % |

Table 03: Water desorption and global water loss percentages

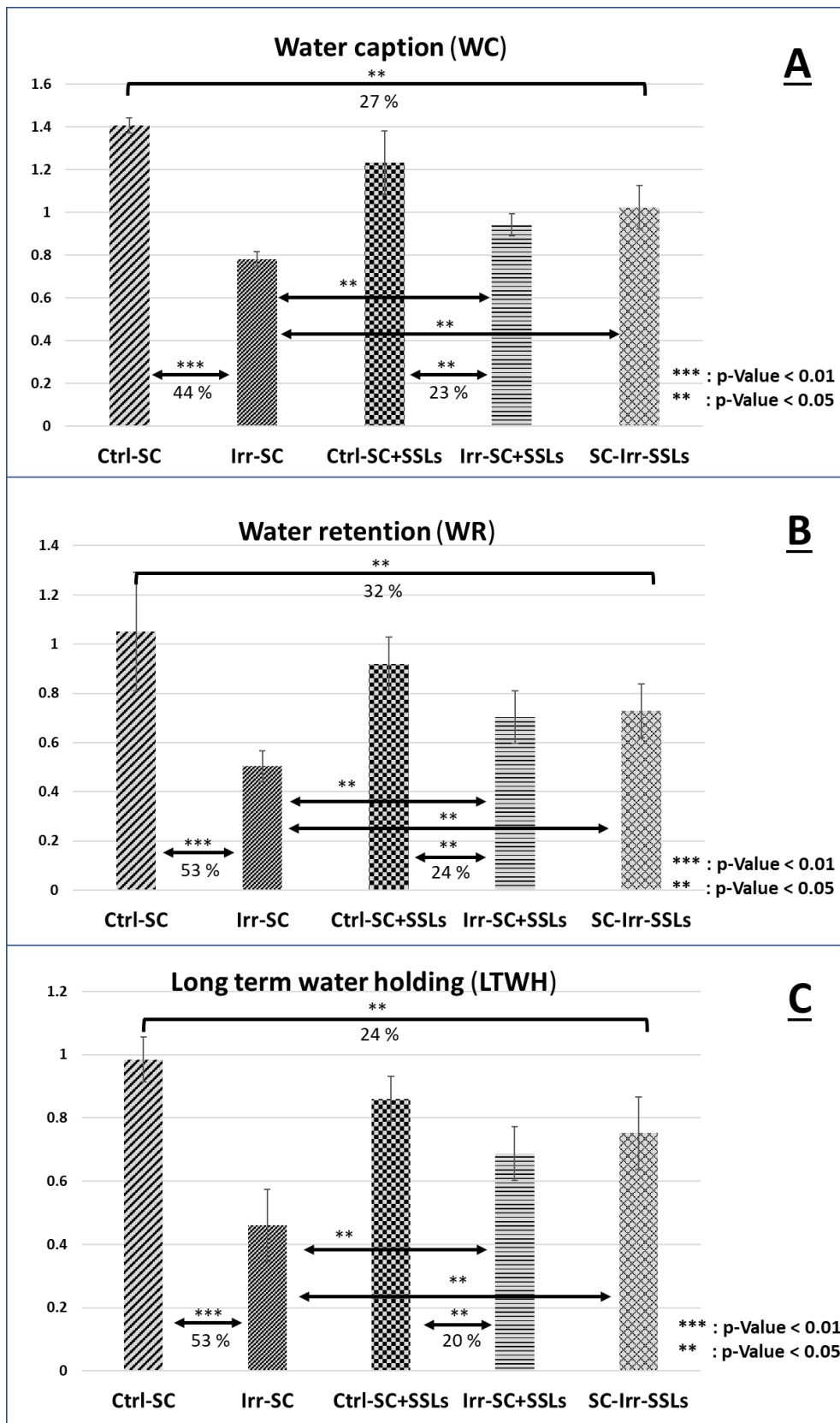


Figure 2: A: Water caption (WC), B: Water retention (WR) and C: Long term water holding (LTWH)

d. solar radiations alter hydration properties of SC:

After solar radiations (405 J/cm^2), the hydration properties of the SC were significantly altered. Water caption capacity (figure 02.A) decreased of almost 44% when irradiated SC (Irr-SC) is compared to control (Ctrl-SC).

The same observations were obtained for water retention (WR) with a decrease of almost 53% (figure 02.B) and long-term water holding (LTWH) with a 54% decrease (figure 2.C).

In addition to the information directly related to water content, relative values informed about the state of the SC barrier against water loss, *i.e.*, water desorption (WD%) showed a 36% loss of water content after 1.5 hours for Irr-SC against only 26 % for Ctrl-SC (table 03).

Global water loss (GWL%) observed after 4.2 hours was 42 % for Irr-SC and 39 % for Ctrl-SC (table 03).

These values indicate that the final relative water loss after 4.2 hours of equilibration at 10%RH results in close GWL% values between control and irradiated SC. Meanwhile, a major part of the relative water loss is observed at the first part of the drying process for Irr-SC (WD%) compared to control.

It is important to note that the absolute water content remained higher for control SC all over the hydration and drying experiment.

The spectral deconvolution of the OH stretching band showed a marked decrease in the relative amount of tightly bound water (p -value 0.01) compared to partially bound and unbound water (data not shown). This observation may be related to modifications in the molecular sites presenting Hydrogen bonding possibilities *e.g.*, proteins and polar heads of lipids. The analyses of Raman features related to proteins secondary structures showed a non-significant increase in the ratio between random coils on one hand and alpha helices and beta sheets on the other hand. No significant modifications were observed spectral descriptors of the SC lipids conformational order and lateral packing, (Data not shown).

In their work on the effect of UV_B radiations on the barrier function and the mechanical integrity of the SC, Biniek et. al [30] applied $\sim 160 \text{ J/cm}^2$ of UV_B and showed a decrease in the CH₂ symmetric and asymmetric stretching on the infrared spectra of the irradiated samples

indicating a decrease in the barrier function. The applied doses are ~118 times higher compared to the doses applied in the current study.

Even though the applied dose in our study does not induce detectable changes in the Raman spectra, its impact on the alteration of the water caption and the dehydration kinetics is clearly observed. These observations are in concordance with different *in vivo* clinical evaluation showing an increase of the transepidermal water loss TEWL after UV radiation indicating an altered barrier against water loss and thus a deterioration in the water homeostasis and water holding capacities [25-29].

e. Skin surface lipids play a protective role against Solar radiations impact on water kinetics in SC

In order to study the effect of SSLs on SC hydration/dehydration process with and without irradiation, two experimental set-ups were explored as described in the material and methods part:

- SSLs directly applied on the surface of the SC and equilibrated at 100 % RH without irradiation (Ctrl SC+SSLs) and with irradiation (Irr-SC+SSLs).
- SSLs applied on a CaF₂ slide. SC was equilibrated at 100 % RH and then irradiated through the SSLs film (SC-Irr-SSLs).

For Ctrl SC+SSLs and Irr-SC+SSLs, a first concern was the water uptake. As the SSLs forms a continuous lipid layer at the surface of the SC and, contrary to *in vivo*, the water uptake in our experimental set-up is from the 100 % RH atmosphere.

Water caption (WC) values for both SSLs coated and uncoated controls, Ctrl SC+SSLs and Ctrl-SC respectively showed no significant difference (figure 02.A) despite of a tendency of decrease with Ctrl SC+SSLs.

After irradiation, water caption of SC-Irr-SSLs showed a 27 % decrease compared to control and WC of Irr- SC-SSLs decreased around 23 %. The decrease values are significantly lower (P-value <0.05) compared to irradiated non-protected SC (Irr-SC). Adding SSLs seems to have a role in the protection of the water caption properties of the SC.

For water retention (WR) values, Irr-SC+SSLs showed a 24 % decrease while SC-Irr-SSLs presented 32 % decrease compared to control. For long term water holding (LTWH), Irr-

SC+SSLs showed a decrease of 20 % and SC-Irr-SSLs 24 %. All values are significantly lower than the 53% and 54 % observed with Irr-SC (P-value < 0.05) for water retention (WR) and long-term water holding (LTWH) respectively.

The presence of SSLs either directly on the surface of the SC or on a slide (not in contact with the SC) seems to play a protective layer against the alteration of the hydration and drying process of the SC.

Water desorption percentage (WD%) showed no significant variations between Ctrl-SC, Ctrl SC+SSLs and Irr-SC+SSLs with a WD% of 26 % while for SC-Irr-SSLs the WD% was only 29 % showing a good preservation of the barrier function in presence of SSLs.

Finally, the global water loss (GWL%) showed slightly lower values in presence of SSLs with 31 % for Ctrl SC+SSLs, 28 % for Irr-SC+SSLs and 27 % for SC-Irr-SSLs compared to Ctrl-SC with a GWL% of 30 %. This confirms the preservation of the SC barrier function against water loss in presence of skin surface lipids.

All observations for WC, WR, LTWH, WD% and GWL% confirm that the presence of skin surface lipids confers a protection of the water uptake mechanism and water loss process of the SC. Given that similar results were obtained from Irr-SC+SSLs (skin surface lipids in contact with the SC) and SC-Irr-SSLs (skin surface lipids applied on a separate slide); one can conclude that, *i*, the protective role of SSLs against solar radiations is more likely to be as an optical filter by absorbing a part of the energy of the solar light. *ii*, irradiation through SSLs applied on transparent slides can be used to avoid direct application on SC.

f. solar radiations modify skin surface lipids composition

To confirm the solar light absorption by the skin surface lipids (SSLs) and to understand how they participate to the protection of the skin against solar radiations impact, SSLs were submitted to different doses and lipids composition was analyzed using HT-GC/MS.

Covering the surface of the SC, the hydrolipidic film is first-line targets of solar radiations [50]. In addition of Vitamin E, that was identified as the first and the predominant anti-oxidant, squalene (Sq), cholesterol (Chol) and fatty acids (FFA) are also known as targets of solar radiations in the SSLs complex [50].

Squalene is the most abundant oxidizable component of SSLs. It is suggested to be the initial target of skin lipid oxidation. It is a linear polyunsaturated triterpene that contains six double bonds [51-53].

The integrated peak areas of squalene, cholesterol, cholesterol esters, fatty acids, FA 18:2, waxes and triglycerides obtained from HTGC/MS are presented in figure 3.

A marked decrease of squalene after 3 hours of irradiation (4860 J/cm²) and a significant decrease (P-value = 0.008) after 6 hours of irradiation (9720 J/cm²) were observed (Fig. 3.A). These results are in concordance with results found in previous studies, the degradation of squalene after irradiation [46, 50, 54].

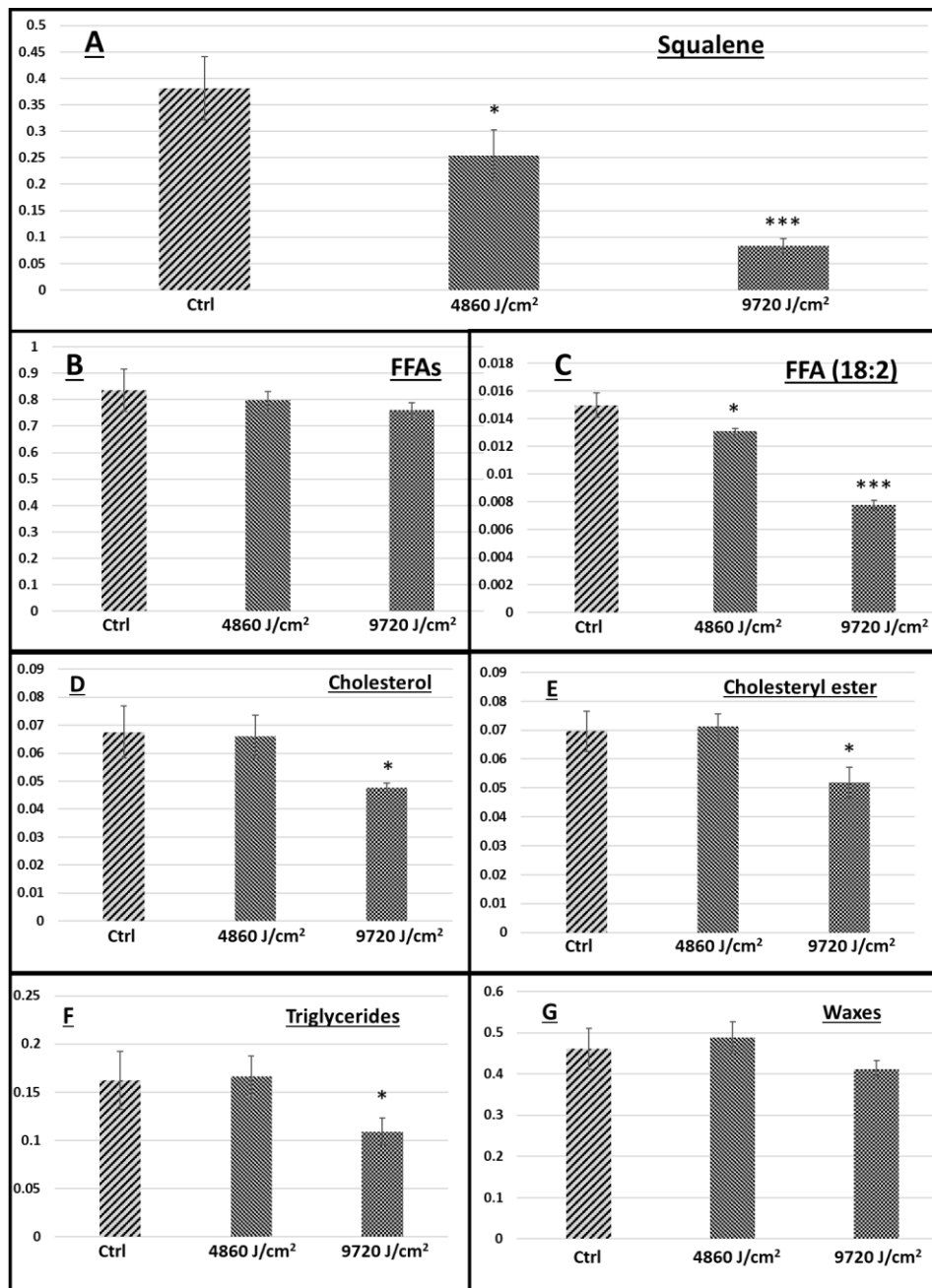
Regarding fatty acids, the polyunsaturated fatty acids (PUFA) that contain two or more double bonds, are more prone to lipid oxidation. No significant variation was observed after 3 or 6 hours of irradiation on the whole class of fatty acids (Fig. 3.B). However, the linoleic acid which contains 2 double bonds (C18:2) showed the same variation as squalene. Marked and significant decreases were observed after 3 and 6 hours of irradiation respectively (Fig. 3.C).

Cholesterol has shown the same tendency as squalene and polyunsaturated fatty acid with a lower variation after 3 and 6 hours (Fig. 3.D).

These results are in concordance with previous studies that showed that squalene is markedly degraded as compared to cholesterol, triglycerides, or free fatty acids (FFAs) after solar irradiation of SSLs [55, 56].

For esterified lipid classes (Triglycerides, Waxes and Cholesteryl ester), no significant variations were observed after 3 and 6 hours of irradiation. This can be due to the stability of the ester function (Fig. 4).

Thus, squalene and polyunsaturated fatty acids are the most important ones that play an antioxidant role and protect the skin. Thus, SSLs play a protective role for the skin barrier through the synergy of two aspects, the antioxidant aspect of squalene and polyunsaturated fatty acids which constitute 10 to 20 % of SSLs and the stability aspect against solar radiations by the majority of classes.



* p-value < 10%, ** p-value < 5%, *** p-value < 1 %

Figure 3: Impact of solar radiations on SSLs lipid classes.

Conclusion

In this work, we developed a novel approach to evaluate the effect of regular solar radiations on SC and the protective action of applied molecules. It is based on SC hydration and dehydration kinetics using Raman spectroscopy. Different markers were suggested to characterize the water homeostasis, *i.e.*, the **water caption (WC)** which is the capacity of SC to capture water from highly hydrated atmosphere; the **water retention (WR)** which represents the remaining water after 1.5 hours of the beginning of the drying process; the **water desorption (WD%)** percentage which is an indicator of the water loss rate; and finally, the **long-term water holding (LTWH)** capacity and the **global water loss (GWL%)** percentage which represent the long term water holding capacities of the SC.

The first part of the study showed that solar radiations alter all hydration cycle parameters indicating an alteration of water caption sites as well the water retention and holding capacities.

In addition to that, this work shows that the presence of SSLs confers a protection of the water uptake mechanism and water loss process of the SC.

Either directly applied on the surface of the SC or put on a slide (not in contact with the SC), the SSLs seem to play the same protective role against the alteration of the hydration and drying process of the SC. Thus, the protective role of SSLs against solar radiations is more as an optical filter by absorbing a part of the energy of the solar light. In addition, and to confirm the solar light absorption by the skin surface lipids (SSLs), a significant decrease was observed of squalene and polyunsaturated fatty acids after irradiating the SSLs and analyzing it in HT-GC/MS. However, cholesterol has the same tendency as squalene and polyunsaturated fatty acid with a lower variation and for the esterified lipid classes (Triglycerides, Waxes and Cholesteryl ester), no significant variations were observed due to the stability of their ester function.

Finally, SSLs play an important protective role for the skin barrier through the synergy of two aspects, the antioxidant aspect of squalene and polyunsaturated fatty acids which constitute 10 to 20 % of SSLs and the stability aspect against solar irradiation by most other classes.

In the second part of this study, the protective effect of sunscreen formulations in the preservation of water homeostasis in the SC and their possible synergic action with SSLs will be explored.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics for the financial support of this work.

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

References

1. Nicolaou, A., S.M. Pilkington, and L.E. Rhodes, *Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids*. Chem Phys Lipids, 2011. **164**(6): p. 535-43.
2. Natarajan, V.T., et al., *Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(7): p. 542-51.
3. Breiden, B., et al., *Optimization of submerged keratinocyte cultures for the synthesis of barrier ceramides*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(11-12): p. 657-73.
4. Franzke, C.W., et al., *Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1105-19.
5. van Drongelen, V., 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): p. 807-12.
6. Sahle, F.F., et al., *Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy*. Skin Pharmacol Physiol, 2015. **28**(1): p. 42-55.
7. van Smeden, J. and J.A. Bouwstra, *Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients*. Current Problems in Dermatology, 2016. **49**: p. 8-26.
8. Mlitz, V., 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): p. 983-90.
9. Vyumvuhore, R., et al., *Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis*. Analyst, 2013. **138**(14): p. 4103-4111.
10. Sylvie, E., *Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (Trachurus trachurus) : choix des procédés*. 2003.
11. Rhein, L.D., et al., *Development of a Stratum-Corneum Lipid Model to Study the Cutaneous Moisture Barrier Properties*. Colloids and Surfaces, 1990. **48**(1-3): p. 1-11.
12. Fluhr, J.W., R. Darlenski, and C. Surber, *Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions*. British Journal of Dermatology, 2008. **159**(1): p. 23-34.
13. Sator, P.G., J.B. Schmidt, and H. Honigsmann, *Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(3): p. 352-8.
14. Berkey, C., et al., *Role of sunscreen formulation and photostability to protect the biomechanical barrier function of skin*. (2405-5808 (Electronic)).
15. Lucas, R., et al., *Solar ultraviolet radiation : global burden of disease from solar ultraviolet radiation / Robyn Lucas ... [et al.] ; editors, Annette Prüss-Üstün ... [et al.]*. 2006, World Health Organization: Geneva.
16. Assi, A., et al., *Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy*. Eur J Dermatol, 2022.
17. Darwin, M.E., et al., *In vivo Raman spectroscopic analysis of the influence of UV radiation on carotenoid antioxidant substance degradation of the human skin*. Laser Physics, 2006. **16**(5): p. 833-837.
18. Gonzaga, E.R., *Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer: importance of photoprotection*. (1179-1888 (Electronic)).
19. Villaret, A., et al., *Raman characterization of human skin aging*. Skin Research and Technology, 2019. **25**(3): p. 270-276.
20. Scharffetter-Kochanek, K., et al., *Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms*. (0531-5565 (Print)).

21. Lademann, J., et al., *Interaction between carotenoids and free radicals in human skin*. (1660-5535 (Electronic)).
22. Tosato, M.G., et al., *Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015. **153**: p. 51-58.
23. Egawa, M. and H. Iwaki, *In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy*. Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI), 2008. **14**(4): p. 410-7.
24. Gambichler, T., et al., *UVA1 and UVB irradiated skin investigated by optical coherence tomography in vivo: a preliminary study*. (0307-6938 (Print)).
25. Meguro, S., et al., *Stratum corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin*. (0031-8655 (Print)).
26. Gélis, C., et al., *Modifications of in vitro skin penetration under solar irradiation: evaluation on flow-through diffusion cells*. (0031-8655 (Print)).
27. Takagi, Y., et al., *Decreased levels of covalently bound ceramide are associated with ultraviolet B-induced perturbation of the skin barrier*. (0022-202X (Print)).
28. Yoon, S.H., et al., *In vivo Change of Keratin-Bound Molecules in the Human Stratum Corneum following Exposure to Ultraviolet Radiation*. (1660-5535 (Electronic)).
29. Mac-Mary, S., et al., *Assessment of cumulative exposure to UVA through the study of asymmetrical facial skin aging*. Clinical interventions in aging, 2010. **5**: p. 277-284.
30. Biniek, K., R.H. Levi K Fau - Dauskardt, and R.H. Dauskardt, *Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin*. (1091-6490 (Electronic)).
31. Vyumvuhore, R., et al., *Vibrational spectroscopy coupled to classical least square analysis, a new approach for determination of skin moisturizing agents' mechanisms*. (1600-0846 (Electronic)).
32. Biniek, K., et al., *Measurement of the biomechanical function and structure of ex vivo drying skin using raman spectral analysis and its modulation with emollient mixtures*. (1600-0625 (Electronic)).
33. Galliano, M.-F., et al., *Comprehensive characterization of the structure and properties of human stratum corneum relating to barrier function and skin hydration: modulation by a moisturizer formulation*. Experimental Dermatology, 2021. **30**(9): p. 1352-1357.
34. Mavon, A., et al., *Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1997. **8**(3): p. 147-155.
35. Thiele, J.J., S.U. Weber, and L. Packer, *Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1006-10.
36. Pilgram, G.S.K., et al., *The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2001. **1511**(2): p. 244-254.
37. Man, M.Q., et al., *Variation of Skin Surface pH, Sebum Content and Stratum Corneum Hydration with Age and Gender in a Large Chinese Population*. Skin Pharmacology and Physiology, 2009. **22**(4): p. 190-199.
38. Greene, R.S., et al., *Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid*. J Invest Dermatol, 1970. **54**(3): p. 240-7.
39. Downing, D.T., P.W. Wertz, and M.E. Stewart, *The role of sebum and epidermal lipids in the cosmetic properties of skin*. Int J Cosmet Sci, 1986. **8**(3): p. 115-23.
40. Saint-LÉGÉR, D. and J.L. LÉVÉQUE, *Les methodes d'évaluation quantitative des lipides de surface chez l'homme. Présentation d'une nouvelle procédure*. International Journal of Cosmetic Science, 1980. **2**(6): p. 283-294.

