



HAL
open science

Aspects moléculaires liés aux lipides cutanés : interactions physiologiques et corrélation en états pathologiques (acné)

Aline Rigal-Dachaud

► To cite this version:

Aline Rigal-Dachaud. Aspects moléculaires liés aux lipides cutanés : interactions physiologiques et corrélation en états pathologiques (acné). Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASF036 . tel-04520760

HAL Id: tel-04520760

<https://theses.hal.science/tel-04520760>

Submitted on 25 Mar 2024

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.

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)*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

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

Spécialité de doctorat : Chimie

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

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 06/10/2021, par**

Aline RIGAL-DACHAUD

Composition du Jury

Stéphane SERFATY

Professeur, Université Cergy-Pontoise

Président du jury

Marie-Alexandrine BOLZINGER

Professeure, Université Lyon 1

Rapporteur & Examinatrice

Olivier PIOT

Professeur, Université de Reims

Rapporteur & Examineur

Arlette BAILLET-GUFFROY

Professeure émérite, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Armelle BIGOURET

Docteure, Entreprise Clarins

Examinatrice

Benoît COLSCH

Ingénieur de recherche, CEA Paris-Saclay

Examineur

Direction de la thèse

Ali TFAYLI

Professeur, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Rime MICHAEL-JUBELI

Maîtresse de conférences, Université Paris-Saclay

Co-Encadrante

Membres invités

Carlo BICCHI

Professeur, Université de Turin

Membre invité

Alex NKENGNE

Docteur, Entreprise Clarins

Membre invité

Remerciements

C'est avant tout à ces chercheurs passionnés, sur lesquels le temps n'a pas de prise, qui m'ont formée 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. Marie Alexandrine Bolzinger, Pr. Olivier Piot, merci d'avoir accepté la lourde tâche d'évaluer et de rapporter ces travaux. **Pr. Stéphane Serfaty**, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ces travaux et de présider ce jury. **Dr Benoît Colsch**, merci d'avoir accepté d'examiner ces travaux et de faire partie de ce jury.

A vous tous, merci de m'avoir fait l'honneur de prendre de votre temps afin d'apporter vos connaissances et votre expertise sur mes travaux de thèse.

A mes encadrants,

Tout d'abord un immense merci au **Pr. Ali Tfayli**. 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. Merci pour tous nos échanges plus intéressants les uns que les autres, merci de m'avoir toujours permis de proposer de nouvelles idées (même les plus farfelues qui auraient pu emmener ces travaux dans l'espace !).

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. Merci de m'avoir accompagnée dans tous les aléas rencontrés, merci d'avoir toujours eu une pensée pour moi dans les grandes étapes de ma vie. Tu es devenue bien plus qu'une encadrante et je ne saurai te remercier suffisamment pour tout ce que tu as fait.

Dr Armelle Bigouret, un merci tout particulier également. Merci d'avoir parfaitement encadré mon stage, de m'avoir donné le goût de l'évaluation clinique, de la recherche et de la rigueur scientifique. Merci d'avoir tout fait pour rendre cette belle aventure possible, peu importe quelles seraient les conditions. Merci pour tous les moments partagés, pour nos échanges toujours passionnants et pour ton soutien infaillible.

Pr. Arlette Baillet-Guffroy, je vous adresse mes plus sincères remerciements pour tout ce que vous avez apporté dans cette thèse. Merci pour votre regard critique et le partage de vos immenses connaissances scientifiques. Merci d'avoir partagé de merveilleux moments de vie et d'avoir toujours été présente.

Merci à vous quatre de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Les mots ne pourront jamais être suffisants pour vous exprimer mon infinie reconnaissance. Vous m'avez tant apporté, au niveau professionnel et personnel. Merci pour votre soutien indéfectible à chaque moment de cette thèse, merci de m'avoir aidée à me relever dans les moments difficiles et d'y avoir toujours cru. Ce travail est, je l'espère, à la hauteur de la confiance que vous m'avez accordée. J'espère du fond du cœur que nos chemins continueront à se croiser.

Aux membres du Laboratoire d'évaluation clinique, Clarins,

Un grand merci et une infinie reconnaissance au **Dr Katell Vie** et au **Dr Alex Nkengne** qui m'ont permis d'intégrer l'équipe lors de mon stage de fin d'étude et ont permis la mise en place de cette importante collaboration entre Clarins et l'équipe Lip(Sys)² afin de permettre la réalisation de cette thèse. Merci au reste de l'équipe pour leur accueil, leur bienveillance. Un merci particulier à **Julie Robic** pour son aide apportée dans le traitement d'images.

*A Monsieur le **Pr. Carlo Bicchi**,*

Je vous remercie très chaleureusement 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. Merci à vous d'être venus échanger des moments de grande qualité scientifique et humaine avec nous. La situation nous aura empêchée de venir à Turin, mais qui sait, on ne sait pas ce que la vie nous réserve !

Aux membres du laboratoires Lip(Sys)²,

Tout d'abord un grand merci au **Pr. Pierre Chaminade**. Merci pour votre accueil dans le 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 **