41. Vantrou, M., P.Y. Venencie, and J.C. Chaumeil, *Les lipides cutanés de surface chez l'homme: origine, synthèse, régulation; Skin surface lipids in man. Origin, biogenesis, regulation.* Annales de dermatologie et de vénéréologie, 1987. **114**(9): p. 1115-1129.
42. Pablo, G., et al., *Characteristics of the extracellular lipases from Corynebacterium acnes and Staphylococcus epidermidis.* J Invest Dermatol, 1974. **63**(2): p. 231-8.
43. Shalita, A.R., *Genesis of free fatty acids.* J Invest Dermatol, 1974. **62**(3): p. 332-5.
44. Nicolaides, N., *Skin lipids: their biochemical uniqueness.* Science, 1974. **186**(4158): p. 19-26.
45. Smith, K.R. and D.M. Thiboutot, *Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe?* J Lipid Res, 2008. **49**(2): p. 271-81.
46. Picardo, M., et al., *Sebaceous gland lipids.* Dermatoendocrinol, 2009. **1**(2): p. 68-71.
47. Michael-Jubeli, R., J. Bleton, and A. Baillet-Guffroy, *High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling.* J Lipid Res, 2011. **52**(1): p. 143-51.
48. Rigal, A., et al., *Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age.* LID - 10.1684/ejd.2020.3753 [doi]. (1952-4013 (Electronic)).
49. Tfayli, A., et al., *Hydration effects on the barrier function of stratum corneum lipids: Raman analysis of ceramides 2, III and 5.* Analyst, 2013. **138**(21): p. 6582-6588.
50. Ekanayake Mudiyansele, S., et al., *Ultraviolet a induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo.* (0022-202X (Print)).
51. Shimizu, N., et al., *Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers.* Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 9116.
52. Kostyuk, V., et al., *Photo-Oxidation Products of Skin Surface Squalene Mediate Metabolic and Inflammatory Responses to Solar UV in Human Keratinocytes.* PLOS ONE, 2012. **7**(8): p. e44472.
53. Niki, E., *Lipid oxidation in the skin.* Free Radical Research, 2015. **49**(7): p. 827-834.
54. Dennis KJ Fau - Shibamoto, T. and T. Shibamoto, *Production of malonaldehyde from squalene, a major skin surface lipid, during UV-irradiation.* (0031-8655 (Print)).
55. De Luca, C. and G. Valacchi, *Surface Lipids as Multifunctional Mediators of Skin Responses to Environmental Stimuli.* Mediators of Inflammation, 2010. **2010**: p. 321494.
56. Picardo, M., et al., *Role of skin surface lipids in UV-induced epidermal cell changes.* Archives of Dermatological Research, 1991. **283**(3): p. 191-197.

Article 5 : “Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration:

Part II, protective action of solar filters”

Contexte :

Dans l'article précédent, nous avons montré le rôle des LCS dans la protection du SC contre l'impact des rayonnements solaires. Cependant, cette fonction protectrice peut être limitée. Il est donc important d'apporter une protection supplémentaire par l'application des filtres solaires qui préserve l'intégrité de la peau et l'équilibre des LCS. L'objectif de cette étude est d'évaluer les limites de la protection des LCS contre les rayonnements solaires. Ensuite, d'évaluer l'action protectrice d'un filtre solaire à la fois sur la composition des LCS et sur la cinétique d'hydratation et de déshydratation de l'eau dans le SC.

Matériels & Méthodes :

Une nouvelle approche *ex vivo* pour évaluer l'impact des rayonnements solaires sur le SC a été proposée dans le cadre de l'étude précédente. Elle est basée sur le suivi la cinétique d'hydratation et de déshydratation à l'aide de la spectroscopie Raman. Le rapport des bandes ν_{OH}/ν_{CH} permet de surveiller la teneur en eau relative dans l'ensemble du SC pendant le processus de séchage. La composition des LCS a été analysée par HT-GC/MS.

Résultats :

Ce travail révèle que le rôle des LCS présente une limite dans la protection du SC contre les rayonnements solaires et qu'ils perdent leur rôle protecteur lorsque des doses plus élevées sont appliquées. Cependant, une protection significative a été observée lorsque le SC a été irradié à travers le filtre solaire.

Conclusion :

Cette étude a permis de démontrer qu'une protection complémentaire peut être offerte par les filtres solaires en plus de la protection naturelle apportée par les Lipides Cutanés de Surface (LCS). Cette protection complémentaire montre la nécessité d'utiliser des filtres solaires pour préserver l'intégrité de la barrière cutanée et l'équilibre des LCS.

Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration: Part II, protective action of solar filters

Ali ASSI¹, Rime MICHAEL-JUBELI¹, Hélène DUPLAN², Arlette BAILLETGUFFROY¹, Ali TFAYLI^{1*},
Carine JACQUES²

ali.assi@universite-paris-saclay.fr ; rime.michael-jubeli@universite-paris-saclay.fr ;
helene.duplan@pierre-fabre.com ; arlette.baillet-guffroy@universite-paris-saclay.fr ;
ali.tfayli@universite-paris-saclay; Carine.JACQUES@pierre-fabre.com

1- Lip(Sys)², Chimie Analytique Pharmaceutique (FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91400 Orsay, France.

2- Center of Research Pierre Fabre Dermo-Cosmetics (PFDC), Toulouse, France

*Corresponding author:

ali.tfayli@universite-paris-saclay

Abstract

Skin surface lipids (SSL) film is a mixture of sebum and keratinocyte membrane lipids. It covers the surface of the stratum corneum (SC) and thus participates to its barrier function. SSLs are composed of a complex of lipids that come from sebaceous and from desquamation. In the first part of this study, we have developed a novel approach to follow the impact of solar radiations on the SC based on the hydration and dehydration process. We have shown the role of SSLs in the preservation of the water homeostasis within the SC and the protective role against solar radiations impact. SSLs were shown to absorb a part of solar light and thus participate to the protection of the skin surface. Indeed, squalene, polyunsaturated fatty acids, and cholesterol levels decreased after solar exposure.

Meanwhile, this protective function may be limited and is dependent to the distribution of SSLs which is not homogenous over the body surface and may be variable between individuals. It is thus important to provide a synergic protection by the application of solar filters that preserves the skin integrity and the SSLs equilibrium.

In this second part of the study, we have evaluated the limits of the protection capacity of skin surface lipids and explored the protective action of a solar filters on both SSLs composition and the water hydration and dehydration kinetics in the SC.

Key words:

Stratum Corneum, Skin Surface lipids, Solar radiation, Hydration, Solar filter, HT-GC/MS

3. Introduction

The skin is a physical barrier that protects the tissues and organs from external aggressions such as solar radiations, oxidants, microorganisms, and toxic agents. In addition, it plays an important role against water loss. The skin's ability to retain water is mainly related to the *stratum corneum* (SC) which is the outermost layer of the skin [1]. The latter reduces the effects of dryness due to the environment [2]. SC has the architecture of dead cells filled with keratin (corneocytes) and water embedded in a lipid matrix [3, 4], which includes ceramides (CER), free fatty acids (FFAs), and cholesterol (CHOL). The barrier function is mainly due to these lipids in the extracellular matrix of the SC [5].

The ability of the SC to retain adequate water content of the skin and protect its barrier function is essential for hydrated, smooth, and youthful-looking skin. Environmental factors such as dry climates, exposure to wind, cold weather and skin diseases are common causes of dry skin [6-9].

Solar radiations also damages the SC by disrupting the skin's natural moisturizing process [1].

Even though retaining water is primarily related to the SC, the hydrolipidic film participates also in this barrier function [10-14]. It is composed of sweat and skin surface lipids (SSLs). Several studies have demonstrated their important role in the skin barrier function, by reinforcing the barrier of the SC [15-19]. SSLs are composed of a complex of non-polar lipids from sebaceous secretion and skin desquamation: triglycerides (TG), wax esters, squalene, FFAs, cholesterol, and cholesterol esters [15, 20-23].

Solar exposure not only induces detrimental effect on skin health and photoaging but also induces skin barrier damage on both structural and molecular components responsible for maintaining barrier integrity. Our skin is directly exposed to sun radiation, the type and the intensity of which vary according to several parameters e.g., place (latitude, altitude), time (season, moment of the day), location (sun/shadow, outdoor/indoor, distance from a window, inside a car, etc.). The balance between moderate sun radiation necessary for life and excessive radiation leading to skin damage is fragile. [12, 24-27]. Most of solar rays, penetrating into the human skin, are absorbed by the epidermis [28].

In the first part of this study, the effect of solar radiations on the SC, in particular the water caption, holding and dehydration kinetics was evaluated and the role of skin surface lipids in the protection of water homeostasis in the SC against solar radiations was studied. An alteration in the water caption and homeostasis within the SC after solar radiations was observed. These results were in accordance with different *in vivo* clinical evaluation showing an altered barrier against water loss after UV radiation [29-33].

A protection of the water uptake mechanism and water loss process of the SC was conferred by SSLs, and that the protective role of SSLs against solar radiations is more as an optical filter by absorbing a part of the energy of the solar light.

Thus, there are several ways to protect the skin from solar radiations. The main recommendation is to apply sunscreen [34]. The electromagnetic energy of solar radiations must be absorbed by the applied sunscreen [28]. In fact, their chemical structure reduces the harmful effects of solar radiations by absorbing, scattering, or reflecting ultraviolet radiation (UVR) and visible light [35, 36].

The main photoprotection function of chemical filters is to absorb UV_B and UV_A. Sunscreens that absorb and/or reflect longer wavelength UV_A were introduced in the late 1990s when the contribution of UV_A to photoaging and photo-carcinogenesis became evident [37].

Up to a 95 % reduction in the damage induced by UV irradiation can be achieved depending on the sun filter and sun protection factor [38].

In this context, Bacqueville et al. have demonstrated how a new sun filter, 5,6,5',6'-tetraphenyl-3,3'-(1,4-phenylene)bis[1,2,4-Triazine], called TriAsorB (CAS N°55514-22-2) improved the performance and efficacy in solar protection, especially to VIS. TriAsorB protects the DNA against solar-simulated radiation (mainly UV_B + UV_A) but also against the oxidative stress induced by , high-energy visible (HEV) light [39].

Therefore, the aim of this current study was to evaluate the protective efficacy of TriAsorB formulated as a new SPF50+ photoprotective system with three other sunscreens (Tinosorb S, Uvinul T150 and Uvinul A+) [37] by irradiating the SC through it and monitoring the dehydration kinetics.

In this part of the study, we have firstly evaluated the limits of the protection capacity of SSLs on water caption and dehydration kinetics. Higher doses were applied on unprotected SC and SC protected with SSLs. We have secondly, applied the chosen limit dose through SPF50+ sunscreen, TriAsorB formulated alone and Placebo formulation.

Finally, to confirm the capacity and the efficacy of sunscreen, SSLs were irradiated through TriAsorB formulated alone and SPF50+ sunscreen. Lipids composition was analyzed using HT-GC/MS that is a widely used method for analyzing complex mixtures and is well adapted for a comprehensive study of SSLs [15, 40].

4. Materials and Methods

a. Stratum corneum samples preparation

SC samples were prepared from human abdominal skin using a method described previously [5]. 3 SC from 3 different donors were used for each experiment condition thus 3 repetitions per condition in order to monitor the water desorption kinetics of hydrated SC.

To evaluate the limit of the protection capacity of SSLs against solar radiations and to study the efficacy of a solar filter, 4 experimental conditions were prepared as follow:

| | | |
|---|---|----------------|
| 1 | SC non-coated with SSLs and non-irradiated | Ctrl-SC |
| 2 | SC non-coated with SSLs and irradiated | Irr-SC |
| 3 | SC irradiated through SSLs | SC-Irr-SSLs |
| 4 | SC irradiated through SSLs + placebo | SC-Irr-SSLs-PL |
| 5 | SC irradiated through SSLs + TriAsrob-formulation | SC-Irr-SSLs-TF |
| 6 | SC irradiated through SSLs + SPF50+ sunscreen formulation | SC-Irr-SSLs-FF |

Table 1: The 6 prepared experimental conditions

b. Skin surface lipids preparation

SSLs were provided by the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics (PFDC, Toulouse, France). For Raman measurements, 2 mg/mL of SSLs were spread on a CaF₂ slide.

For HTGC/MS analyses 250 µL of 2 mg/mL solution was prepared in chloroform. SSLs were derivatized in prior with the trimethylsilylation. This reagent consisted of BSTFA/pyridine, 50:50 (v/v). SSLs were trimethylsilylated at room temperature for 30 min with 200 µl of reagent. The excess reagent was then removed under nitrogen flow, and the dried residue was dissolved in 250 µl of Chloroform.

c. Solar filter preparation.

The formulations (SPF50+ sunscreen, TriAsorb and placebo) were provided by the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics (PFDC, Toulouse, France). The TriAsorb-formulation (TF) contains only the TriAsorb (phenylene bis-diphenyltriazine), however the final formulation (FF) is the final SPF50+ sunscreen that contains a specific combination of four sun filters, affording a broad spectrum UV_B + UV_A photoprotection (patented association WO581; WO984). This sunscreen contains Avene thermal spring water, C12–15 alkyl benzoate,

caprylic/capric triglyceride, dicaprylyl carbonate, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (Uvinul A+), glycerine, ethylhexyl triazone (Uvinul T150), phenylene bis-diphenyltriazine (Triasorb), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), potassium cetyl phosphate, steryl alcohol, VP/eicosane copolymer, caprylyl glycol, glyceryl stearate, PEG-100 stearate, PPG-1-PEG-9 lauryl glycol ether, glyceryl dibehenate, xanthan gum, benzoic acid, tribehenin, polyacrylate-13, glyceryl behenate, sorbitan isocitrate, polyisobutene, tocopheryl glucoside, polysorbate 20, Red 33, and tocopherol [37]. The Placebo contains the same formulation without the sun filters.

For HTGC/MS analyses, SSLs were irradiated through these formulations placed on a CaF₂ slide (2 mg/cm²). For Raman measurements, after spreading the SSLs on the CaF₂ slide, the formulations were spread over (on the same slide). SC was irradiated through the formulation and SSLs.

d. Solar irradiation of SC and SSLs

SC were irradiated 15 and 45 minutes using a solar simulator 16S-300 from solar light company which produces a spectrum close to the solar spectrum. The power used for the irradiation was 0.45 W/cm². This power was measured using a pyranometer (Glenside, USA).

Likewise, the natural skin surface lipids SSLs were irradiated 6 hours using the same solar simulator with the same power. Table 2 shows the different energies used during the irradiation process for both SC and SSLs.

| | | | |
|--|--------|---------|----------|
| Time (min) | 15 | 45 | 360 |
| Sample | SC | SC | SSLs |
| Analyses | Raman | Raman | GC/MS |
| E (J/cm ²), <i>Total solar spectrum</i> | 405 | 1215 | 9720 |
| E (J/cm ²), equivalent of total <i>UV radiations</i> | 8.55 | 25.65 | 205.2 |
| E (J/cm ²), equivalent of <i>UV_B radiations</i> | 1.35 | 4.05 | 32.4 |
| E (J/cm ²), equivalent of <i>UV_A radiations</i> | 7.2 | 21.6 | 172.8 |
| Minimal erythema dose | 45 MED | 540 MED | 1080 MED |

Table 2: The different doses applied to skin surface lipids during irradiation in J/cm²

e. High temperature gas chromatography-mass spectrometry (HTGC-MS):

A Thermo Scientific (Austin, TX) gas chromatography unit (Trace GC Ultra) equipped with an on-column injector was coupled to a quadrupole DSQII mass spectrometer via a high-temperature interface. The separation was achieved using a 30 m × 0.32 mm ZB-5HT capillary column (Phenomenex, Torrance, CA) coated with 0.1 μm of 5% diphenyl/95% dimethylpolysiloxane, connected to a 5 m 0.32 mm HT-deactivated tubing guard column.

Helium was used as a carrier gas at a constant flow of 2 mL/min. The injector and transfer line temperatures were set to 60°C and 350°C, respectively. The oven temperature was programmed from 60°C to 240°C at 5°C/min; 240°C to 320°C at 2.5°C/min; and 320°C to 350°C at 1°C/min. EI mass spectra were recorded in the total ion current (TIC) monitoring mode. The operating conditions for EI-MS were source temperature at 220°C, ionizing energy at 70 eV, and scan range from m/z 45 to 1,000 with a period of 1 s.

f. Raman microspectrometer:

A confocal Raman microspectrometer LabRam HR Evolution (Horiba Scientific, Lille, France) was used for spectral acquisition. A video image of the sample was used for accurate positioning of the laser spot on the sample. A 633 nm He:Ne laser (Toptica Photonics, Munich, Germany), was used. A long focal 100X objective/ NA= 0.9 (Olympus, Tokyo, Japan) was used

to focus the laser light and to collect the back scattered light. The confocal pinhole was set to 200 μm . The penetration depth was from -10 to 30 μm with a step size of 2 μm repeated 21 times.

The collected light was filtered through an edge filter and dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution using a 300 μm slit and a holographic grating of 300 grooves/mm. The Raman Stokes signal was recorded with a Synapse Charge-Coupled Device detector: CCD camera (Andor Technology, Belfast, UK). Spectral acquisition was performed using Labspec 6 software (Horiba Scientific, Lille, France). Raman measurements were performed on each depth in the 400–3800 cm^{-1} spectral range. For each scan, a 5 second exposure time with 2 accumulations was used. All spectra were smoothed using Savitzsky-Golay algorithm and baseline corrected using an automatic polynomial function.

g. Raman Spectroscopy of SC Water Loss

Raman spectroscopy was performed on SC samples equilibrated at high humidity and then placed in a dry environment to study water desorption. A humidity-controlled chamber, based on an airflow principle, was built around the microscope. A hygrometer/thermometer (with $\pm 2\%$ accuracy) was used to measure relative humidity. The humidity was set to 10 % RH. To obtain the desired relative humidity a dry airflow was used in the chamber with a flow rate of 3 L/min [41].

The water desorption analysis was carried out on isolated SC settled onto CaF_2 slides. As the SC is fixed on a glass slide, desorption occurs only from one side of the SC, like *in vivo* drying [2, 6, 42]. Water desorption kinetics of hydrated SC samples in a dry environment were studied.

Raman profiles acquisitions, pre-processing and processing were performed as described in the part I of this study.

h. Statistical analyses:

Analysis of variance (ANOVA) is one of the most widely used tests for experimental data. It is a powerful method to compare differences between the means of several groups. The test compares the variability of each population (intra-group variances) and that of grouped populations (inter-group variance) and thus determines whether the groups are significantly different. A pairwise comparison based on Bonferroni test was performed. For each experimental condition, the average results of the measurements on SC were presented as mean \pm standard deviation.

5. Results and discussion:

In the part I of this study we have shown the capacity of SSLs to protect the water homeostasis of SC against solar radiations. Here, we have firstly evaluated the limit of the protection capacity of SSLs. In a second time, the synergic action of a sunscreen formulation with the SSLs was tested, therefore, SC was irradiated through SSLs + TriAsorb-formulation (TF), SSLs + SPF50+ sunscreen formulation (FF) and SSLs + placebo (PL). Finally, in the last part, the capacity of the TF and FF to preserve the SSLs integrity against solar radiations was evaluated using HT-GC/MS.

1. Limit of SSLs protection capacity against solar radiations:

To evaluate the protection limit capacity of SSLs and the impact on water homeostasis in the SC: water caption (WC) and water retention (WR) results are plotted in figure 1.A and 1.C for WC, figure 1.B and 1.D for WR.

After solar irradiation (405 J/cm^2), the hydration properties of the SC were significantly altered. Water caption capacity significantly decreased of almost 44% between irradiated SC (Irr-SC) and control (Ctrl-SC) (Fig. 1.A). The same observations were obtained for water retention (WR) with a decrease of almost 53% (Fig. 1.B). When the SC was irradiated with the same dose (405 J/cm^2) through SSLs, a significant protection was conferred by SSLs A loss of only 27 % and 31 % for WC and WR respectively was observed (Fig. 1.A and B).

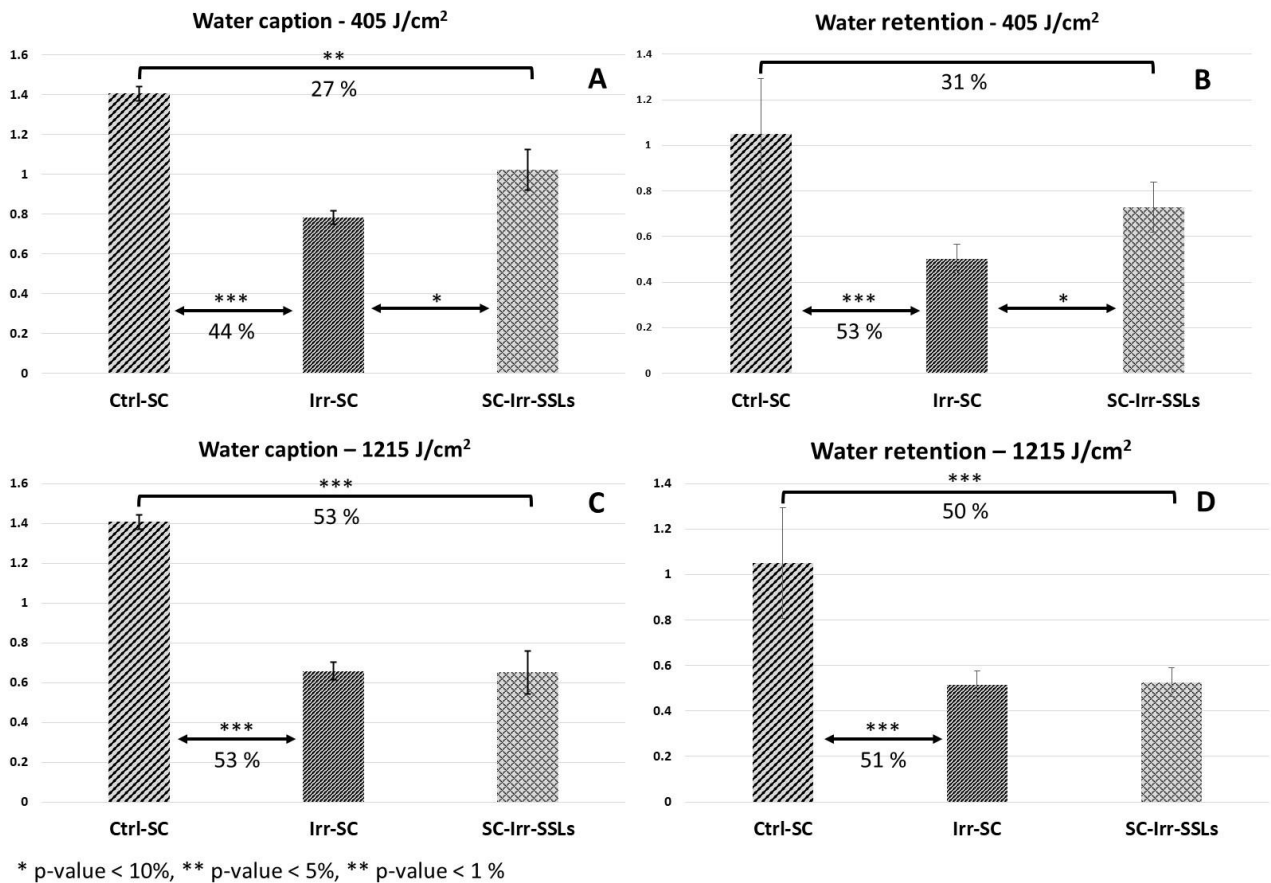


Figure 1 : A: Water caption (WC) 405 J/cm², B : Water retention (WR) 405 J/cm², C: Water caption (WC) 1215 J/cm², D : Water retention (WR) 1215 J/cm²

By increasing the irradiation dose (1215 J/cm²), the hydration properties were much more altered than the SC irradiated with a lower dose (405 J/cm²) as expected. Thus, a loss of 53 % of WC was observed when irradiated SC (Irr-SC) was compared to control (Ctrl-SC) (Fig. 1.C). The same observations were obtained for water retention (WR) with a decrease of almost 51 % (Fig. 1.D). Interestingly, when this dose was applied through SSLs film, the protection role observed at lower doses completely disappeared. A loss of 53 % and 50 % for WC and WR respectively were observed (Fig. 1.C and D). These values, equivalent to those observed for irradiated non-protected SC indicate that the protection limit of SSLs is reached and additional protection by adding sunscreen formulations is needed.

In addition to the observations on global water content, a marked decrease in the relative amount of tightly bound water (P-value < 5% for both 405 J/cm² and 1215 J/cm²) was observed compared to partially bound and unbound water when SC was irradiated without SSLs protection (data not shown). This observation may be related to modifications in the

molecular sites presenting Hydrogen bonding possibilities *e.g.* proteins and polar heads of lipids. In addition, when SC was irradiated through SSLs with a dose of 405 J/cm², and compared to unprotected SC, a non-significant increase in the relative amount of tightly bound water was observed. However no protective effect was observed when the dose was 1215 J/cm².

The analyses of Raman features related to proteins secondary and ternary structures showed no significant modifications as well as spectral descriptors for the SC lipids conformational order and lateral packing, (Data not shown).

2. Evaluation of the protection efficacy of TF and FF on SC water homeostasis:

There are many ways to protect the skin from solar radiations. The most important is to apply sunscreen that absorbs the energy of solar radiations [28, 34]. In fact, their chemical structure reduces the harmful effects of solar radiations by absorbing, scattering, or reflecting ultraviolet radiation (UVR) and visible light [35, 36].

Thus, SC was irradiated (1215 J/cm²) through SSLs, a placebo formulation (PL), a TriAsorb-formulation containing the TriAsorB solar filter (phenylene bis-diphenyltriazine) (TF), and the SPF50+ sunscreen formulation (FF) with a combination of 4 sun filters to evaluate the protective efficacy on the dehydration kinetics and their synergic action with SSLs.

Water caption (WC) and water retention (WR) of all drying kinetics profiles are plotted in figure 2.A for WC and figure 2.B for WR.

As previously mentioned, after solar irradiation (1215 J/cm²), the hydration properties of the SC were significantly altered, and the SSLs conferred no protection. Thus, the SC was irradiated through the placebo (PL), the TriAsorb-formulation (TF) and the SPF50+ sunscreen formulation (FF).

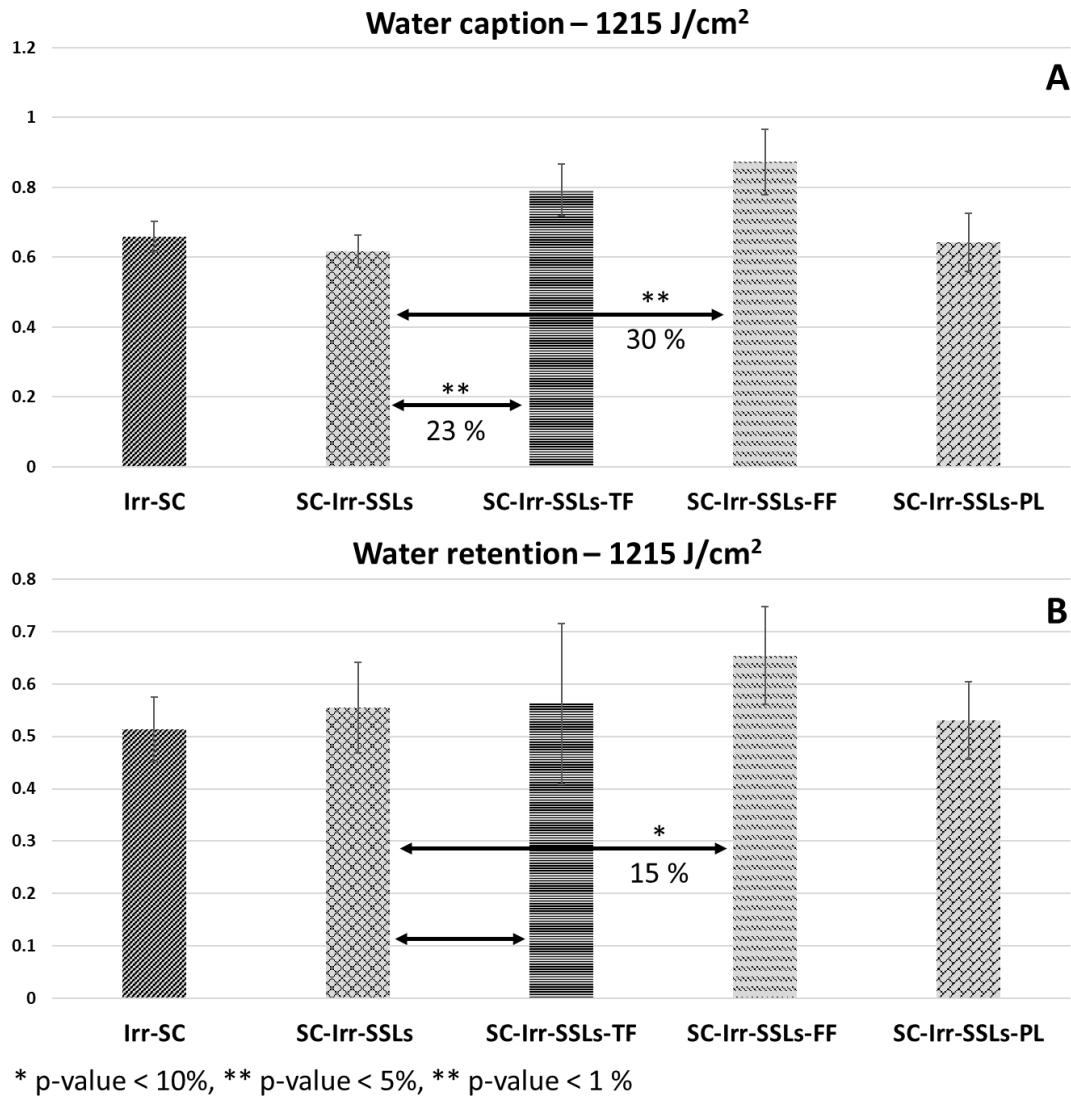


Figure 2 : A: Water caption (WC) 1215 J/cm², B : Water retention (WR) 1215 J/cm²

A significant increase of water caption was observed (23% and 30% for TF and FF respectively) compared to the SC irradiated through only SSLs (SC-Irr-SSLs) (Fig. 2). No protection was observed when the SC was irradiated through SSLs and the placebo, this means that the placebo has no effectiveness and no protection against solar radiations.

For water retention, TF presented no significant enhancement while an increase of almost 15% was observed with FF.

In addition, this protection was confirmed by a marked increase in the relative amount of tightly bound water (p-value < 0.05) when the SC was irradiated through TF and FF.

The protective effect seems to be more effective for the SPF50+ sunscreen formulation (FF) that contains a combination of four filters compared to the TriAsorb-formulation (TF) that contains only TriAsorb. However, TriAsorb-formulation permits to obtain significant protection on water caption parameter.

3. TF and FF protection of skin surface lipids SSLs integrity:

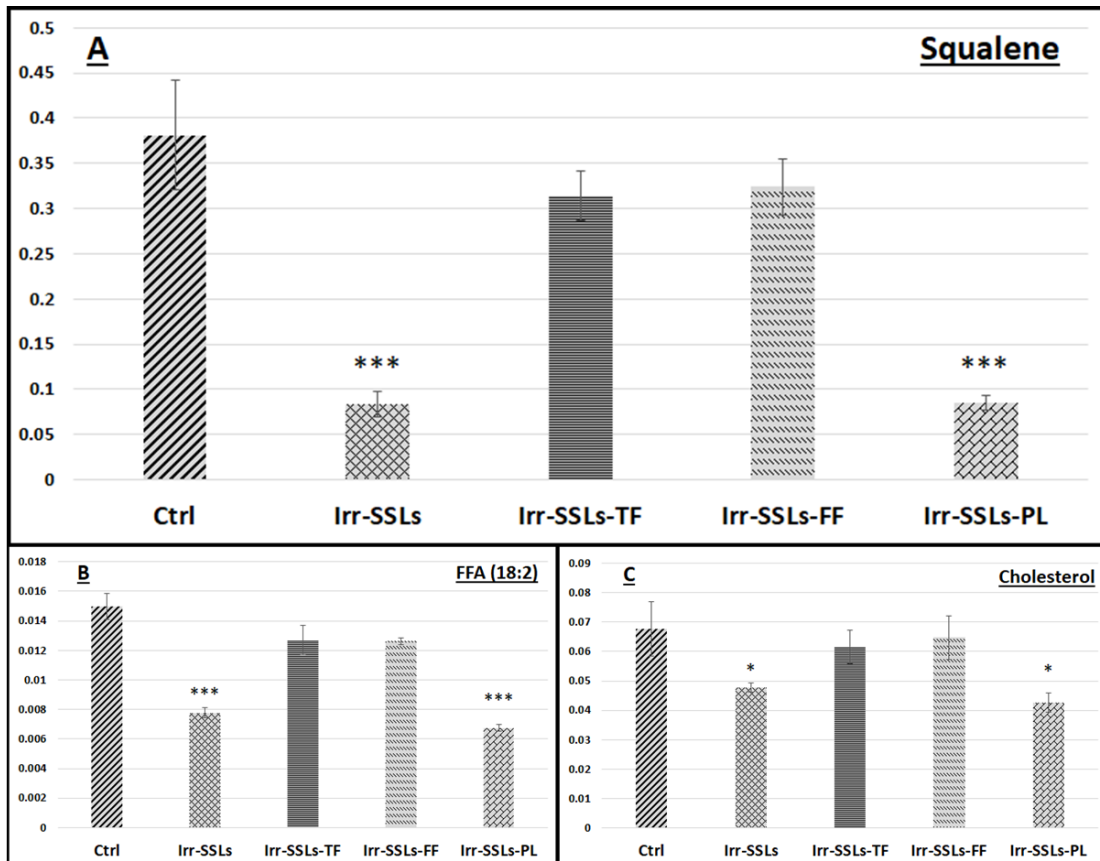
To investigate protective action of the SSLs integrity, samples were irradiated for 6h directly (irr-SSLs), through the placebo (irr-SSLs-PL), through the TriAsorb-formulation (TF) (irr-SSLs-TF), and through the SPF50+ sunscreen formulation (FF) (irr-SSLs-FF). In the first part of this study, the impact of irradiation was evaluated on each lipid class in the SSLs using GC/MS. Three different lipid classes showed a significant decrease in intensity: Squalene (Sq), cholesterol and FFA(18:2).

Irradiation of SSLs for 6 hours induced a significant decrease in Sq content in the unprotected sample and the sample irradiated through the placebo. Irradiation through TF or FF filters offered significant protection of Sq compared to unprotected irradiated SSLs (Figure 3.A).

Considering the free fatty acids, the FFA with 2 double bonds (C18:2) showed the same variation as Sq. A significant decrease was observed in the unprotected sample and the sample irradiated through the placebo. Nevertheless, significant protection was offered by the TF and FF filters (Fig. 3.B).

Cholesterol has shown the same tendency as squalene and polyunsaturated fatty acid with a lower variation (Fig. 3.C).

Thus, same significant protection was observed which highlights the importance of the protection offered by the TF and FF formulation which contains different solar filters to ensure correct protection over the entire solar spectral range.



* p-value < 10%, ** p-value < 5%, *** p-value < 1 %

Figure 3: Impact of solar radiations on SSLs lipid classes and the protective role of the TF and FF solar filters.

6. Conclusion

In this study, Raman spectroscopy was used in order to follow the drying process of the SC and to evaluate the limits of the protection capacity of SSLs then evaluate the protective efficacy of solar filters (TriAsorb-formulation (TF) and SPF50+ sunscreen formulation (FF)).

This work shows that the role of SSLs has a limit in protecting SC against solar radiations and they lose their protective role when lower radiation doses were applied. These data show the importance of an adequate solar protection. Indeed, a significant protection was observed when the SC was irradiated through the solar filters. A more important protective action was observed with the SPF50+ sunscreen formulation (FF) that contains a combination of four filters compared to the TriAsorb-formulation (TF) and no protection for the formulation without sun filters (placebo).

In addition, to confirm the protective role of TF and FF of the SSLs integrity, samples were irradiated for 6h directly through the TF and FF films, and the impact of irradiation was evaluated on each lipid class in the SSLs using HT-GC/MS.

Irradiation of SSLs for 6 hours induced a significant decrease in squalene and polyunsaturated fatty acids content in the unprotected sample and the sample irradiated through the placebo. Irradiation of SSLs through TF and FF filter offered the same significant protection of these lipid classes compared to unprotected irradiated SSLs. In addition, cholesterol has shown the same tendency as squalene and polyunsaturated fatty acid with a lower variation.

Finally, this significant protection highlights the importance of the protection offered by solar filters not only for the skin but also for the SSLs and the stratum corneum.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Center of Research Pierre Fabre Dermo Cosmetics for the financial support of this work.

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

7. References

1. Verdier-Sevrain, S. and F. Bonte, *Skin hydration: a review on its molecular mechanisms*. J Cosmet Dermatol, 2007. **6**(2): p. 75-82.
2. Biniek, K., et al., *Measurement of the biomechanical function and structure of ex vivo drying skin using raman spectral analysis and its modulation with emollient mixtures*. (1600-0625 (Electronic)).
3. Bouwstra, J.A. and G. Gooris, *The Lipid Organisation in Human Stratum Corneum and Model Systems*. The Open Dermatology Journal, 2010. **4**: p. 10-13.
4. Silva, C.L., et al., *Stratum corneum hydration: phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes*. (0006-3002 (Print)).
5. Vyumvuhore, R., et al., *Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis*. Analyst, 2013. **138**(14): p. 4103-4111.
6. Vyumvuhore, R., et al., *Vibrational spectroscopy coupled to classical least square analysis, a new approach for determination of skin moisturizing agents' mechanisms*. (1600-0846 (Electronic)).
7. Denda, M., et al., *Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function*. (0022-202X (Print)).
8. Sato, J., et al., *Abrupt decreases in environmental humidity induce abnormalities in permeability barrier homeostasis*. (0022-202X (Print)).
9. Behl Cr Fau - Flynn, G.L., et al., *Hydration and percutaneous absorption: I. Influence of hydration on alkanol permeation through hairless mouse skin*. (0022-202X (Print)).
10. Sator, P.G., J.B. Schmidt, and H. Honigsmann, *Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(3): p. 352-8.
11. Berkey, C., et al., *Role of sunscreen formulation and photostability to protect the biomechanical barrier function of skin*. (2405-5808 (Electronic)).
12. Lucas, R., et al., *Solar ultraviolet radiation : global burden of disease from solar ultraviolet radiation / Robyn Lucas ... [et al.] ; editors, Annette Prüss-Üstün ... [et al.]*. 2006, World Health Organization: Geneva.
13. Assi, A., et al., *Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy*. Eur J Dermatol, 2022.
14. Darvin, M.E., et al., *In vivo Raman spectroscopic analysis of the influence of UV radiation on carotenoid antioxidant substance degradation of the human skin*. Laser Physics, 2006. **16**(5): p. 833-837.
15. Rigal, A., et al., *Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age*. LID - 10.1684/ejd.2020.3753 [doi]. (1952-4013 (Electronic)).
16. Mavon, A., et al., *Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1997. **8**(3): p. 147-155.
17. Pilgram, G.S.K., et al., *The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2001. **1511**(2): p. 244-254.
18. Choi, E.H., et al., *Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans?* (0022-202X (Print)).
19. Fluhr, J.W., et al., *Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice*. (0022-202X (Print)).
20. Greene, R.S., et al., *Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid*. J Invest Dermatol, 1970. **54**(3): p. 240-7.

21. Downing, D.T. and J.S. Strauss, *Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1974. **62**(3): p. 228-244.
22. Pappas, A., *Epidermal surface lipids*. Dermatoendocrinol, 2009. **1**(2): p. 72-6.
23. Stewart, M.E., et al., *Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls*. (0003-987X (Print)).
24. Biniek, K., R.H. Levi K Fau - Dauskardt, and R.H. Dauskardt, *Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin*. (1091-6490 (Electronic)).
25. Armstrong, B.K. and A. Kricger, *The epidemiology of UV induced skin cancer*. (1011-1344 (Print)).
26. Holick, M.F., *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease*. (0002-9165 (Print)).
27. Brash, D.E., et al., *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma*. (0027-8424 (Print)).
28. Egawa, M. and H. Iwaki, *In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy*. Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI), 2008. **14**(4): p. 410-7.
29. Meguro, S., et al., *Stratum corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin*. Photochem Photobiol, 1999. **69**(3): p. 317-21.
30. Gélis, C., et al., *Modifications of in vitro skin penetration under solar irradiation: evaluation on flow-through diffusion cells*. (0031-8655 (Print)).
31. Takagi, Y., et al., *Decreased levels of covalently bound ceramide are associated with ultraviolet B-induced perturbation of the skin barrier*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(6): p. 1102-9.
32. Yoon, S.H., et al., *In vivo Change of Keratin-Bound Molecules in the Human Stratum Corneum following Exposure to Ultraviolet Radiation*. Skin Pharmacol Physiol, 2019. **32**(5): p. 254-264.
33. Mac-Mary, S., et al., *Assessment of cumulative exposure to UVA through the study of asymmetrical facial skin aging*. Clinical interventions in aging, 2010. **5**: p. 277-284.
34. Petersen, B. and H.C. Wulf, *Application of sunscreen--theory and reality*. (1600-0781 (Electronic)).
35. Gasparro, F.P., J.F. Mitchnick M Fau - Nash, and J.F. Nash, *A review of sunscreen safety and efficacy*. (0031-8655 (Print)).
36. Patel, N.P., R.L. Highton A Fau - Moy, and R.L. Moy, *Properties of topical sunscreen formulations. A review*. (0148-0812 (Print)).
37. Jacques, C., et al., *MS imaging and absorption methods visualizing sun filter skin spatial distribution and penetration*. Journal of Controlled Release, 2022. **347**: p. 78-88.
38. Bacqueville, D., et al., *A new hair follicle-derived human epidermal model for the evaluation of sunscreen genoprotection*. (1873-2682 (Electronic)).
39. D. Bacqueville, C.J.-J., H. Dromigny, Y. Brunel, F. Boyer, P.J. Ferret, D. Redoul`es, T. Douki, S. Bessou-Touya, H. Duplan *Phenylene Bis-Diphenyltriazine (TriAsorB), a new sunfilter protecting the skin against both UVB + UVA and blue light radiations (Unpublished results)*. 2022.
40. Michael-Jubeli, R., J. Bleton, and A. Baillet-Guffroy, *High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling*. J Lipid Res, 2011. **52**(1): p. 143-51.
41. Tfyali, A., et al., *Hydration effects on the barrier function of stratum corneum lipids: Raman analysis of ceramides 2, III and 5*. Analyst, 2013. **138**(21): p. 6582-6588.
42. Galliano, M.-F., et al., *Comprehensive characterization of the structure and properties of human stratum corneum relating to barrier function and skin hydration: modulation by a moisturizer formulation*. Experimental Dermatology, 2021. **30**(9): p. 1352-1357.

Chapitre 3 : Etude des effets de doses UV sous érythémateuses sur le SC humain par spectroscopie Raman confocale *in vivo*

Article 6 : “Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy”

Contexte :

Étant la première barrière protectrice de la peau, le SC présente un système de défense équilibré pour protéger le corps contre les effets nocifs des rayons UV et des radicaux libres et des espèces réactives de l’oxygène.

Mais les UV accélèrent le vieillissement des cellules de la peau et sont ainsi responsables de l’accentuation des rides, de taches brunes, de la tendance à avoir de la couperose...

En plus, les UV pénètrent dans le noyau des cellules cutanées et y créent des mutations génétiques, responsables de cancers de la peau.

Notre objectif était d’étudier les impacts de l'exposition aux UVA et UVB à des doses sous érythémateuses sur la structure et l'organisation moléculaire et la fonction barrière du SC en suivant différents descripteurs Raman.

En effet, à notre connaissance très peu d’études se sont intéressées à ces doses. Cependant, les rayonnements UV pourraient impacter les molécules impliquées dans la fonction barrière à des doses plus faibles que la DEM.

Matériels & Méthodes :

Vingt femmes, volontaires, âgées de 20 à 30 ans, et ayant une peau saine, ont été recrutées pour l’étude. Des doses de 95 mJ/cm² d'UVA et de 15 mJ/cm² d'UVB ont été appliquées sur les avant-bras des volontaires et des mesures Raman *in vivo* ont été effectuées sur les régions irradiées et les régions contrôles.

Résultats :

L'impact des irradiations UVA et UVB a été observé suivant plusieurs descripteurs Raman, par exemple le rapport $\nu(\text{CH}_2)_{\text{asym}} / \nu(\text{CH}_2)_{\text{sym}}$ pour l'ordre d'organisation de la bicouche lipidique. Les descripteurs de la teneur en eau et de la mobilité des molécules d’eau ont été obtenus en calculant le rapport $\nu\text{OH} / \nu\text{CH}$.

Conclusion :

Un relâchement de l'organisation intermoléculaire des lipides a été provoqué immédiatement après irradiation UVA. En revanche, un impact retardé a démontré une réorganisation de cette barrière lipidique. De même, une augmentation de la teneur en eau a été observée principalement pour la fraction d'eau non liée et une augmentation relative de feuillets β dans les protéines du SC.

Full title: Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by *in vivo* confocal Raman spectroscopy

Short title: Effects of low UV doses on human stratum corneum

Ali Assi¹, Sana Tfaili¹, Alessia Quatela², Franck Bonnier³, Arlette Baillet-Guffroy¹, Ali Tfayli^{1*}

¹ Interdisciplinary Unit: Lipids, Analytical and Biological Systems, Faculty of Pharmacy, Univ. of Paris-Saclay, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry. France

² Horiba France SAS, 14, Boulevard Thomas Gobert, CS45002, 91120 Palaiseau, France

³ Université François-Rabelais de Tours, EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France

Keywords: *In vivo* Raman, stratum corneum, UV radiations, skin lipids, water mobility, proteins secondary structure

*** Corresponding author: ali.tfayli@u-psud.fr**

Total number of words: 3335

Total number of figures: 2

Total number of tables: 1

Total number of references: 44

ABSTRACT

Background: The stratum corneum (SC) plays an important role in the skin barrier function. It acts as a protective barrier against water loss, eliminates foreign substances, micro-organisms and acts against harmful effects of UVR.

Objectives: our aim was to study the impacts of UV_A and UV_B exposure in suberythemal doses on molecular structure, organization and barrier function of SC by following different Raman descriptors.

Materials and methods: Twenty female volunteers aged from 20 to 30 years with healthy skin were enrolled for the study. 95 mJ/cm² UV_A and 15 mJ/cm² UV_B doses were applied on volunteers' forearms. *In vivo* Raman measurements were performed at irradiated and control regions.

Results: The impact of UV_A and UV_B irradiations were observed following several Raman descriptors, *i.e.* the ratio of $v_{\text{asymCH}_2}/v_{\text{symCH}_2}$ (2885cm⁻¹/ 2850 cm⁻¹) for the organizational order of the lipid bilayer. Water content and mobility descriptors were obtained by calculating $v_{\text{OH}}/v_{\text{CH}}$ ratio. Finally, proteins secondary structure was followed by observing the 1670 cm⁻¹/1650 cm⁻¹ ratio related to β sheets and α helices respectively.

Conclusion: UVA dose induced a loosening of the lateral packing of lipids immediately after irradiation. In contrast, the delayed impact was a tightening of the lipid barrier, an increase in the water content and mainly in the unbound water fraction and higher relative amount of β sheets in SC proteins. Put together, these observations can explain the thickening of the SC observed by previous studies.

15 mJ/cm² UV_B dose was apparently below the threshold to induce significant changes despite the evolution trends that were obtained in this study.

INTRODUCTION

The stratum corneum (SC), the outermost layer of the skin represents the main barrier against exogenous insults [1]. It is composed of keratin-filled dead corneocytes embedded in continuous highly organized lipid layers. The unique composition of these lipid layers (ceramides, free fatty acids and cholesterol) plays an important role in the SC function [2]. SC provides thus the first barrier against environmental stresses such as solar radiations and regulates water loss from the body [3].

Solar radiation reaching the surface of the earth, and thereby the surface of our skin, contains infrared (700-2500 nm), visible (400- 700 nm), and ultraviolet radiation (UVR) (290-400 nm) [4]. More precisely, there are three categories of UVR. UV_C rays (200-280 nm) are the shortest in wavelength and are filtered out by the ozone layer. In contrast, UV_B rays (280-320 nm) and UV_A (320-400 nm) reach the earth's surface and are responsible for cutaneous photobiological events. UV_B radiations reach the earth in relatively low amounts (about 0.5% of solar spectral irradiance at ground level, integrated over 290-2500 nm range) and is highly energetic, while UV_A rays are lower in energy, but they are at least 20 times more abundant. 95% of UV rays reaching the ground level are UV_A [4-6].

On one hand, 70% of UV_B radiation that reaches the skin is absorbed by the stratum corneum, 20% reaches viable epidermis, and only 10% penetrates the upper part of the dermis. On the other hand, UV_A radiation is partly absorbed by the epidermis, but 20-30% of it reaches deep dermis. Thus, UV_A rays are more penetrating than UV_B ones. The major chromophores in the skin that determine the depth of penetration are nucleic acids, aromatic amino acids, and melanin. So, UV_B has a major action on the epidermis and UV_A can also reach the dermis [4-7].

Solar UV radiations are known to have beneficial effects on the body such stimulating the production of vitamin D [8]. However, the effect of UV radiations on human health depends on the amount and type of radiation impinging on the body [9].

Penetration of UV light into the skin results in the formation of free radicals, which immediately interact with living cells. Free radicals can cause oxidation effects on epidermal proteins, lipids and epidermal DNA [10-12]. While the roles of UV_B and UV_A wavelengths in the

photoaging process and their impacts on the skin are not fully understood, it is known that UV_A radiation contributes significantly to long-term deterioration of the dermal structure and clinical signs of photoaging [13, 14].

Being the first protective barrier of the skin, the SC presents a balanced defense system to protect the body against harmful effects of UVR and the originated free radicals and oxidative reactive species [10]. This defense mechanism is based of antioxidant substances, such as carotenoids, vitamins, enzymes, and others, which form an antioxidant network of living organism [10].

The impact of UV_R on carotenoids in human skin was performed in vivo using resonance Raman spectroscopy [10, 15]. Darvin et al 2006 [10] and Laderman et al 2011 [15] observed a decrease in beta carotene and lycopene after relatively low UV_B doses exposure with a delay going between 30 to 90 minutes for the former and between 0 and 30 minutes for the latter).

Other components in the SC are highly UV ray absorbing molecules. The Urocanic acid (UCA) can be easily detected in its *trans* form using confocal Raman microscopy [16, 17]. The *trans* form isomerizes to the *cis* form upon UV exposure [16] [17]). In both studies, authors observed a decrease in *trans*-UCA immediately after UV radiation and remained low for one week to regain the initial level about two weeks after [16, 17].

In addition to the effects on UV absorbing molecules, different changes in molecular and biochemical features of the SC were described [18]. For instance, different studies reported an increase in skin thickness [19-21]; *i.e.* Pearse et al. [20] reported since 1987 that both UV_A or UV_B increased the mean epidermal thickness, the mean SC thickness and the mean keratinocytes height significantly. These results, in particular the epidermis thickness were later confirmed by optical coherence tomography (OCT) after repeated UV_A or UV_B doses [21].

The impact of UV exposure on SC lipids was also investigated directly on lipid films [22-25]. Ceramides and fatty acids were exposed to high UV doses. The impact on these lipids can be summarized in three main points, *i.* formation of new entities such as hydroperoxides and epoxides, *ii.* hydrogenation of the double bond, and *iii.* breaking of the carbon chain, leading to rearrangements in alkyl chains of the lipids. [24, 25].

Finally, stratum corneum provides also a critical mechanical protection for the human body [26, 27]. After very high UV_B doses the keratin-controlled stiffness remained constant but the intercellular strength, strain, and cohesion decreased markedly [26, 27]

Here we present the effects of unique UV_A and UV_B exposure in suberythemal doses (95 mJ/cm² for UV_A and 15 mJ/cm² for UV_B). *In vivo* Raman spectroscopy was used to study the evolution lipids lateral packing and proteins secondary structure. Additionally, we have followed the changes in the water content and water mobility by following the area under curve (AUC) evolution of the OH stretching band.

Impacts of UV radiations were analyzed few minutes after exposure. *In vivo* Raman measurements were repeated at days 2 and 4 in order to follow possible delayed adaptation to UV radiations.

MATERIALS & METHODS

Volunteers

Twenty female volunteers aged 20–30 years (mean 25 years) were enrolled in the study. All subjects had no systemic or skin disorders which could influence skin surface pH, hydration and sebum content at the study sites. Volunteers had skin phototypes I and II and were instructed to avoid any skin care product for at least 72 h before the beginning of the experiments. The study was carried out according to ethical principles of the Declaration of Helsinki. All volunteers signed informed consent forms.

Ultraviolet irradiations

A fiber coupled DH-2000 Deuterium-Halogen light source (215–400 nm) (Ocean Optics, Dunedin, USA) equipped with custom-made UV_A and UV_B bandpass filters were used. Suberythemal UV_A and UV_B doses were applied *i.e.* 95 mJ/cm² for UV_A (20 minutes exposure) and 15 mJ/cm² for UV_B (20 seconds exposure).

After an acclimation time of 10 min (22°C, 45% RH), a template containing three apertures (UV_A, UV_B and control) of 1 cm² each in size was attached to the volunteers' volar forearms. Six measurements at different points of the aperture were performed for each volunteer. For intra-individual variability, spectral collection was performed at days 0, 2 and 4 for each volunteer.

***In vivo* Raman spectroscopy**

The *in vivo* Raman microscopic measurements were performed using a confocal Raman optical microprobe (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Asc, France) in the range between 400 and 3800 cm⁻¹. The utilized excitation wavelength was 660 nm with a laser power on the skin site of 15.0 mW. A long working distance objective MPlan FLN 100X/NA 0.75 was used for focusing the excitation beam and capturing the scattered light. The penetration depth was around 5 μm. Six measurements at different points at the surface of the stratum corneum were performed for each volunteer. For each scan, a 2 s exposure time was used with 2 accumulations.

In vivo Raman signatures were collected few minutes after irradiations (D0), 2 days (D2) and 4 days (D4) after UV exposure.

Data preprocessing and processing

Signal and spectra have been separated into two wavenumber regions: the so-called fingerprint region i.e. 400-1800 cm^{-1} and the 2600-3100 cm^{-1} region, normalized on Amide I band (1565-1720 cm^{-1}) and on C-H stretching band (2800-3030 cm^{-1}) respectively.

The different data analysis steps were performed using Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA). All spectra were smoothed using Savitzky-Golay algorithm (2th order, 11 points) [28], normalized by applying unit vector method and baseline corrected using an automatic polynomial function [29].

To compare the spectral parameters within each group, the ANOVA test was used. Two-way analysis of variance for variation inter-, intra-groups for all the skin parameters has been presented as mean \pm Standard Deviation. Significance limits were set to P-values at 1% and 5%. P-values lower than 10% were used as tendency indicators.

RESULTS AND DISCUSSION

Direct impact of UV radiations

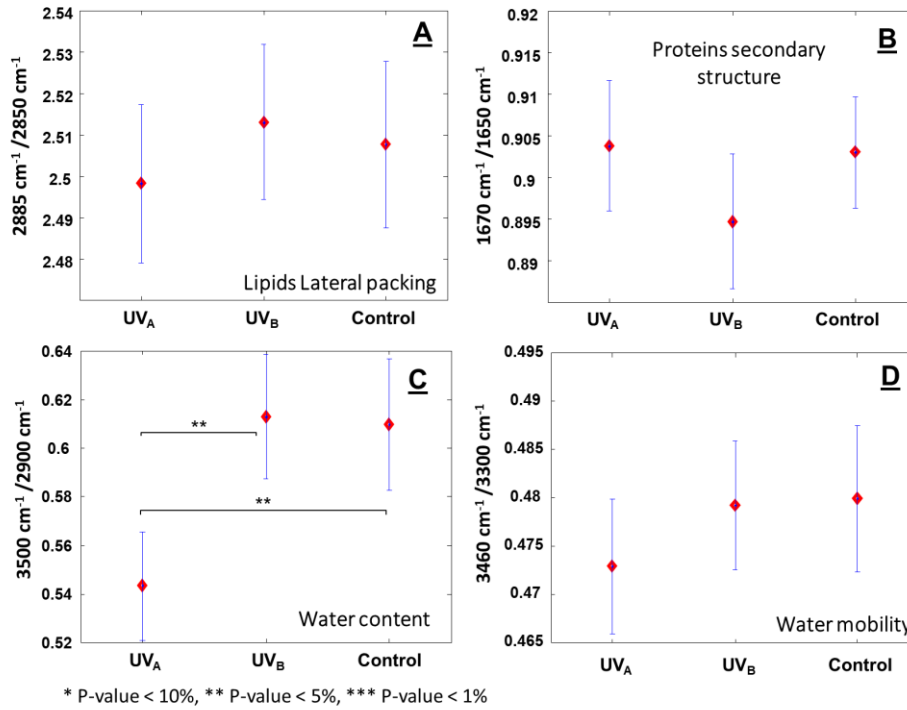


Fig. 1 Effects of UVA and UVB radiations at D0 few minutes after UV exposure A) $v_{asym}CH_2$ (2882 cm^{-1})/ $v_{sym}CH_2$ (2852 cm^{-1}) ratio; B) sub band at 1670 cm^{-1} / band in 1650 cm^{-1} (β sheets / α helices); C) Water content ($\nu OH/\nu CH$ Ratio); D) Ratio between unbound water and partially bound water.

As described in the introduction and shown in table 1, *in vivo* Suberythemal doses showed significant effect on SC thickening [20, 21], carotenoids [10, 15] and t-UCA [16, 17]. On hairless mice, TEWL values increased after UV exposure on hairless mice skin [19, 30-32]. FTIR measurements highlighted loosening of the barrier function [32].

In parallel to the SC thickening, Wefers et al. [18] observed, using high performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), an increase in the amount of stratum corneum lipids. A result confirmed by Ali S. M. et al. 2014 [33] using Raman spectral imaging after UV exposure.

In contrast to the increase of the SC thickness and lipids amounts, it has been reported that UV exposure induced a loosening in the barrier function [30-32]. All three studies exposed the skin to UV_B rays. As a result, an increased trans-epidermal water loss (TEWL) values were obtained along with abnormalities shown in the bilipid layer with electron microscopy [30], a

decrease in covalently bound ceramides [31] and a shift of the CH₂ stretching mode in Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to higher wavenumbers reflecting an increase in the motional freedom of lipids [32]. The two latter modifications peaked between 2 and 4 days after UV_B irradiation.

The direct impact observed on lipid films was obtained with high UV doses UVA (58000 to 1 380 000 000 mJ/cm²) and UVB (150 to 1500 mJ/cm²) (table 1) [22-25]. Modification in the SC lipids were also reported by Biniek et. al. [26] after very high UVB doses (160 000 mJ/cm²).

In addition to the lipidic barrier, tight junctions function as an intercellular permeability barrier mainly against small molecules [34]. It has been shown that UV_B exposure causes functional deterioration of tight junctions [34].

Table 1 presents synthetic summary of the up-mentioned studies against the UVA and UVB used doses. It can be observed that UV doses used for the lipid barrier modification are much higher than minimal erythema doses (MED) for both UV_A (MED ~4.5.10³ mJ/cm²) and UV_B (MED ~150 mJ/cm²) [22-27].

The aim of the present study was to evaluate directly *in vivo*, the effect of suberythemal UV doses on SC barrier function and SC hydration. For UV_A, a dose of 95 mJ/cm² corresponding to 20 minutes of irradiation while for UV_B a 15 mJ/cm² dose corresponding to 20 seconds of exposure were applied.

To follow lipid compactness the bands at 2850 and 2885 cm⁻¹ were measured, and the ratio of the $\nu_{\text{asym}} \text{CH}_2$ (2885 cm⁻¹) to the $\nu_{\text{asym}} \text{CH}_2$ (2850 cm⁻¹) was calculated [35-38]. Despite a very slight decrease tendency on the UV_A exposed zone, no significant changes were observed for both UV_A and UV_B irradiated zones compared to control (figure 01.A).

Hydrogenation of double bonds in lipid chains and breaking carbon chains were reported after UV exposure [22-25]. The $\nu=\text{CH}/\nu\text{CH}_2$ ratio (3060 cm⁻¹/(2850 +2885 cm⁻¹)) and the $\nu\text{CH}_3/\nu\text{CH}_2$ ratio were calculated to monitor double bonds hydrogenation and modifications in the alkyl chains lengths respectively (data not shown). No significant modifications were obtained.

The Amide I band is directly related to the secondary structure of proteins. It can be composed into several sub-bands associated with different forms of secondary structure; i.e. α helix, β

sheet, turns and random coil structures. The sub-band around 1650 cm^{-1} is associated with α helix form of the keratin, while the sub-band arising around 1670 cm^{-1} was assigned to β sheets. Finally, the 1690 cm^{-1} feature was attributed to turns and random coils [39-43]. No modifications were detected immediately after UV exposure (figure 01.B). Similar results were obtained for proteins folding (data not shown) by following the maximum position of νCH_3 band around (2930 cm^{-1}).

Global water content in the SC was evaluated using the AUC of the OH stretching (νOH) band ($3100\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$). The spectral region $3250\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$ is associated to partially bound water while the vibrations in the $3450\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ region are due to unbound water [38, 39, 41-44]. Water content decreased significantly ($P\text{-value} < 0.05$) after UV_A irradiation (figure 01.C). This decrease is accompanied with a non-significant decrease in unbound to partially bound water ratio (figure 01.D). No significant variations on water content or mobility were observed after UV_B exposition. A possible explanation may be related to the exposure time to obtain the wanted dose (20 seconds for UV_B against 20 minutes for UV_A).

| | Reference | UV dose (mJ/cm ²) | | Number of UV exposure | Technique / methodology | Observations |
|------------------------|--------------------------|---|------------------------------------|--|--|--|
| | | UV _A | UV _B | | | |
| <i>In vivo</i> , human | Darvin et al 2006 [10] | | 30 mJ/cm ² | 1 | Resonant Raman spectroscopy | decrease in beta carotene and lycopene |
| <i>In vivo</i> , human | Laderman et al 2011 [15] | | 30 mJ/cm ² | 1 | Resonant Raman spectroscopy | |
| <i>In vivo</i> , human | Egawa et al. 2008 [17] | | 25 mJ/cm ² | 1 | confocal Raman microscopy | decrease in <i>trans</i> -UCA |
| <i>In vivo</i> , human | Tosato et al. 2015[16] | | 1300 mJ/cm ² | 1 | confocal Raman microscopy | |
| <i>In vivo</i> , human | Pearse et al. 1987 [20] | 6.10 ³ mJ/cm ² per dose | 75, 150 and 300 mJ/cm ² | UV _B 3 times weekly for 6 weeks (total of 16 times) | Biopsies, Histochemical reactions Image analyses | increase in mean epidermis thickness, SC thicknesses and mean keratinocytes height |

| | | | | | | |
|--|-----------------------------|--|------------------------------------|----------------------------|--|--|
| | | | | UV _A : 9 times | | |
| <i>In vivo</i> , human | Gambichler et al. 2005 [21] | 6.10 ⁴ mJ/cm ² per dose | 200 mJ/cm ² per dose | 3 days | Optical coherence tomography | increase in Epidermis thickness |
| <i>In vivo</i> , human | Wefers et al. 1991 [18] | 5.10 ⁴ J/cm ² | 124±39 mJ/cm ² | 3 times weekly for 3 weeks | Thin-layer Chromatography (HPTLC) | increase in the amount of Stratum Corneum lipids |
| Human skin biopsies and reconstructed human skin | Ali S. M. 2014 [33] | 9500 to 7.6.10 ⁴ mJ/cm ² | 390 to 3140 mJ/cm ² UVB | 1 | Raman spectroscopy, histological profiling | |
| <i>In vivo</i> , hairless mice | Meguro et al. 1999 [30] | | 40 mJ/cm ² | Once per day for 15 days | TEWL Electron microscopy on sections | Increased TEWL abnormalities in the bilipid layer |

| | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------|--|--|---|--|--|
| <i>Ex vivo</i> , hairless mice | Gélis et al. 2002 [19] | | 21, 105, 210 and 420 mJ/cm ² | 1 | TEWL Follow-up of the penetration of tritiated water and ¹⁴ C caffeine | Increased TEWL Higher permeability |
| <i>In vivo</i> , hairless mice | Takagi Y. et al. 2004 [31] | | 18, 37 and 75 mJ/cm ² | 1 | TEWL Lipids extraction HPTLC RT-PCR | Increased TEWL decrease in covalently bound ceramides |
| <i>In vivo</i> , hairless mice | Jun Jiang et al. 2006 [32] | | 150 mJ/cm ² | 1 | FTIR TEWL Electron microscopy | Increased TEWL Higher motional freedom of lipids |
| <i>Human skin xenographs.</i> | Yuki et al. 2010 [34] | | 40 and 200 mJ/cm ² for xenographs | | Immunofluorescence microscopy Rac activation assay | functional deterioration of tight junctions |

| | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|---|---|--|--|---|
| <i>And keratinocytes cultures</i> | | | 10 to 40 mJ/cm ² for keratinocytes culture | | Tj permeability assay with biotinylation technique | |
| Lipids | Trommer et al. 2001 [22] | 5.8.10 ⁴ to 13.8 .10 ⁸ mJ/cm ² | | | mass spectrometry | formation of new oxidative entities hydrogenation of double bonds Breaking of carbon chains |
| Lipids | Trommer et al. 2002 [23] | | 250 mJ/cm ² | | HPLC-MS: Electron Paramagnetic Resonance | |
| Ceramides and fatty acids films | 2008, Merle et al. [24] | 6.10 ⁴ and 12.10 ⁴ mJ/cm ² | | | FTIR Mass spectrometry | |
| Ceramides and fatty acids films | 2010, Merle et al. [25], | 120.10 ³ mJ/cm ² | 150 and 1500 mJ/cm ² | | FTIR Mass spectrometry | |

| | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|--|---|--|--|--|
| Stratum corneum | Biniak et al. [26] | | 16.10^4 mJ/cm ² | | | keratin-controlled stiffness remained constant |
| <i>Stratum corneum</i> | <i>2019, Berkey et al. [8]</i> | | 5.10^3 , 30.10^3 , 125.10^3 and 265.10^3 mJ/cm ² | | | intercellular strength, strain, and cohesion decreased |

Table 01: Summary of different studies (in vivo and ex vivo) of impacts of UVR on the skin structure and composition using different methods and dose

Delayed impact of UV radiations

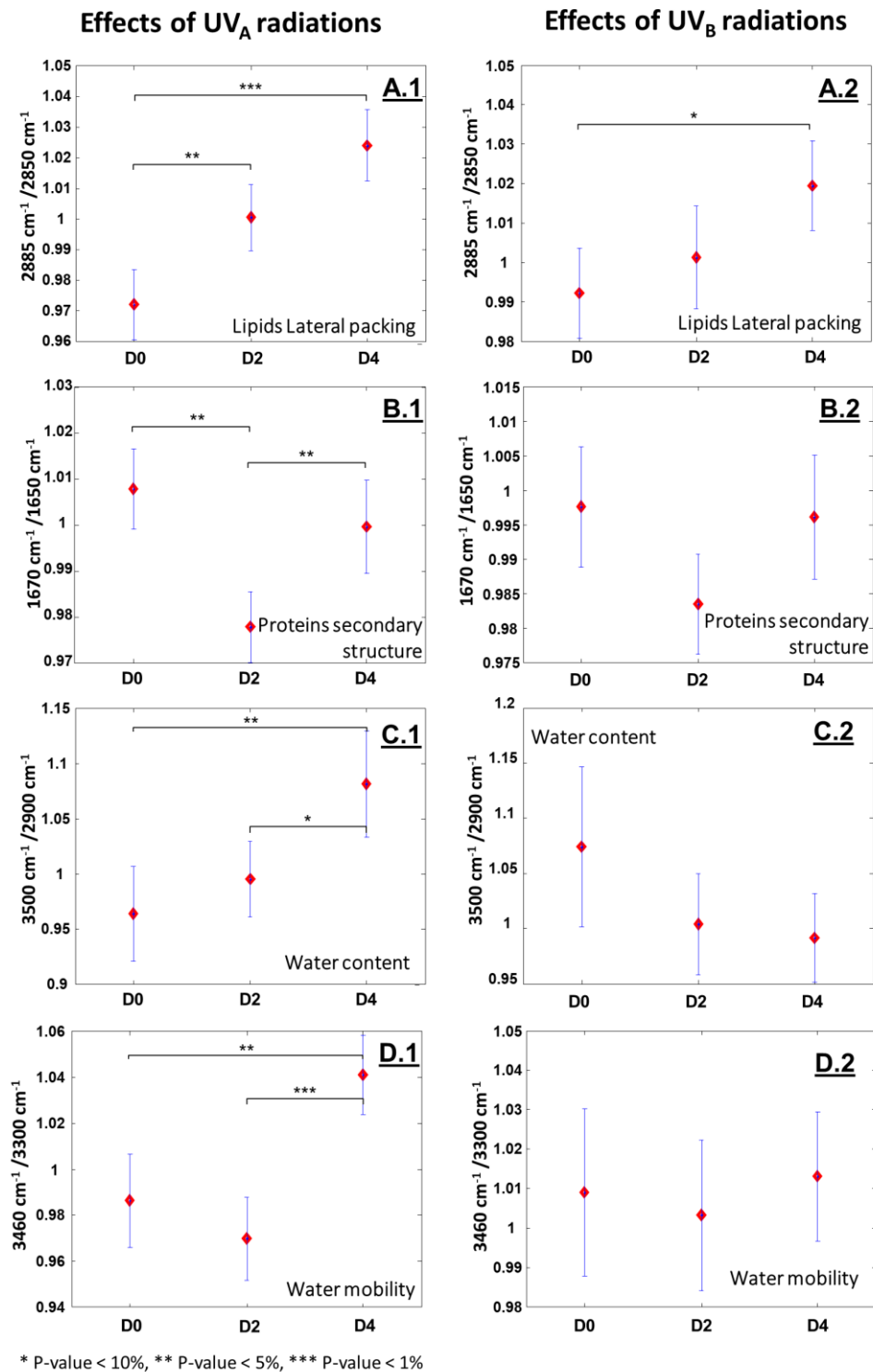


Fig. 2 Delayed effects of UV_A (.1) and UV_B (.2) radiations. A) $v_{\text{asym}}\text{CH}_2$ (2882 cm^{-1})/ $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ (2852 cm^{-1}) ratio; B) sub band at 1670 cm^{-1} / band in 1650 cm^{-1} (β sheets / α helices); C) Water content ($\nu_{\text{OH}}/\nu_{\text{CH}}$ Ratio); D) Ratio between unbound water and partially bound water

Raman measurements collected few minutes after UV irradiations revealed the direct impact of UV energy absorbed by molecular patterns within the SC. Thus, when using very low UV doses it was expected to have no marked trends between UV exposed and control zones of the skin.

Meanwhile, several studies reported delayed of UV exposure. For instance, maximum modifications were observed 30-90 minutes after irradiation for β -carotene [10, 15], 2- 4 days for TEWL (observed on hairless mice skin) [32] and 1 week for t-UCA [16, 17].

We have therefore collected *in vivo* Raman signatures at the surface of irradiated and control zones 2 and 4 days after exposure. In order to avoid the large inter-individual variability and inter-days physiological variations for each volunteer, each spectral descriptor obtained from the UV_A and UV_B irradiated areas was expressed as a function of the control area (figure 2). Thus, for a given descriptor, a value close to one is indicative to zero changes between irradiated and control.

Double bonds monitoring and CH₃/CH₂ ratio showed no changes on both UV_A and UV_B irradiated zones compared to control (data not shown).

Figure 2.1 shows the effects of 95 mJ/cm² dose of UV_A radiations at D0, D2 and D4. A complex evolution of the different molecular descriptors can be observed. A slight decrease tendency was observed in the lipids lateral packing at D0 for UV_A (figures 1.A and 2.A.1). Significant increase in the $v_{\text{asymCH}_2}/v_{\text{symCH}_2}$ ratio at D2 (D0-D2 P-value < 0.05) and D4 (D0-D4 P-value < 0.01) was observed revealing higher organization of the lipidic bilayer in the SC (figure 2.A.1).

As a direct consequence of the higher lipidic barrier function, global water content showed an increase trend at D2 followed by a significant increase at D4 (D0-D4 P-value < 0.05) (figure 2.C.1). This was due to better barrier against water loss.

The observation of the water mobility (figure 2.D.1) showed significant increase at D4 (D0-D4 P-value < 0.05). This can be directly related to a higher lipidic barrier against water loss which will mainly affect unbound water content.

Meanwhile, 2 days after UV_A exposure the relative amount of unbound water showed a non-significant decrease compared to partially bound water (figure 2.D.1). This can be explained

by a complex equilibrium between three molecular patterns within SC *i.e.* lipids lateral packing, proteins secondary structure and water mobility. At D2, a relative decrease in β sheets was observed (figure 2.B.1). Previous studies on skin drying process showed simultaneous evolution of β sheets and unbound / partially bound water ratios [38, 39, 41-44].

At Day 4, increased water holding capacity and consequently the water content induced an increase in the volume of the SC. This latter can explain the re-equilibrium between β sheets/ α helices ratio. This could be the origin of the reported thickening of SC after UV_A exposure (table 1) [19-21]. TEWL and corneometry measurements (Data not shown) seemed to be less sensitive than Raman and showed no significant variations.

At low doses, UV_B radiation did not show significant effects on the SC molecular structures (figure 2.2). However, the most significant trend was observed in the lipids' compactness (Fig. 2.A.2) (p-value 0.08). It is worthy to notice the similar evolution (even non-significant) trends for lipids lateral packing and proteins secondary structure for both UV_A and UV_B. In contrast, a very slight non-significant decrease tendency of water content was observed (figure 2.C.2).

The used UV_B dose obtained after only 20 seconds of irradiation may be below the threshold dose necessary to induce significant changes in SC features.

The significant modifications obtained at D2 and D4 may be due to indirect impact of UV_A which can go deeper than UV_B and thus could trigger a defensive process that leads to an enhancement in the lipid's barrier.

Conclusion

The aim of this study was to explore the impact of low UV doses on SC molecular patterns. A 95 mJ/cm² UV_A dose induced a loosening of the lateral packing of lipids immediately after irradiation. In contrast, the delayed impact was a tightening of the lipid barrier that conducted to an increase in the water content and mainly in the unbound water fraction. Higher water content resulted into bigger SC volume (hydrated SC) which is generally accompanied with higher relative amount of β sheets in SC proteins. Put together, these observations can explain the thickening of the SC observed by previous studies [19-21]. Based on these observations, one could suggest that UVA at low doses may have a positive impact on the SC barrier function.

15 mJ/cm² UV_B dose was apparently below the threshold to induce significant changes despite the evolution trends that were obtained in this study. Further investigations should be performed with gradually higher UV_B doses.

References

1. Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chem Phys Lipids*. 2011; 164(6): 535-43. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.04.005
2. Gruber F, Kremslehner C, Narzt M-S. The impact of recent advances in lipidomics and redox lipidomics on dermatological research. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019; 144: 256-65. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.019
3. Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chemical Biology*. 2014; 10(7): 542-51. doi: 10.1038/nchembio.1548
4. Johnson BE. The influence of radiation on the skin and the basis of protection. *International Journal of Cosmetic Science*. 1983; 5(4): 131-9. doi: 10.1111/j.1467-2494.1983.tb00334.x
5. Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio J. Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*. 2014; 19(5): 6202-19. doi: 10.3390/molecules19056202
6. Couteau C, Couteau O, Alami-El Boury S, Coiffard LJM. Sunscreen products: What do they protect us from? *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 415(1-2): 181-4. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.071
7. Battie C, Verschoore M. Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2012; 78(7): 9. doi: 10.4103/0378-6323.97350
8. Berkey C, Oguchi N, Miyazawa K, Dauskardt R. Role of sunscreen formulation and photostability to protect the biomechanical barrier function of skin. *Biochemistry and biophysics reports*. 2019; 19: 100657. doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100657
9. Lucas R, McMichael T, Smith W, Armstrong B. *Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation*. Annette P-Ü, Hajo Z, Colin M, Michael R, editors. Geneva World Health Organization 2006.
10. Darvin ME, Gersonde I, Albrecht H, Sterry W, Lademann J. In vivo Raman spectroscopic analysis of the influence of UV radiation on carotenoid antioxidant substance degradation of the human skin. *Laser Physics*. 2006; 16(5): 833-7. doi: 10.1134/S1054660X06050148
11. Gonzaga ER. Role of UV Light in Photodamage, Skin Aging, and Skin Cancer. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2009; 10(Supplement 1): 19-24. doi: 10.2165/0128071-200910001-00004
12. Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2011; 164(6): 535-43. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.04.005
13. Villaret A, Ipinazar C, Satar T, et al. Raman characterization of human skin aging. *Skin Research and Technology*. 2018; 25(3): 270-6. doi: 10.1111/srt.12643
14. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology*. 2000; 35(3): 307-16. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00098-x

15. Lademann J, Schanzer S, Meinke M, Sterry W, Darvin ME. Interaction between carotenoids and free radicals in human skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2011; 24(5): 238-44. doi: 10.1159/000326074
16. Tosato MG, Orallo DE, Ali SM, Churio MS, Martin AA, Dicelio L. Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2015; 153: 51-8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.030
17. Egawa M, Iwaki H. In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy. *Skin Res Technol*. 2008; 14(4): 410-7.
18. Wefers H, Melnik BC, Flur M, Bluhm C, Lehmann P, Plewig G. Influence of UV irradiation on the composition of human stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol*. 1991; 96(6): 959-62.
19. Gelis C, Mavon A, Delverdier M, Paillous N, Vicendo P. Modifications of in vitro skin penetration under solar irradiation: evaluation on flow-through diffusion cells. *Photochem Photobiol*. 2002; 75(6): 598-604. doi: 10.1562/0031-8655(2002)075<0598:moivsp>2.0.co;2
20. Pearse AD, Gaskell SA, Marks R. Epidermal Changes in Human Skin Following Irradiation With Either UVB or UVA. *Journal of Investigative Dermatology*. 1987; 88(1): 83-7. doi: 10.1111/1523-1747.ep12465094
21. Gambichler T, Kunzlberger B, Paech V, et al. UVA1 and UVB irradiated skin investigated by optical coherence tomography in vivo: a preliminary study. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2005; 30(1): 79-82. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01690.x
22. Trommer H. The examination of skin lipid model systems stressed by ultraviolet irradiation in the presence of transition metal ions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001; 51(3): 207-14. doi: 10.1016/s0939-6411(01)00140-0
23. Trommer H, Bottcher R, Poppl A, Hoentsch J, Wartewig S, Neubert RH. Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation. *Pharm Res*. 2002; 19(7): 982-90.
24. Merle C, Laugel C, Baillet-Guffroy A. Spectral monitoring of photoirradiated skin lipids: MS and IR approaches. *Chem Phys Lipids*. 2008; 154(1): 56-63.
25. Merle C, Laugel C, Baillet-Guffroy A. Effect of UVA or UVB irradiation on cutaneous lipids in films or in solution. *Photochem Photobiol*. 2010; 86(3): 553-62.
26. Biniek K, Levi K, Dauskardt RH. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(42): 17111-6.
27. Zanyar M, Rehman S, Rehamn I. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc*. 2007; 42(5): 493-541. doi: 10.1080/05704920701551530
28. Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal Chem*. 1964; 36: 1627-39.
29. Zhao J, Lui H, McLean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2007; 61(11): 1225-32.
30. Meguro S, Arai Y, Masukawa K, Uie K, Tokimitsu I. Stratum corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin. *Photochem Photobiol*. 1999; 69(3): 317-21. doi: 10.1562/0031-8655(1999)069<0317:caiuis>2.3.co;2

31. Takagi Y, Nakagawa H, Kondo H, Takema Y, Imokawa G. Decreased levels of covalently bound ceramide are associated with ultraviolet B-induced perturbation of the skin barrier. *J Invest Dermatol.* 2004; 123(6): 1102-9. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23491.x
32. 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. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.05.012
33. Ali SM, Bonnier F, Ptasiniski K, *et al.* Raman spectroscopic mapping for the analysis of solar radiation induced skin damage. *Analyst.* 2013; 138(14): 3946-56.
34. Yuki T, Hachiya A, Kusaka A, *et al.* Characterization of Tight Junctions and Their Disruption by UVB in Human Epidermis and Cultured Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology.* 2011; 131(3): 744-52. doi: 10.1038/jid.2010.385
35. 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. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(3): 1281-96. doi: 10.1007/s00216-010-3614-y
36. 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. doi: 10.1007/s00216-010-4389-x
37. Tfayli A, Guillard E, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Molecular interactions of penetration enhancers within ceramides organization: a Raman spectroscopy approach. *Analyst.* 2012; 137(21): 5002-10. doi: 10.1039/c2an35220f
38. Tfayli A, Jamal D, Vyumvuhore R, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Hydration effects on the barrier function of stratum corneum lipids: Raman analysis of ceramides 2, III and 5. *Analyst.* 2013; 138(21): 6582-8. doi: 10.1039/c3an00604b
39. Vyumvuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Effects of atmospheric relative humidity on stratum corneum lipids and proteins structures. Raman spectroscopy analysis. *International Journal of Cosmetic Science.* 2012; 34(4): 386-.
40. Vyumvuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Raman spectroscopy: a tool for biomechanical characterization of Stratum Corneum. *Journal of Raman Spectroscopy.* 2013; 44(8): 1077- 83.
41. 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. doi: 10.1039/c3an00716b
42. Vyumvuhore R, Tfayli A, Biniek K, *et al.* The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo. *J Biophotonics.* 2015; 8(3): 217-25. doi: 10.1002/jbio.201300169
43. Biniek K, Tfayli A, Vyumvuhore R, *et al.* Measurement of the Biomechanical Function and Structure of Ex Vivo Drying Skin Using Raman Spectral Analysis and its Modulation with Emollient Mixtures. *Exp Dermatol.* 2018; 27(8): 901-8. doi: 10.1111/exd.13721
44. Vyumvuhore R, Tfayli A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Vibrational spectroscopy coupled to classical least square analysis, a new approach for determination of skin moisturizing agents' mechanisms. *Skin Res Technol.* 2014; 20(3): 282-92. doi: 10.1111/srt.12117

Conclusion générale

Les différentes observations cliniques de la surface cutanée sont le résultat de phénomènes moléculaires complexes sous-jacents. La caractérisation de ces phénomènes permettrait d'apporter une meilleure compréhension de différents états physio-pathologiques de la peau. Cette démarche représente l'axe principal des travaux de cette thèse dont l'objectif était l'exploration de l'impact environnemental sur la peau, plus précisément les effets des rayonnements solaires au niveau de la surface cutanée et du *Stratum Corneum*, jouant un rôle majeur dans la fonction essentielle de barrière cutanée.

Dans ce cadre, les études d'investigation des effets des rayonnements solaires sur la surface cutanée ont progressé en terme de complexité moléculaire. La première partie a concerné les standards analytiques représentant les différentes classes lipidiques des LCS. Par la suite, des mélanges des LCS d'origine humaine et des échantillons de SC isolé ont été analysés. Enfin, la fonction barrière a été étudiée *in vivo* sur des volontaires humains.

L'analyse des standards analytiques individuellement a permis de suivre, étape par étape, le processus d'oxydation des classes lipidiques des LCS induit par différentes doses d'irradiations obtenues sous un simulateur solaire. Les techniques vibrationnelles sont des techniques très performantes pour suivre la peroxydation lipidique dans ses différents stades d'oxydation en suivant l'évolution des descripteurs spectroscopiques (Raman et infrarouge) indiquant des modifications structurales durant le processus notamment, l'étape d'initiation en suivant le rapport des bandes d'élongation CH_2/CH_3 , l'étape de propagation en se basant sur le rapport $(\delta\text{OH} \ \& \ \nu\text{CO})/\nu\text{C=O}$ et enfin l'étape de terminaison en mesurant le rapport $(\nu\text{C=O (Ald.)}/\nu\text{C=O})$ et le rapport *trans* $\nu\text{C=C}/$ *cis* $\nu\text{C=C}$.

Ainsi cette étude a expliqué en détail l'altération des LCS sous l'influence des rayonnements solaires. De ce fait le rôle protecteur des LCS se devait d'être examiné. De plus, il est important d'évaluer leur fonction en présence du SC. Dans cet objectif, une évaluation de l'impact des rayonnements solaires sur l'hydratation du SC en absence et en présence des LCS a été effectuée.

En absence des LCS, la spectroscopie Raman a permis de montrer une altération du captage et de l'homéostasie de l'eau dans le SC après l'irradiation solaire. Cependant, la présence des LCS confère une protection de l'hydratation du SC en renforçant le mécanisme d'absorption

d'eau et en réduisant la perte d'eau au niveau du SC. De plus, les analyses des LCS par HT-GC/MS ont permis d'exalter le rôle protecteur des LCS comme filtre optique qui absorbe une partie de l'énergie de la lumière solaire.

Par ailleurs, lorsque des doses d'irradiation élevées sont appliquées, les LCS présentent une protection limitée du SC contre les rayonnements solaires. Il est très efficace d'apporter une protection supplémentaire à l'aide de l'application des filtres solaires. Cette protection a été observée à l'aide de l'utilisation conjointe des techniques spectroscopiques et séparatives en étudiant l'évolution de l'hydratation du SC et de la composition des LCS sous irradiations en présence des filtres solaires.

Après avoir bénéficié de l'apport de la spectroscopie Raman en tant qu'une approche innovante pour étudier l'impact des rayonnements solaires sur le SC isolé, nous avons exploité cette technique non invasive afin d'étudier l'effet de ces rayonnements sur le SC humain *in vivo*. Dans cette étude, l'impact des irradiations UVA et UVB a été observé en suivant plusieurs descripteurs Raman, permettant d'étudier la structure des protéines, l'ordre organisationnel de la bicouche lipidique ainsi que la teneur en eau et la mobilité des molécules d'eau. A des doses inférieures aux DEMs, les UVB ne montrent pas un impact significatif sur le SC, cependant certaines évolutions au niveau moléculaire ont été observées. Par ailleurs, à des doses d'UVA moins intenses que les DEMs, le SC *in vivo* montre une capacité d'adaptation à cette irradiation. Ainsi, cette étude confirme la nécessité de l'utilisation des filtres solaires avec une protection étendue par rapport au domaine spectral (UVA + UVB).

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis de mettre en place des approches innovantes afin d'étudier l'impact des rayonnements solaires sur la surface cutanée et cela aux plusieurs niveaux :

- 1) Doses des rayonnements solaires (Doses inférieurs à la DEM, doses modérées et doses intenses).
- 2) Complexité moléculaire de la surface cutanée : standards analytiques, échantillons humains en *ex vivo* et *Stratum Corneum* humain en *in vivo*.
- 3) Approches analytiques : techniques spectroscopiques et techniques séparatives.
- 4) Propriétés de la barrière cutanée : informations structurales, organisationnelles et fonctionnelles.

L'ensemble des approches développées et des données obtenues durant cette thèse offre des informations fines, détaillées et pertinentes concernant l'altération de la surface cutanée sous l'influence des rayonnements solaires.

Perspectives

Les travaux réalisés pendant cette thèse nous ont permis d'observer le rôle protecteur des LCS contre les rayonnements solaires à travers l'impact de ces rayonnements sur la composition des LCS et les propriétés organisationnelles et fonctionnelles du SC. De ce fait, il serait important d'étudier les liens potentiels et les effets que peuvent avoir certaines modifications sur les autres composants, comme par exemple un éventuel impact de la modification de la composition des lipides cutanés de surface sur les compositions des lipides du *Stratum Corneum*.

Dans cet objectif, trois modèles biologiques peuvent-être étudiés :

- La culture cellulaire des kératinocytes en 2D. Ce modèle permet de suivre l'effet des rayonnements solaires au niveau moléculaire des lipides et également au niveau cellulaire des kératinocytes.
- Les modèles *in vitro* en particulier le modèle d'Epiderme Humain Reconstituit (RHE). Ce modèle offre la possibilité d'étudier l'impact des rayonnements solaires et le rôle protecteur des LCS sur l'ensemble des lipides épidermiques ainsi que sur leur biosynthèse dès le *Stratum Basale* jusqu'au *Stratum Corneum*.
- Les études *in vivo* sur le SC des volontaires humains. Ce modèle présente l'avantage d'étudier les lipides des LCS et du SC ainsi que les différentes structures et les propriétés de la barrière cutanée dans leur environnement biologique complet.

Suite aux résultats obtenus durant cette thèse, il serait important de suivre l'impact des rayonnements solaires en utilisant les modèles cités ci-dessus en présence des filtres solaires. De plus, cette proposition pourrait-être réalisée grâce aux optimisations des dispositifs développés durant cette thèse et permettant l'irradiation du SC à travers des LCS et des filtres solaires.

Afin de réaliser ces perspectives, il serait idéal de se baser sur une approche multimodale en utilisant des techniques innovantes offrant des informations complémentaires et des données analytiques pertinentes permettant d'apporter des explications chimiques à des phénomènes biologiques.

Ce projet pourrait être réalisé sur trois volets :

- Caractérisation exhaustive de l'ensemble des structures lipidiques intactes de la surface cutanée, à savoir les LCS par la HT-GC/MS et les lipides épidermiques par la chromatographie liquide en phase normale couplée à la spectrométrie de masse en haute résolution (NP-LC/HR-MSⁿ).
- L'imagerie hyperspectrale obtenue par 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. Au niveau de la culture cellulaire en 2D, il serait possible d'obtenir une cartographie d'une cellule unique contenant les signaux spectraux des différents composants au sein de la cellule (ADN, protéines, lipides...). Au niveau des modèles RHE, une détermination des propriétés de l'ensemble de l'épiderme et également de chaque couche épidermique est accessible en surface et en profondeur (épaisseur, pénétration, organisation des lipides, structures des protéines...).
- La microspectroscopie confocale Raman continue à faire ses preuves en tant qu'une technique non invasive idéale pour étudier la surface cutanée *in vivo* et également fournir des informations moléculaires.

In fine, la poursuite du développement d'une telle approche, la plus exhaustive possible, permettrait d'obtenir un lien pertinent entre les différents niveaux de la biologie cutanée et la protection contre les rayonnements solaires, exprimant au mieux le moyen le plus adapté pour la prévention de l'organe indispensable que représente la peau des dysfonctionnements induits par les agressions environnementales.

Références

1. Biniek, K., R.H. Levi K Fau - Dauskardt, and R.H. Dauskardt, *Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin*. (1091-6490 (Electronic)).
2. Dréno, B., *Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes*. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie, 2009. **136**: p. S247-S251.
3. Lampe Ma Fau - Burlingame, A.L., et al., *Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations*. (0022-2275 (Print)).
4. Arda, O., N. Göksügür, and Y. Tüzün, *Basic histological structure and functions of facial skin*. Clinics in Dermatology, 2014. **32**(1): p. 3-13.
5. Kolarsick, P.A.J., M.A. Kolarsick, and C. Goodwin, *Anatomy and Physiology of the Skin*. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 2011. **3**(4).
6. Venus, M., J. Waterman, and I. McNab, *Basic physiology of the skin*. Surgery (Oxford), 2011. **29**(10): p. 471-474.
7. McGlone, F. and D. Reilly, *The cutaneous sensory system*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2010. **34**(2): p. 148-159.
8. Uitto, J. and E.F. Bernstein, *Molecular Mechanisms of Cutaneous Aging: Connective Tissue Alterations in the Dermis*. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 1998. **3**(1): p. 41-44.
9. Agache, P., *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées Pierre Agache et al*. 2000: Edition Medicale International.
10. Laplante, A. and L. Germain. *Mécanismes de réépithélialisation des plaies cutanées : expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide d'un nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire*. 2002.
11. Jamot, M., *Aquaporins in human epidermis : expression, localisation and changes during differentiation*
Les aquaporines dans l'épiderme humain : expression, localisation et modifications au cours de la différenciation. 2011, Université Paris Sud - Paris XI.
12. Baroni, A., et al., *Structure and function of the epidermis related to barrier properties*. (1879-1131 (Electronic)).
13. Baroni, A., et al., *Structure and function of the epidermis related to barrier properties*. Clinics in dermatology, 2012. **30**(3): p. 257-262.
14. Alexandre Mélissopoulos, C.L., Ladislav Robert, Robert Ballotti, *La peau structure et physiologie*. 2012, Paris: Lavoisier.
15. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. (1167-1122 (Print)).
16. Breiden, B. and K. Sandhoff, *The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation*. (0006-3002 (Print)).
17. 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*. 2018.
18. Rigal, A., *Aspects moléculaires liés aux lipides cutanés : interactions physiologiques et corrélation en états pathologiques (acné) Molecular aspects of skin lipids: physiological interactions and correlation with pathological states (acne)*. 2021.
19. Lagrange, F. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie M.-C. Martini . 3 e édition , Ed. Médicales Internationales, Cachan (2011). 500 pp., 95 €, ISBN: 978-2-7430-1270-0*. 2012.

20. Nguyen, T.T., et al., *Characterization of Type I and IV Collagens by Raman Microspectroscopy: Identification of Spectral Markers of the Dermo-Epidermal Junction*. *Spectroscopy: An International Journal*, 2012. **27**: p. 686-183.
21. Xu, F. and T. Lu, *Skin Structure and Skin Blood Flow*, in *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*, F. Xu and T. Lu, Editors. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 7-19.
22. Agache, P., *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées / Pierre Agache ; préf. du prof. Howard I. Maibach*. Collection Explorations fonctionnelles humaines, ed. I. Maibach Howard. 2000, Cachan: Editions médicales internationales.
23. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis*. (0022-202X (Print)).
24. Greene, R.S., et al., *Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid*. *J Invest Dermatol*, 1970. **54**(3): p. 240-7.
25. Vantrou, M., P.Y. Venencie, and J.C. Chaumeil, *Les lipides cutanés de surface chez l'homme: origine, synthèse, régulation; Skin surface lipids in man. Origin, biogenesis, regulation*. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 1987. **114**(9): p. 1115-1129.
26. Sheu, H.M., et al., *Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum*. (0007-0963 (Print)).
27. Zouboulis, C.C., *Acne and sebaceous gland function*. (0738-081X (Print)).
28. Schneider, M.R. and R. Paus, *Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(2): p. 181-5.
29. Schneider, M.R. and R. Paus, *Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010. **42**(2): p. 181-185.
30. Camera, E., M. Ottaviani, and M. Picardo, *Squalene Chemistry and Biology*, in *Lipids and Skin Health*, A. Pappas, Editor. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 185-198.
31. Downing, D.T. and J.S. Strauss, *Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1974. **62**(3): p. 228-244.
32. Stewart, M.E., et al., *Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls*. (0003-987X (Print)).
33. Pappas, A., T. Fantasia J Fau - Chen, and T. Chen, *Age and ethnic variations in sebaceous lipids*. (1938-1972 (Print)).
34. Nicolaides, N., *Skin lipids: their biochemical uniqueness*. *Science*, 1974. **186**(4158): p. 19-26.
35. Camera, E., et al., *Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry*. (1539-7262 (Electronic)).
36. Michael-Jubeli, R., J. Bleton, and A. Baillet-Guffroy, *High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(1): p. 143-51.
37. Boniforti, L., et al., *Skin surface lipids. Identification and determination by thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography*. *Clinica Chimica Acta*, 1973. **47**(2): p. 223-231.
38. Downing Dt Fau - Greene, R.S. and R.S. Greene, *Double bond positions in the unsaturated fatty acids of vernix caseosa*. (0022-202X (Print)).

39. Downing, D.T., J.S. Strauss, and P.E. Pochi, *Variability in the Chemical Composition of Human Skin Surface Lipids**. Journal of Investigative Dermatology, 1969. **53**(5): p. 322-327.
40. Strauss, J.S., P.E. Pochi, and D.T. Downing, *The Sebaceous Glands: Twenty-Five Years Of Progress*. Journal of Investigative Dermatology, 1976. **67**(1): p. 90-97.
41. Pappas, A., *Epidermal surface lipids*. Dermatoendocrinol, 2009. **1**(2): p. 72-6.
42. Huang, Z.R., Y.K. Lin, and J.Y. Fang, *Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology*. Molecules, 2009. **14**(1): p. 540-54.
43. Kohno, Y., et al., *Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol*. (0006-3002 (Print)).
44. Kärkkäinen, J., et al., *Lipids of Vernix Caseosa**From the Department of Medical Chemistry, University of Turku, Finland*. Journal of Investigative Dermatology, 1965. **44**(5): p. 333-338.
45. Nicolaidis, N., et al., *The fatty acids of wax esters and sterol esters from vernix caseosa and from human skin surface lipid*. Lipids, 1972. **7**(8): p. 506-17.
46. Haahti E Fau - Horning, E.C. and E.C. Horning, *Isolation and characterization of saturated and unsaturated fatty acids and alcohols of human skin surface lipids*. (0036-5513 (Print)).
47. Ansari, M.N.A., H.C. Fu, and N. Nicolaidis, *Fatty acids of the alkane diol diesters of vernix caseosa*. Lipids, 1970. **5**(2): p. 279-282.
48. Saint-LÉGÉR, D. and J.L. LÉVÉQue, *Les methodes d'évaluation quantitative des lipides de surface chez l'homme. Présentation d'une nouvelle procédure*. International Journal of Cosmetic Science, 1980. **2**(6): p. 283-294.
49. Shalita, A.R., *Genesis of free fatty acids*. J Invest Dermatol, 1974. **62**(3): p. 332-5.
50. Brancalion, L., M.P. Bamberg, and N. Kollias, *Spectral Differences between Stratum Corneum and Sebaceous Molecular Components in the Mid-IR*. Applied Spectroscopy, 2000. **54**(8): p. 1175-1182.
51. Knox, S. and N.M. O'Boyle, *Skin lipids in health and disease: A review*. (1873-2941 (Electronic)).
52. Radner, F.P. and J. Fischer, *The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function*. (0006-3002 (Print)).
53. Sjövall, P., et al., *Imaging the distribution of skin lipids and topically applied compounds in human skin using mass spectrometry*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 16683.
54. Sadowski, T., et al., *Large-scale human skin lipidomics by quantitative, high-throughput shotgun mass spectrometry*. (2045-2322 (Electronic)).
55. Pablo, G., et al., *Characteristics of the extracellular lipases from Corynebacterium acnes and Staphylococcus epidermidis*. J Invest Dermatol, 1974. **63**(2): p. 231-8.
56. Knox, S. and N.M. O'Boyle, *Skin Lipids in Health and Disease: A Review*. Chemistry and Physics of Lipids, 2021: p. 105055.
57. Feingold, K.R., *The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin*. (0022-2275 (Print)).
58. Elias, P.M., et al., *Basis For Abnormal Desquamation And Permeability Barrier Dysfunction in RXLI*. Journal of Investigative Dermatology, 2004. **122**(2): p. 314-319.

59. Smith, K.R. and D.M. Thiboutot, *Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe?* J Lipid Res, 2008. **49**(2): p. 271-81.
60. Yardley HJ Fau - Summerly, R. and R. Summerly, *Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis.* (0163-7258 (Print)).
61. Picardo, M., et al., *Sebaceous gland lipids.* Dermato-endocrinology, 2009. **1**(2): p. 68-71.
62. Zouboulis, C.C., et al., *Frontiers in sebaceous gland biology and pathology.* (1600-0625 (Electronic)).
63. Mavon, A., et al., *Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites.* Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 1997. **8**(3): p. 147-155.
64. Pilgram, G.S.K., et al., *The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum.* Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2001. **1511**(2): p. 244-254.
65. Man, M.Q., et al., *Variation of Skin Surface pH, Sebum Content and Stratum Corneum Hydration with Age and Gender in a Large Chinese Population.* Skin Pharmacology and Physiology, 2009. **22**(4): p. 190-199.
66. Fluhr, J.W., et al., *Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice.* (0022-202X (Print)).
67. Thiele, J.J., S.U. Weber, and L. Packer, *Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin.* J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1006-10.
68. Freinkel, R.K. and Y. Shen, *The Origin of Free Fatty Acids in Sebum II: Assay of the Lipases of the Cutaneous Bacteria and Effects of pH*.* Journal of Investigative Dermatology, 1969. **53**(6): p. 422-427.
69. Stefaniak, A.B. and C.J. Harvey, *Dissolution of materials in artificial skin surface film liquids.* (0887-2333 (Print)).
70. Wille, J.J. and A. Kydonieus, *Palmitoleic acid isomer (C16:1delta6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria.* (1422-2868 (Print)).
71. Coderch, L., et al., *Ceramides and skin function.* (1175-0561 (Print)).
72. Boncheva, M., *The physical chemistry of the stratum corneum lipids.* (1468-2494 (Electronic)).
73. Feingold, K.R. and P.M. Elias, *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier.* (0006-3002 (Print)).
74. Christophers, E. and A.M. Kligman, *Visualization of the Cell Layers of the Stratum Corneum.* Journal of Investigative Dermatology, 1964. **42**(6): p. 407-409.
75. Simonetti, O., et al., *Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy.* (0340-3696 (Print)).
76. Michaels, A.S., S.K. Chandrasekaran, and J.E. Shaw, *Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement.* AIChE Journal, 1975. **21**(5): p. 985-996.
77. Norlén, L., et al., *Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo.* (0022-202X (Print)).

78. Janssens M Fau - van Smeden, J., et al., *Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema*. (1523-1747 (Electronic)).
79. Feingold, K.R., *Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(12): p. 2531-46.
80. van Smeden, J., et al., *Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes*. (0006-3002 (Print)).
81. Rabionet, M., K. Gorgas, and R. Sandhoff, *Ceramide synthesis in the epidermis*. (0006-3002 (Print)).
82. van Smeden, J. and J.A. Bouwstra, *Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients*. *Current Problems in Dermatology*, 2016. **49**: p. 8-26.
83. van Smeden, J., et al., *The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function*. (0006-3002 (Print)).
84. Vyumvuhore, R., *Validation and implementation of hydration and mechanical descriptors of stratum corneum ex vivo and in vivo*

Validation et implémentation des descripteurs de l'hydratation et des propriétés mécaniques du stratum corneum ex vivo et in vivo. 2013, Université Paris Sud - Paris XI.

85. Fluhr, J.W., R. Darlenski, and C. Surber, *Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions*. *British Journal of Dermatology*, 2008. **159**(1): p. 23-34.
86. Rawlings, A.V., et al., *Stratum corneum moisturization at the molecular level*. (0022-202X (Print)).
87. Denecker, G., et al., *Caspase-14 reveals its secrets*. (1540-8140 (Electronic)).
88. Holleran, W.M., Y. Takagi Y Fau - Uchida, and Y. Uchida, *Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders*. (0014-5793 (Print)).
89. Jantzen, A., *Connaissances des bienfaits et des méfaits du Soleil sur la peau et de la photoprotection. Enquête auprès des étudiants en médecine et en pharmacie de Rouen*. 2018. p. 166.
90. *Formation de la couche d'ozone*. Available from: <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/pollution-atmospherique/enjeux/couche-ozone/appauvrissement-consequences/a-propos.html>.
91. Wacker, M. and M.F. Holick, *Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health*. (1938-1972 (Print)).
92. Feldman, S.R., et al., *Ultraviolet exposure is a reinforcing stimulus in frequent indoor tanners*. (1097-6787 (Electronic)).
93. Juzeniene A Fau - Moan, J. and J. Moan, *Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production*. (1938-1980 (Electronic)).
94. Wintzen, M., et al., *Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes*. (0022-202X (Print)).
95. Miyamura, Y., et al., *Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation*. (0893-5785 (Print)).
96. Johnson, B.E., *The influence of radiation on the skin and the basis of protection*. *International Journal of Cosmetic Science*, 1983. **5**(4): p. 131-139.
97. El khoury, R., *Prévention des problèmes d'hyperpigmentation cutanée induits par les rayonnements ultraviolets et régulation par l'application d'huiles essentielles de plantes d'origine libanaise*. 2019.

98. Gélis, C., et al., *Modifications of In Vitro Skin Penetration Under Solar Irradiation: Evaluation on Flow-through Diffusion Cells*. Photochemistry and Photobiology, 2002. **75**(6): p. 598-604.
99. Pearse, A.D., S.A. Gaskell, and R. Marks, *Epidermal Changes in Human Skin Following Irradiation With Either UVB or UVA*. Journal of Investigative Dermatology, 1987. **88**(1): p. 83-87.
100. Gambichler, T., et al., *UVA1 and UVB irradiated skin investigated by optical coherence tomography in vivo: a preliminary study*. (0307-6938 (Print)).
101. *Le rayonnement solaire et la peau*. Available from: <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article67>.
102. Prusinowski, A., *Les médicaments photosensibilisants : Conseils à l'officine*. 2018.
103. Pinnell, S.R., *Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(1): p. 1-19; quiz 20-2.
104. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
105. Pritchard, K.A., Jr., et al., *Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17621-4.
106. Poyton, R.O., et al., *Mitochondria and hypoxic signaling: a new view*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1177**: p. 48-56.
107. Bolton, J.L., et al., *Role of quinones in toxicology*. (0893-228X (Print)).
108. Yildirim, A., et al., *Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (Tilia argentea Desf ex DC), sage (Salvia triloba L.), and black tea (Camellia sinensis) extracts*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(10): p. 5030-4.
109. Bhattacharyya A Fau - Chattopadhyay, R., et al., *Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases*. (1522-1210 (Electronic)).
110. Brenner, M. and V.J. Hearing, *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. (0031-8655 (Print)).
111. Comte, C., et al., *Les UVA-1 : propriétés et indications thérapeutiques*. Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 2007. **134**(4, Part 1): p. 407-415.
112. de Gruijl, F.R., *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB*. (0076-6879 (Print)).
113. Hsieh, R.J. and J.E. Kinsella, *Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish*. Advances in food and nutrition research, 1989. **33**: p. 233-341.
114. Shichiri, M., Y. Yoshida, and E. Niki, *Chapter 4 - Unregulated Lipid Peroxidation in Neurological Dysfunction*, in *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health*, R.R. Watson and F. De Meester, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 31-55.
115. Spiteller, G., *Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. **95**(2): p. 105-162.
116. Sylvie, E., *Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chincharde (Trachurus trachurus) : choix des procédés*. 2003, PhD thesis, Ecole polytechnique de l'Université de Nantes, France.
117. Lorrain, B., *Modélisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le compartiment gastrique : inhibition de l'oxydation lipidique initiée par la metmyoglobine dans des émulsions stabilisées par la sérum albumine ou les phospholipides*. 2008. p. 1 vol. (319 p.).

118. O'Keefe, S.F., V.A. Wiley, and D.A. Knauft, *Comparison of oxidative stability of high- and normal-oleic peanut oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993. **70**(5): p. 489-492.
119. Uchida, K., *Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases*. (0891-5849 (Print)).
120. Leonarduzzi, G., et al., *4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis*. (1613-4125 (Print)).
121. Janero, D.R., *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. (0891-5849 (Print)).
122. Dahle Lk Fau - Hill, E.G., R.T. Hill Eg Fau - Holman, and R.T. Holman, *The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters*. (0003-9861 (Print)).
123. Pryor Wa Fau - Stanley, J.P., E. Stanley Jp Fau - Blair, and E. Blair, *Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides*. (0024-4201 (Print)).
124. Yaacoub, R., *Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux : intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés*. 2009. p. 1 vol. (337 p.).
125. Niki, E., *Lipid oxidation in the skin*. (1029-2470 (Electronic)).
126. Thiele, J.J., L. Traber Mg Fau - Packer, and L. Packer, *Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation*. (0022-202X (Print)).
127. De Luca, C. and G. Valacchi, *Surface Lipids as Multifunctional Mediators of Skin Responses to Environmental Stimuli*. Mediators of Inflammation, 2010. **2010**: p. 321494.
128. Hayakawa, K. and I. Matsuo, *Effects of PUVA therapy on skin surface lipids: skin surface lipid peroxidation in psoriasis vulgaris and its biological significance*. (0385-0005 (Print)).
129. Beadle, P.C. and J.L. Burton, *Absorption of ultraviolet radiation by skin surface lipid*. British Journal of Dermatology, 1981. **104**(5): p. 549-551.
130. Bickers, D.R. and M. Athar, *Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease*. (1523-1747 (Electronic)).
131. Niki, E., *Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(5): p. 469-84.
132. Yin, H., E. Niki, and K. Uchida, *Special issue on "Recent progress in lipid peroxidation based on novel approaches"*. Free Radic Res, 2015. **49**(7): p. 813-5.
133. Kramer, K.A. and D.C. Liebler, *UVB induced photooxidation of vitamin E*. (0893-228X (Print)).
134. Ekanayake-Mudiyansele, S., et al., *Vitamin E delivery to human skin by a rinse-off product: penetration of alpha-tocopherol versus wash-out effects of skin surface lipids*. (1660-5527 (Print)).
135. Pekiner, B.D. *VITAMIN E AS AN ANTIOXIDANT : E VİTAMİNİNİN ANTIOKSİDAN ROLÜ*. 2003.
136. Grams, G.W., *Oxidation of alpha-tocopherol by singlet oxygen*. Tetrahedron Letters, 1971. **12**(50): p. 4823-4825.
137. De Vaugelade, S., et al., *UV-vis degradation of α -tocopherol in a model system and in a cosmetic emulsion—Structural elucidation of photoproducts and toxicological consequences*. Journal of Chromatography A, 2017. **1517**: p. 126-133.

138. Tang, C., et al., *Identification of α -Tocopherol and Its Oxidation Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020. **68**(2): p. 669-677.
139. Ohsawa K Fau - Watanabe, T., et al., *The possible role of squalene and its peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage caused by U.V. irradiation*. (0388-1350 (Print)).
140. Picardo, M., et al., *Role of skin surface lipids in UV-induced epidermal cell changes*. Archives of Dermatological Research, 1991. **283**(3): p. 191-197.
141. Karatas, F., M. Karatepe, and A. Baysar, *Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 2002. **311**(1): p. 76-9.
142. Zelzer, S., et al., *Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry—Comparison with high-performance liquid chromatography methology*. Free radical research, 2013. **47**.
143. Young, I.S. and E.R. Trimble, *Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. Ann Clin Biochem, 1991. **28 (Pt 5)**(0004-5632 (Print)): p. 504-8.
144. Dong, X., J. Tang, and X. Chen, *Sensitive determination of malondialdehyde in rat prostate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 3990.
145. Yonny, M.E., et al., *Development of a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2017. **2017**: p. 4327954.
146. Muik, B., et al., *Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy*. Chemistry and Physics of Lipids, 2005. **134**(2): p. 173-182.
147. Machado, N.F.L., et al., *The autooxidation process in linoleic acid screened by Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2012. **43**(12): p. 1991-2000.
148. Guillén, M.D. and N. Cabo, *Usefulness of the Frequency Data of the Fourier Transform Infrared Spectra To Evaluate the Degree of Oxidation of Edible Oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(2): p. 709-719.
149. Agbenyega, J.K., M. Claybourn, and G. Ellis, *A study of the autoxidation of some unsaturated fatty acid methyl esters using Fourier transform Raman spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1991. **47**(9): p. 1375-1388.
150. Fan, Y., S. Li, and D.-P. Xu, *Raman Spectra of Oleic Acid and Linoleic Acid*. Guang pu xue yu guang pu fen xi = Guang pu, 2013. **33**: p. 3240-3.
151. Hiltenbrand, V. *Place de la peroxydation lipidique dans les effets délétères des UV-A : mise en évidence des haptènes amino-imino-propène : intérêts potentiels des antioxydants lipophiles en cosmétologie*. 1999.
152. Kaidbey, K.H., et al., *Photoprotection by melanin—a comparison of black and Caucasian skin*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1979. **1**(3): p. 249-260.
153. Ha, T., et al., *The relationship between constitutive pigmentation and sensitivity to ultraviolet radiation induced erythema is dose-dependent*. (0893-5785 (Print)).
154. Del Bino, S., et al., *Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type*. (0893-5785 (Print)).

155. Lacour, J.P. and J.C. Béani, *Photoprotection naturelle, photoprotection externe (topique et vestimentaire)*. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie, 2007. **134**(5, Part 2): p. 18-24.
156. Darwin, M.E., et al., *In vivo Raman spectroscopic analysis of the influence of UV radiation on carotenoid antioxidant substance degradation of the human skin*. Laser Physics, 2006. **16**(5): p. 833-837.
157. Lademann, J., et al., *Interaction between carotenoids and free radicals in human skin*. (1660-5535 (Electronic)).
158. Béani, J.-C., *L'amélioration de la défense antioxydante endogène : une piste pour la prévention des cancers cutanés*. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2001. **185**(8): p. 1507-1527.
159. Amblard, P., et al., *Statistical study of individual variations in sunburn sensitivity in 303 volunteers without photodermatosis*. Archives of Dermatological Research, 1982. **274**(3): p. 195-206.
160. Tosato, M.G., et al., *Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015. **153**: p. 51-58.
161. Egawa, M. and H. Iwaki, *In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy*. Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI), 2008. **14**(4): p. 410-7.
162. Assi, A., et al., *Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy*. Eur J Dermatol, 2022.
163. Ito, I., et al. *Protective Effect of Chitin Urocanate Nanofibers against Ultraviolet Radiation*. Marine Drugs, 2015. **13**, 7463-7475 DOI: 10.3390/md13127076.
164. Gambichler, T., J. Laperre, and K. Hoffmann, *The European standard for sun-protective clothing: EN 13758*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2006. **20**(2): p. 125-130.
165. Robson, J. and B.L. Diffey, *Textiles and sun protection*. (0905-4383 (Print)).
166. Gambichler, T., K. Laperre J Fau - Hoffmann, and K. Hoffmann, *The European standard for sun-protective clothing: EN 13758*. (0926-9959 (Print)).
167. Palm, M.D. and M.N. O'Donoghue, *Update on photoprotection*. (1529-8019 (Electronic)).
168. Miksa, S., D. Lutz, and C. Guy, *New approach for a reliable in vitro sun protection factor method Part I: Principle and mathematical aspects*. (1468-2494 (Electronic)).
169. Colthup, N.B., L.H. Daly, and S.E. Wiberley, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 3rd ed. 1990, Boston: Academic Press. xii, 547 p.
170. Müller, U., *M. Diem: Introduction to modern vibrational spectroscopy*, J. Wiley, New York, Chichester, 1993, ISBN 0-471-59584-5, 285 Seiten, Preis: £ 49.50. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1994. **98**(10): p. 1347-1348.
171. McCreery, R.L., *Raman spectroscopy for chemical analysis*. Chemical analysis. 2000, New York: John Wiley & Sons. xxiv, 420 p.
172. Michelet, A., et al., *Utilisation de la spectrométrie Raman dans le domaine pharmaceutique; Use of Raman spectrometry in the pharmaceutical field*. STP pharma pratiques, 2013. **23**(2): p. 97-117.

173. Caspers, P.J., et al., *In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles*. (0022-202X (Print)).
174. Caspers, P.J., et al., *In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin*. (1075-4261 (Print)).
175. Tfaili, S., *Caractérisation par microspectroscopie confocale Raman de la diffusion cutanée d'actif : optimisation des paramètres instrumentaux et méthodologiques en vue d'applications in vivo*. 2012.
176. Czamara, K., et al., *Raman spectroscopy of lipids: a review*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015. **46**(1): p. 4-20.
177. Guillard, E., et al., *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part II: effect of chains lengths and head group structures*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **399**(3): p. 1201-13.
178. Tfayli, A., et al., *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **397**(3): p. 1281-96.
179. Beattie, J.R., S.E.J. Bell, and B.W. Moss, *A critical evaluation of Raman spectroscopy for the analysis of lipids: Fatty acid methyl esters*. *Lipids*, 2004. **39**(5): p. 407-419.
180. Choe, C., J. Lademann, and M.E. Darvin, *A depth-dependent profile of the lipid conformation and lateral packing order of the stratum corneum in vivo measured using Raman microscopy*. *Analyst*, 2016. **141**(6): p. 1981-7.
181. Vyumvuhore, R., et al., *Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis*. *Analyst*, 2013. **138**(14): p. 4103-4111.
182. Levchenko, S.A.-O.X. and J.A.-O. Qu, *Biomolecular Component Analysis of Phospholipids Composition in Live HeLa Cells*. LID - 10.3390/bios8040123 [doi] LID - 123. (2079-6374 (Electronic)).
183. Michael-Jubeli, R., *Stratégies analytiques et comparaison chimométrique de mélanges lipidiques complexes : composition, caractérisation et évolutions physiologiques du film hydrolipidique cutané*. 2011.
184. Quatela, A., et al., *In vivo Raman Microspectroscopy: Intra- and Intersubject Variability of Stratum Corneum Spectral Markers*. (1660-5535 (Electronic)).
185. Bakar, J., *Etude de la biosynthèse lipidique au cours de la différenciation kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée*. 2021.
186. Pudlas, M., et al., *Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells*. (1937-3392 (Electronic)).
187. Tfayli, A., et al., *Raman spectroscopy: feasibility of in vivo survey of stratum corneum lipids, effect of natural aging*. (1167-1122 (Print)).
188. Egawa, M., M. Hirao T Fau - Takahashi, and M. Takahashi, *In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy*. (0001-5555 (Print)).
189. Tfayli, A., et al., *Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy*. (0175-7571 (Print)).
190. Potts, R.O. and M.L. Francoeur, *Lipid biophysics of water loss through the skin*. (0027-8424 (Print)).
191. Gniadecka, M., et al., *Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail*. (0022-202X (Print)).
192. Tfayli, A., et al., *Hydration effects on the barrier function of stratum corneum lipids: Raman analysis of ceramides 2, III and 5*. *Analyst*, 2013. **138**(21): p. 6582-6588.

193. Vyumvuhore, R., et al., *The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo*. (1864-0648 (Electronic)).
194. Quatela, A., A. Tfayli, and A. Baillet-Guffroy, *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*, 2016. **22**(1): p. 75-80.
195. De Bruyne, S., M.M. Speeckaert, and J.R. Delanghe, *Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting*. (1549-781X (Electronic)).
196. Caussin, J., J.A. Gooris Gs Fau - Bouwstra, and J.A. Bouwstra, *FTIR studies show lipophilic moisturizers to interact with stratum corneum lipids, rendering the more densely packed*. (0006-3002 (Print)).
197. Caussin, J., et al., *Interaction of lipophilic moisturizers on stratum corneum lipid domains in vitro and in vivo*. (1660-5527 (Print)).
198. Cai, S.S. and J.A. Syage, *Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for analysis of fatty acid and acylglycerol lipids*. (0021-9673 (Print)).
199. Nazzaro-Porro M Fau - Passi, S., et al., *Effects of aging on fatty acids in skin surface lipids*. (0022-202X (Print)).
200. James At Fau - Wheatley, V.R. and V.R. Wheatley, *Studies of sebum. 6. The determination of the component fatty acids of human forearm sebum by gas-liquid chromatography*. (0264-6021 (Print)).
201. Nordstrom Km Fau - Labows, J.N., et al., *Characterization of wax esters, triglycerides, and free fatty acids of follicular casts*. (0022-202X (Print)).
202. Green Sc Fau - Stewart, M.E., D.T. Stewart Me Fau - Downing, and D.T. Downing, *Variation in sebum fatty acid composition among adult humans*. (0022-202X (Print)).
203. Fitzgerald, M. and R.C. Murphy, *Electrospray mass spectrometry of human hair wax esters*. (0022-2275 (Print)).
204. Yamamoto, A., et al., *Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters*. (0022-202X (Print)).
205. Vrkoslav, V., J. Urbanová K Fau - Cvacka, and J. Cvacka, *Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*. (1873-3778 (Electronic)).
206. Marzouki, Z.M., K.S. Taha Am Fau - Gomaa, and K.S. Gomaa, *Fatty acid profiles of sebaceous triglycerides by capillary gas chromatography with mass-selective detection*.
207. Smith, R.N., et al., *The effect of a low glycemic load diet on acne vulgaris and the fatty acid composition of skin surface triglycerides*. (0923-1811 (Print)).
208. Marzouki, Z.M., K.S. Taha Am Fau - Gomma, and K.S. Gomma, *Variability in the composition of human skin surface lipids in tropical climates*. (0041-3232 (Print)).
209. Bonté, F., et al., *Analysis of all stratum corneum lipids by automated multiple development high-performance thin-layer chromatography*. (1572-6495 (Print)).
210. Pappas, A., et al., *Sebum analysis of individuals with and without acne*. (1938-1980 (Electronic)).
211. Robosky, L.C., et al., *Quantitative evaluation of sebum lipid components with nuclear magnetic resonance*. (0022-2275 (Print)).
212. Myher, J.J. and A. Kuksis, *General strategies in chromatographic analysis of lipids*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995. **671**(1): p. 3-33.

213. Rigal, A., et al., *Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age*. *LID* - 10.1684/ejd.2020.3753 [doi]. (1952-4013 (Electronic)).
214. Myher, J.J., A. Kuksis, and S. Pind, *Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human erythrocytes: Improved method of analysis*. *Lipids*, 1989. **24**(5): p. 396-407.
215. Myher, J.J., et al., *Stereospecific analysis of triacylglycerols rich in long-chain polyunsaturated fatty acids*. *Lipids*, 1996. **31**(2): p. 207-215.
216. Vyumvuhore, R., et al., *Vibrational spectroscopy coupled to classical least square analysis, a new approach for determination of skin moisturizing agents' mechanisms*. (1600-0846 (Electronic)).
217. Biniek, K., et al., *Measurement of the biomechanical function and structure of ex vivo drying skin using raman spectral analysis and its modulation with emollient mixtures*. (1600-0625 (Electronic)).
218. Galliano, M.-F., et al., *Comprehensive characterization of the structure and properties of human stratum corneum relating to barrier function and skin hydration: modulation by a moisturizer formulation*. *Experimental Dermatology*, 2021. **30**(9): p. 1352-1357.

Productions scientifiques

Articles scientifiques :

- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Baillet-Guffroy A., Tfayli A., "Characterization of free fatty acids photo-oxidation under UV radiations: A stepwise Raman study", *Journal of Raman Spectroscopy*, 2022.
- **Assi A.**, Tfaili S., Quatela A., Bonnier F., Baillet-Guffroy A., Tfayli A., "Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy", *European Journal of Dermatology*, 2022.
- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Jacques C., Baillet-Guffroy A., Duplan H., Tfayli A., "Characterization of triglycerides photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman study", *Soumise dans Journal of Raman Spectroscopy*.
- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Jacques C., Duplan H., Baillet-Guffroy A., Tfayli A., "Skin Surface Lipids photo-oxidation : a vibrational spectroscopy study", *Soumise dans Journal of Raman Spectroscopy*.
- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Duplan H., Baillet-Guffroy A., Jacques C., Tfayli A., "Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration: part I, protective role of Skin surface lipids", *A soumettre*
- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Duplan H., Baillet-Guffroy A., Tfayli A., Jacques C., "Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration: Part II, protective action of solar filters", *A soumettre*

Communication orale :

- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Jacques C., Baillet-Guffroy A., Duplan H., Tfayli A., "Effects of solar radiations on Stratum Corneum hydration : Protective role of skin surface lipids and solar filters efficacy", *19th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules –(ECSBM)*, Reims, 2022

Communications affichées :

- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Baillet-Guffroy A., Tfayli A., "Characterization of fatty acids photooxidation under UV radiations: a stepwise Raman and FTIR study", *Journée de l'Ecole Doctorale (JED) 2mib*, Université Paris-Saclay, 2022.

- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Tfaili S., Baillet-Guffroy A., Tfayli A., “ Studying the effects of suberythemal UV doses on human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy”, ***Cosmetic Measurement and Testing (COMET)***, Cergy, 2022.
- **Assi A.**, Michael-Jubeli R., Jacques C., Baillet-Guffroy A., Duplan H., Tfayli A., “Solar radiations alter *Stratum Corneum* water homeostasis : protective role and limitation of skin surface lipids”, ***Conférence PhysChemCell***, ENS Paris-Saclay, 2022

Annexes

Annexe 1 :

I) Analyse Raman et infrarouge des films lipidiques

1) Prétraitement des données :

a) Elimination du bruit (Lissage) :

Le signal Raman se distingue du bruit propre au système de détection utilisé. Pour bien identifier et analyser le signal, il faut filtrer le bruit et éliminer les distorsions éventuelles. Les techniques de lissage souvent utilisées sont : moyenner sur un certain nombre de points (moyenne flottante) et l'algorithme de Savitzky-Golay [1]. Dans cette thèse la méthode utilisée est la méthode de Savitzky-Golay.

b) Correction de la ligne de base :

Les spectres obtenus lors des acquisitions sont composés essentiellement de deux parties majeures : la luminescence qui se définit comme un phénomène d'absorption et de réémission d'un rayonnement, et le signal Raman qui est la diffusion stokes et anti-stokes du rayonnement incident. L'interférence spectrale avec la luminescence (sous forme de fond continu des spectres) varie d'une mesure à une autre. Raison pour laquelle il est indispensable de l'éliminer avant d'analyser l'effet Raman d'un échantillon. Différentes méthodes ont été jusqu'alors utilisées sans toutefois obtenir une méthode universelle pour toute sorte de données. L'enjeu est de pouvoir mesurer les surfaces et/ou les intensités des pics Raman dépourvues de la luminescence sans déformer les profils des pics ; comme la largeur des bandes. Pour nos études, j'ai développé une nouvelle fonction sous l'environnement Matlab (BaselineFit) basée sur une correction polynomiale avec n itérations.

- **Fonction BaselineFit :**

Cette fonction est basée sur la correction polynomiale [2]. Tout d'abord on fait une régression des intensités du spectre sur les nombres d'ondes (Figure 1). Si on soustrait la courbe de régressions du spectre, on pourra perdre de l'information (les bandes au-dessous de la courbe de régression).

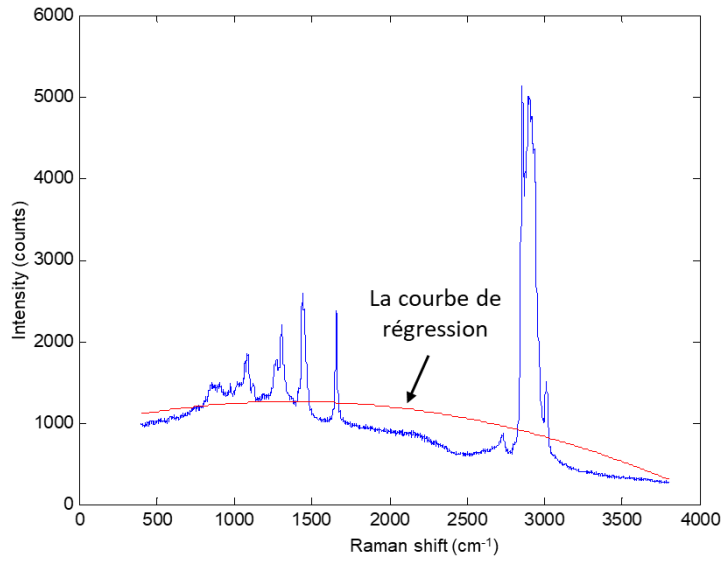


Figure 1 : Régression des intensités sur les nombres d'ondes.

Alors on doit modifier la courbe de régression. Pour cela, pour ne pas perdre de l'information, on doit remplacer les points de la courbe de régression qui sont au-dessus du spectre par les points originaux du spectre. C-à-d si le $n^{\text{ème}}$ point de la courbe de régression est supérieur au $n^{\text{ème}}$ point du spectre d'origine, alors on remplace le $n^{\text{ème}}$ point de la courbe de régression par celui du spectre d'origine (Figure 2).

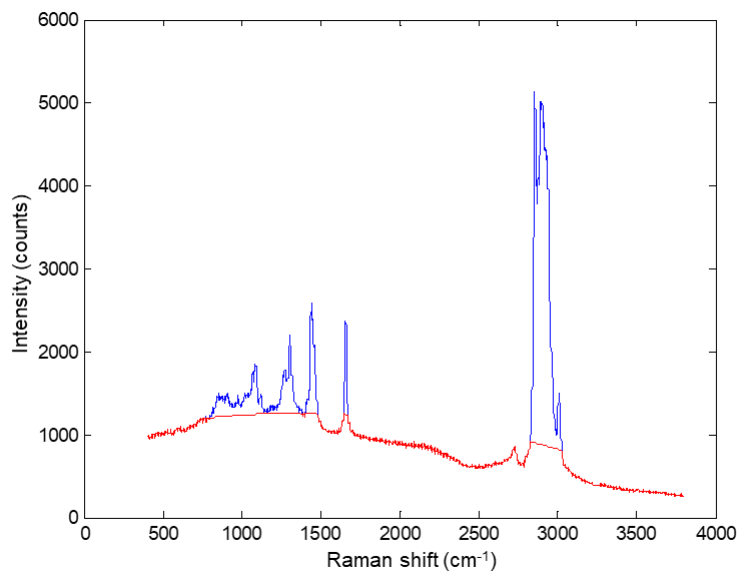


Figure 2 : Modification de la courbe de régression.

On obtient une nouvelle courbe (Figure 3.A). Alors on considère cette courbe comme étant le nouveau spectre et on refait une deuxième régression de l'ordre désiré (il pourrait être différent de l'ordre choisi lors de la régression sur le spectre brut) (Figure 3.B).

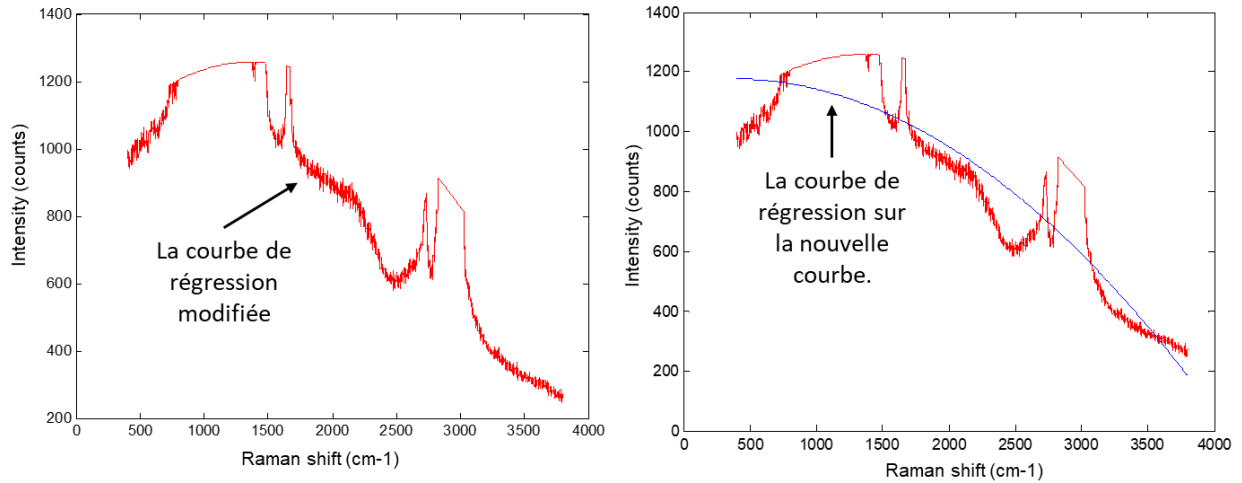


Figure 3 : A) La nouvelle courbe obtenue B) Régression de la nouvelle courbe sur les nombres d'ondes.

Si on affiche la nouvelle courbe de régression sur le spectre de départ on remarque que la courbe est devenue plus basse (Figure 4.B).

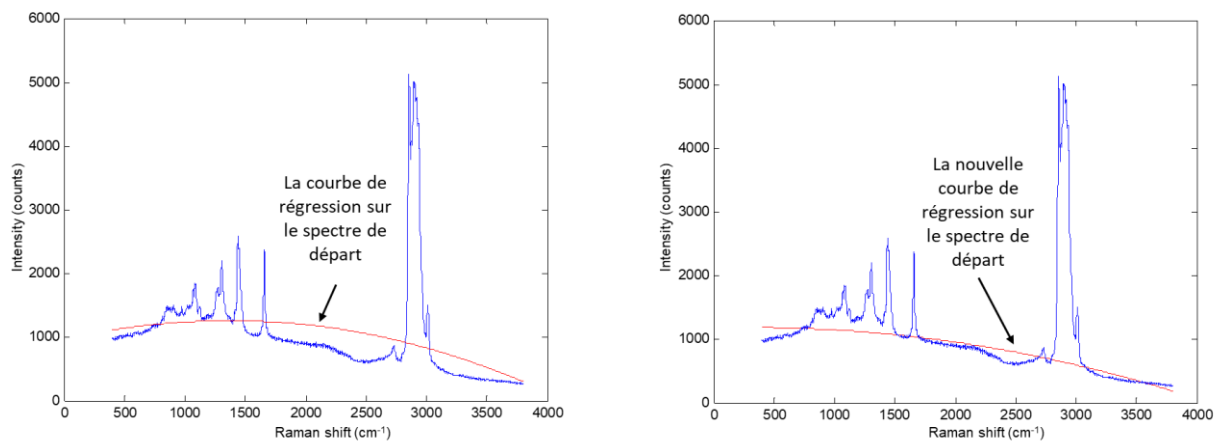


Figure 4 : A) La 1^{ère} courbe de régression versus le spectre brut B) la 2^{ème} courbe de régression versus le spectre brut.

On peut répéter cette action plusieurs fois. Plus on répète plus la courbe se rapproche de la ligne de base (Figure 5).

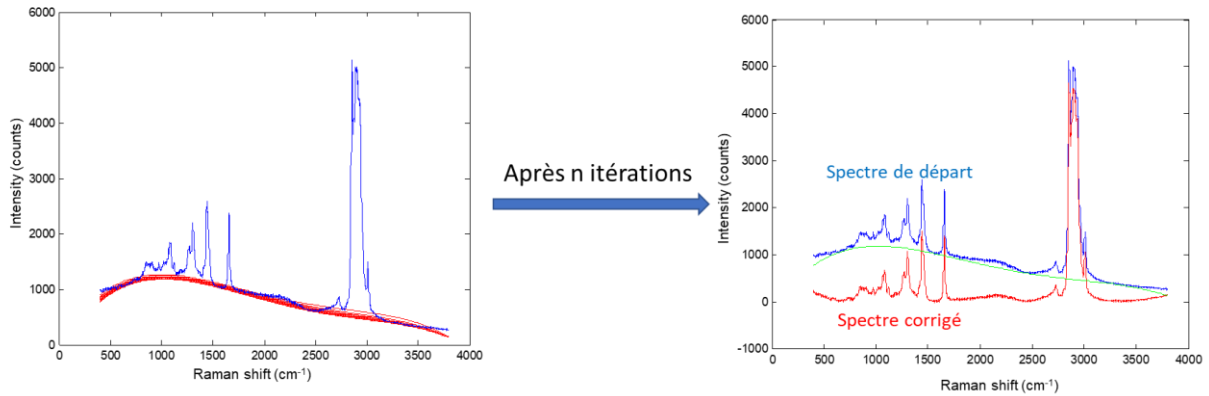


Figure 5 : Résultats après n itérations.

Script Matlab de la fonction BaselineFit :

```
function [SpectreLB , Yfit] = BaselineFit(Spectre , Wvn , Ordre1 , Ordre2 ,
Iterations)

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Spectre      : column vector
% Wvn          : column vector
% Ordre1       : Fitting ordre for Regression between Spectre and Wvn
% Ordre2       : Fitting ordre for Regression between modified curve fitting
and Wvn
% Iterations   : Number of repetitions of the modification of the curve
fitting
%%%%% ALI ASSI %%%%%
%%%%% 28/03/2020 %%%%%

p1 = polyfit(Wvn, Spectre , Ordre1) ;
Yfit = polyval(p1, Wvn );

for k = 1: Iterations
for i=1:length(Spectre)
if Yfit(i) > Spectre(i)
Yfit(i) = Spectre(i);
else
Yfit(i) = Yfit(i);
end
end

p1 = polyfit(Wvn, Yfit , Ordre2);
Yfit = polyval(p1,Wvn);

end

if nargin < 2
SpectreLB = Spectre - Yfit ;

else
SpectreLB = Spectre - Yfit ;
Yfit = Yfit ;

end
end
```

c) La normalisation :

Cette normalisation a pour effet d'accorder à tous les spectres enregistrés la même importance informative, c'est-à-dire s'affranchir de la variabilité de l'intensité absolue lors la comparaison de différents spectres. Nos données ont été normalisées à l'aire sous la courbe (AUC) de la bande d'élongation CH ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$).

2) Traitements des données :

Les différents descripteurs vibrationnels Raman et infrarouge ont été calculés à partir des spectres prétraités. Les différents descripteurs utilisés sont détaillés dans la partie « Interprétation du spectre Raman », pages 75-76. Une analyse de variance ANOVA a été utilisée pour la comparaison des différents groupes.

II) Cinétique de déshydrations :

Pour suivre la cinétique de déshydratation du SC, ce dernier a été équilibré à une humidité élevée ($\sim 100\%$ HR) puis placé dans un environnement sec pour étudier la cinétique. Une chambre à humidité contrôlée a été construit autour du microscope du spectromètre Raman. L'humidité a été réglée à 10% RH. Les acquisitions des profils Raman ont été effectuées sur le SC de $-10\ \mu\text{m}$ (Avant la surface du SC) à $30\ \mu\text{m}$ (sous la surface). Les acquisitions des profils ont été ensuite répétées 21 fois (du début du processus de séchage (t_0) jusqu'à 4,25 heures de déshydratation).

1) Prétraitements des spectres Raman

a) Prétraitement des données :

i) Lissage par la méthode de Savitzky-Golay.

ii) Correction de la ligne de base en utilisant la fonction `BaselineFit`.

iii) Normalisation à l'aire sous la courbe (AUC) de la bande d'élongation CH ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$).

b) Suppression des spectres aberrants : Supprimer les spectres très éloignés du spectre moyen dans la même collection (la distance euclidienne est utilisée).

c) Calcul du signal sur bruit : Le signal sur bruit a été calculé et les spectres avec un très faible rapport ont été supprimés.

2) Traitement des données :

a) Cartographies spectrales :

La collection des spectres qui a été effectuée sur le SC de $-10\ \mu\text{m}$ à $30\ \mu\text{m}$ peut être représentée comme une cartographie spectrale (Figure 6).

- Chaque pixel représente un spectre.
- L'axe X de la cartographie représente la profondeur ($-10\ \mu\text{m}$ à $30\ \mu\text{m}$).
- L'axe Y correspond aux répétitions des profils (temps) : par exemple, la première ligne (à 0) représente le premier profil et la dernière ligne (à 20) représente le dernier profile en fin de processus de séchage (après 4 heures).
- L'échelle de couleurs reflète l'intensité de chaque pixel : du bleu foncé (la plus petite intensité) au rouge foncé (l'intensité la plus élevée).

La figure 6.A montre la cartographie brute avant tout prétraitement. Après prétraitement nous pouvons constater la disparition de certains pixels (spectres aberrants ou spectres dont le signal sur bruit est bas) (Figure 6.B). Malgré les prétraitements nous pouvons constater que la position de la surface du SC varie entre les différents profils. Il est donc primordial de corriger cette position.

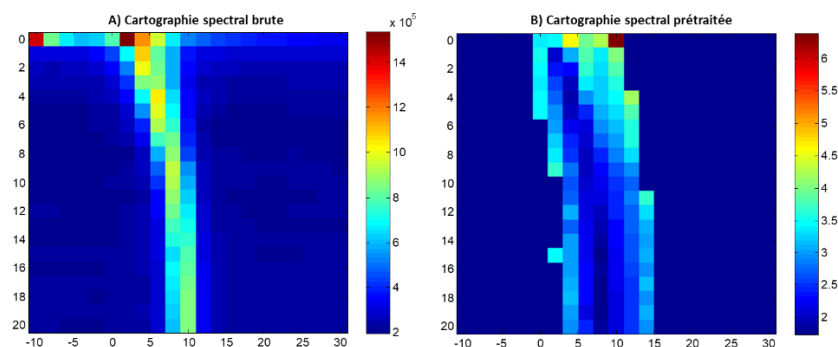


Figure 6 : A) Cartographie spectral brute B) Cartographie spectrale prétraitée

b) Correction de la position de la surface SC

Comme mentionné ci-dessus, pendant le processus de séchage (4 heures) et tout au long de la période de collecte des profils, l'épaisseur du SC peut changer induisant un changement de position de la surface. Cela peut être observé dans la figure 6.B. Pour la première ligne, la position de la surface du SC est située à 0 μm . La position de la surface s'est déplacée plus profondément dans ligne 6 et ainsi de suite pendant les 2 premières heures de séchage. La position peut être corrigée en se basant sur le signal Raman du SC. Pour corriger la position de la surface, un script Matlab développée au laboratoire pour cette correction a été utilisé (Figure 7).

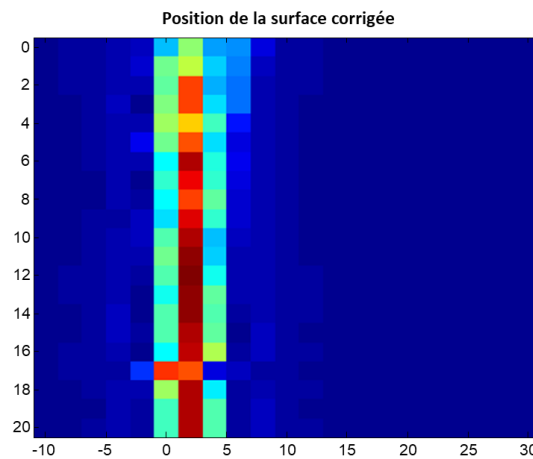


Figure 7 : Cartographie spectrale : Position corrigée

c) Profils de séchage :

Pour étudier le processus de séchage et suivre la teneur relative en eau dans l'ensemble du SC, le rapport $v_{\text{OH}}/v_{\text{CH}}$ a été calculé à partir de chaque spectre dans les profils spectraux. Le contenu relatif en eau pour chaque profil spectral a été obtenu à partir de son aire sous la courbe entre 0 et 12 μm (limites du SC). Une valeur unique est ainsi obtenue pour chaque profil (Figure 8).

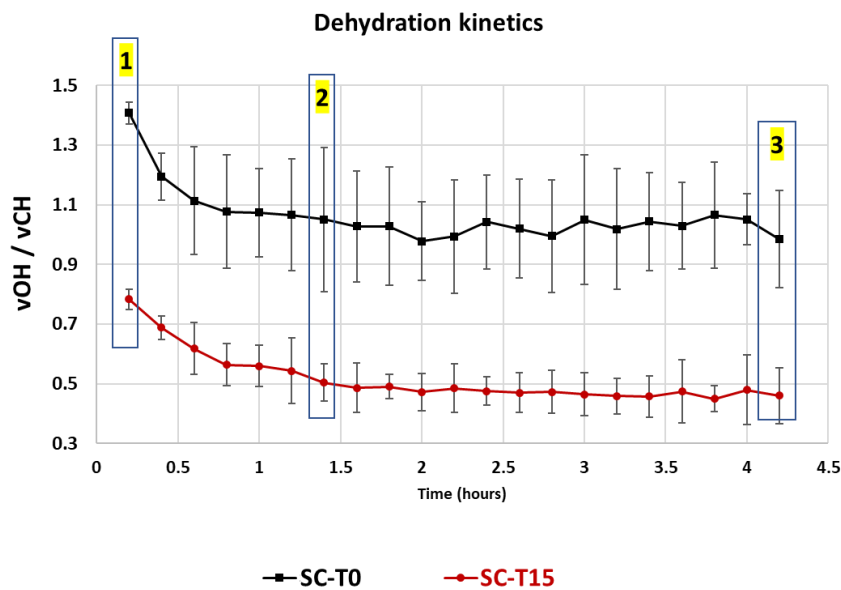


Figure 8 : Variation de la teneur globale en eau dans le SC au cours du processus de séchage.

- L'axe X représente le temps
- L'axe Y représente le rapport entre la bande d'élongation OH (eau) et la bande d'élongation CH (lipides et protéines).
- La capacité de captation d'eau (Water Caption (WC)) peut être obtenue après 24 heures de stabilisation SC à 100 % d'humidité relative. Le WC peut être obtenu lorsque les données sont enregistrées directement après la stabilisation à 100 % HR. Cela correspond au point de début de processus de séchage (Figure 8 n°1).
- La capacité de rétention d'eau (Water Retention (WR)) représente l'eau restante 1h30 après le début du processus de séchage (Figure 8 n°2).
- La capacité de rétention d'eau prolongé (Long Term Water Holding (LTWH)) représente le taux d'eau observé à la fin du processus de séchage (Figure 8 n°3).

III) Analyse *in vivo* : microspectrométrie Raman confocale

1) Prétraitement des données

Des étapes de prétraitement spectral sont nécessaires avant l'exploitation des données spectrales. Tous les spectres ont été lissés selon la méthode de Savitzky-Golay et corrigés de la ligne de base selon une fonction développée au laboratoire combinant la correction polynomiale et l'estimation par segments linéaires de la ligne de base.

A ce stade du prétraitement, il est possible de déterminer la position de la surface de la peau et l'épaisseur du SC.

Après l'obtention de l'épaisseur, les spectres peuvent être normalisés pour ramener les intensités spectrales de l'ensemble des spectres à des valeurs comparables.

2) Détermination de l'épaisseur du *Stratum Corneum* à partir des profils Raman

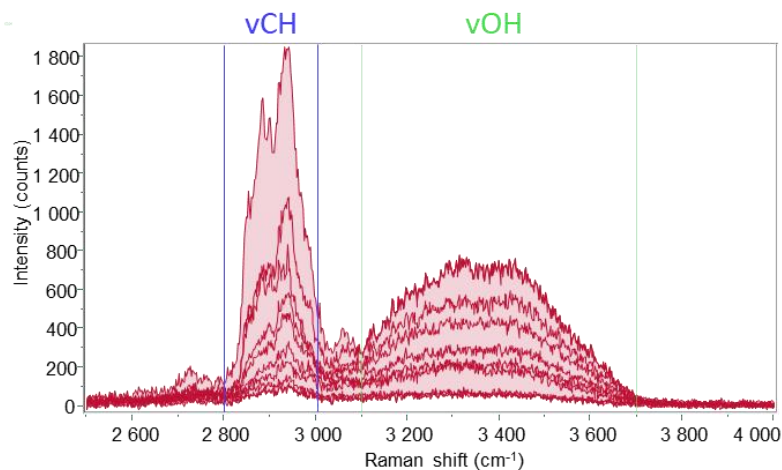


Figure 6 : Profil en profondeur, région des hauts nombres d'ondes

Afin de déterminer l'épaisseur du SC à partir d'un profil en profondeur, nous nous sommes basés sur la détection de la limite entre le SC et l'épiderme viable, à partir du profil de l'eau (νOH) (Figure 6), comme décrit par Egawa *et al.* [3].

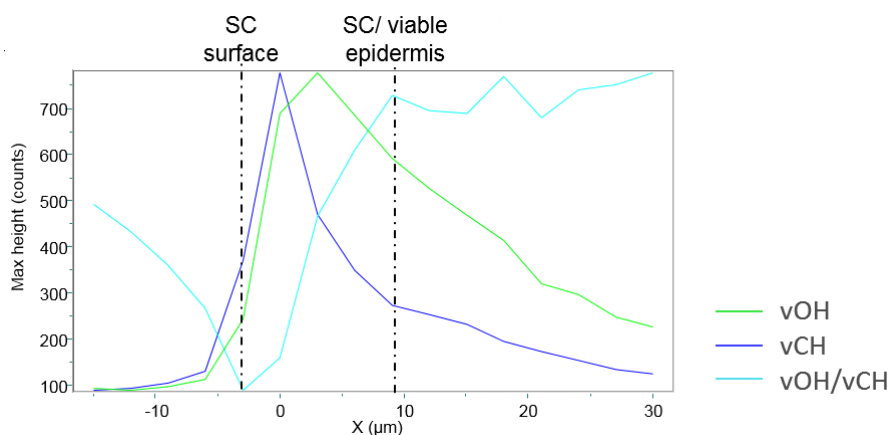


Figure 7 : Evolution du rapport vOH/vCH en fonction de la profondeur

La limite supérieure du SC et l'interface entre le SC et l'épiderme viable peuvent être déterminée en suivant l'évolution du rapport vOH/vCH, représenté en bleu clair sur la Figure 7. En effet ce rapport augmente de la surface du SC jusqu'à l'épiderme viable, où il atteint un plateau, nous permettant ainsi de déterminer la limite de l'interface SC/épiderme viable.

c) Interprétation des données

Les signatures spectrales donnent des informations directes sur les structures moléculaires présentes dans la peau. Au-delà de la structure, des informations peuvent être obtenues sur les conformations des lipides, les structures secondaires des protéines et l'état d'hydratation au sein du SC. Les différents descripteurs utilisés sont détaillés dans la partie « Interprétation du spectre Raman », pages 78-79.

Références :

1. Savitzky, A. and M.J.E. Golay, *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry, 1964. **36**(8): p. 1627-1639.
2. Lieber, C.A. and A. Mahadevan-Jansen, *Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra*. (0003-7028 (Print)).
3. Egawa, M., T. Hirao, and M. Takahashi, *In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy*. Acta Derm Venereol, 2007. **87**(1): p. 4-8.

Annexe 2 :

Dans le cadre de cette thèse, différents travaux exploratoires ont été réalisés afin d'évaluer les effets des rayonnements solaires sur le SC. Effectivement comme mentionné dans l'introduction de la thèse, dans la littérature, seuls les travaux utilisant des doses très élevées (5000 DEM) mentionnent des effets sur le SC isolé [1]. Une première partie des travaux expérimentaux consistait à explorer les effets directs de ces rayonnements sur le SC. En plus des analyses en spectroscopie Raman nous avons exploré les possibilités d'utilisation de l'infrarouge notamment l'imagerie ATR-FTIR.

Imagerie par ATR-FTIR :

La principale limitation pour utiliser l'infrarouge pour l'analyse du SC c'est sa compacité qui provoque une absorption totale du signal en mode transmission. L'utilisation de l'ATR permet d'analyser quelques dixièmes du micromètre à la surface de l'échantillon. La profondeur de l'analyse dépendant de l'indice de réfraction du cristal utilisé, nous avons décidé de travailler en ATR-imaging (dispositif avec un cristal en germanium $n=4$) au lieu de l'ATR classique (dispositif avec un diamant, $n=2,4$).

1) Prétraitement et sélection des spectres :

L'ensemble des spectres ont suivi le même processus de prétraitement :

- Correction atmosphérique : pour diminuer la contribution du dioxyde de carbone et de la vapeur d'eau atmosphérique dans les spectres,
- Elimination des spectres présentant des bandes négatives
- Lissage en utilisant la méthode de Savitzky-Golay en utilisant un polynôme d'ordre 4 et une fenêtre flottante de 11 points,
- Correction de la ligne de base en utilisant la méthode des minimas (algorithme développé au Lip(Sys)² combinant à la fois la correction polynomiale et les segments linéaires).
- Normalisation sur l'aire totale sous la courbe pour homogénéiser l'intensité des données,
- Exclusion des zones spectres non informatives : *i/* avant 800 cm^{-1} (le signal étant altéré pour la contribution des éléments optiques de l'instrument), *ii/* Entre 1800 et 2700 cm^{-1}

¹ : cette zone ne présente aucune bande d'intérêt pour la peau. Seules les elongations des liaisons triples sont présentes, *iii*/après 3500 cm^{-1} : dans le cas de nos échantillons, aucune signature spectrale n'est observée dans cette région.

2) Analyses des données :

Les images ont été réalisées sur des SC isolés :

- 3 conditions : non irradié, irradié 40 min (1080 J/cm^2), irradié 120 min (3240 J/cm^2)
- 3 images ont été collectées par condition
- 9 images spectrales ont été collectées (contenant 36864 spectres chacune).

Les images étant collectées sur des SC isolé, l'information spatiale ne peut pas être associée à une différence de structures. Nous avons décidé de traiter les spectres de l'image en fonction de leurs conditions d'analyse et non pas leur distribution spatiale. Dans chaque image seuls les 1000 spectres présentant les meilleurs rapports signal sur bruit ont été retenus. Ils ont été utilisés pour reconstruire une cartographie avec toutes les conditions expérimentales (9000 spectres).

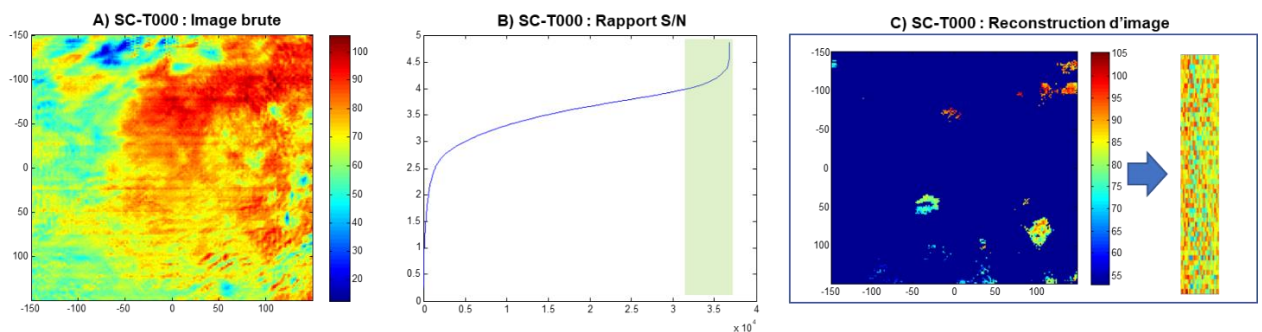


Figure 1 : A/ Exemple d'une image pseudo-couleur Brute du SC à partir de l'absorbance de chaque spectre (pixel), B/ Rapport signal sur bruit des Spectres bruts de l'image hyperspectrale C) Image reconstruites à partir des 1000 spectres extraits présentant les meilleurs rapports signal sur bruit.

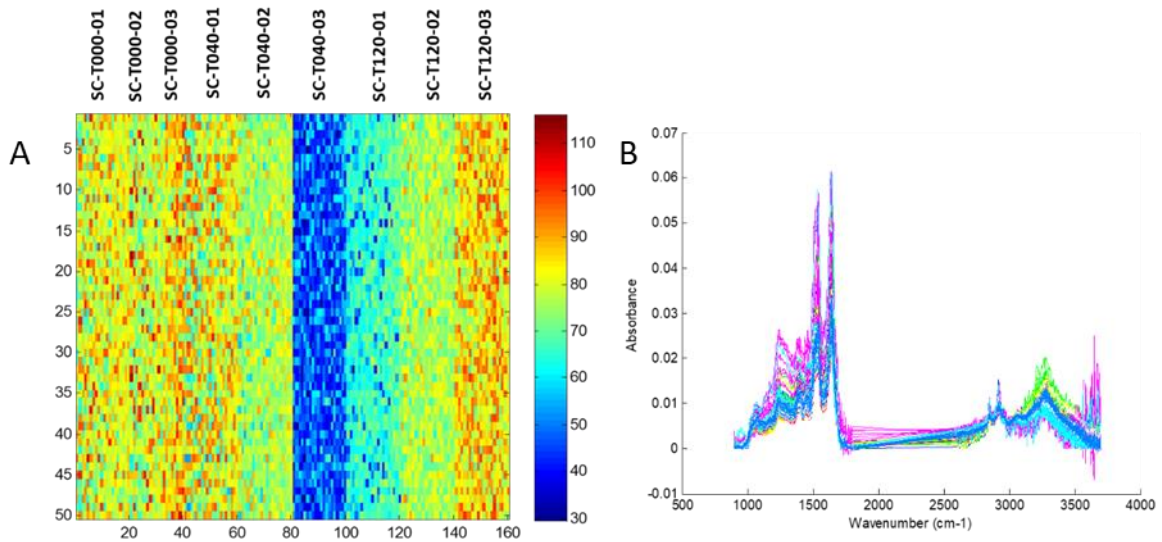


Figure 2 : A/ Cartographie globale reconstruite contenant les 9000 spectres, B/ Spectres extraits de la cartographie globale .

L’affichage final permet de représenter les différents descripteurs sous forme d’un pixel de couleur. L’idée étant d’avoir un affichage visuel de l’homogénéité des valeurs au sein d’une même condition et la différence entre différentes conditions.

Dans cette annexe, nous présentons quelques descripteurs calculés pour vérifier l’effet d’irradiation sur le SC observé par ATR.

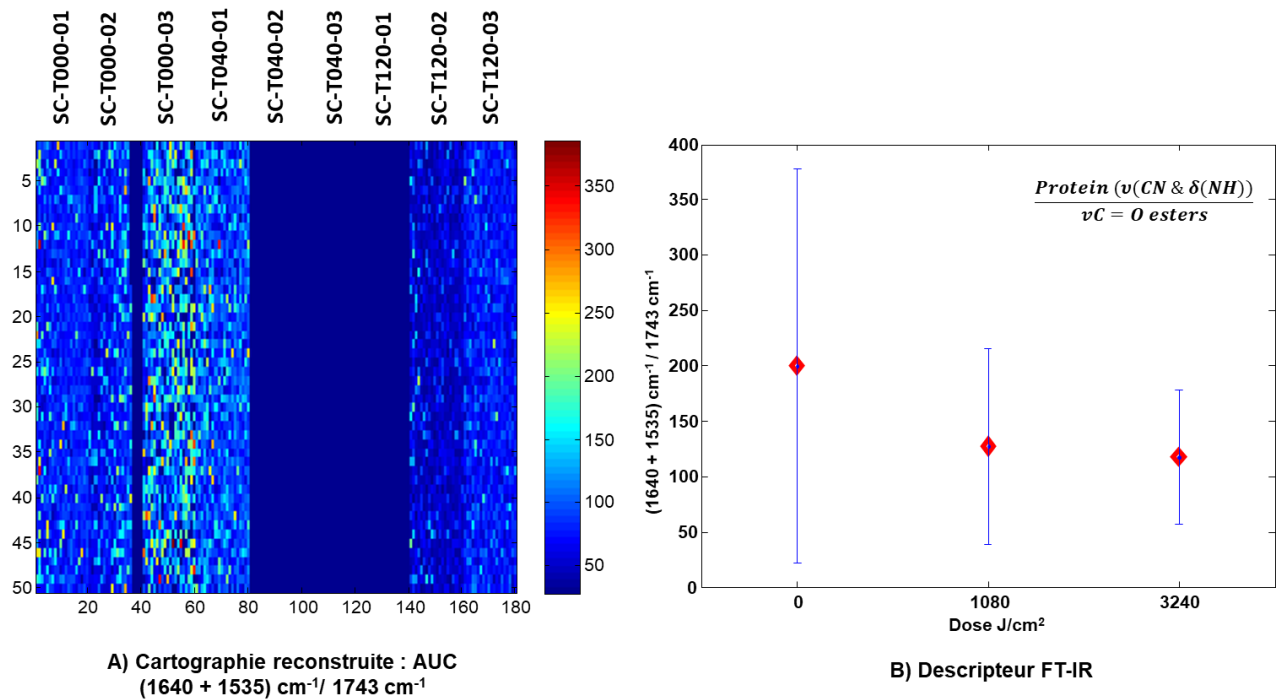


Figure 3 : A/ Cartographie globale reconstruite, B/ Descripteur FT-IR étudié.

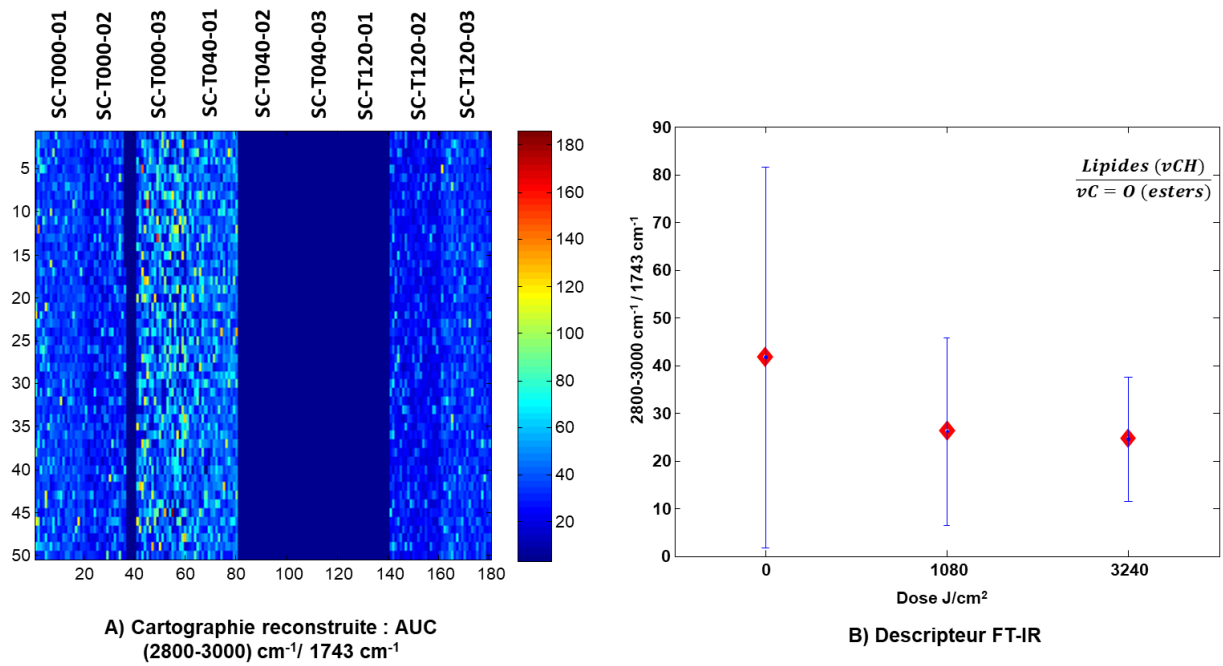


Figure 4 : A/ Cartographie globale reconstruite, B/ Descripteur FT-IT étudié.

Après avoir exploré l'ensemble des descripteurs spectraux, aucune modification significative a été observée. Une analyse en composantes principale a été également effectuée. Aucun regroupement des spectres n'a été observé.

Références :

1. Biniek, K., R.H. Levi K Fau - Dauskardt, and R.H. Dauskardt, *Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin*. (1091-6490 (Electronic)).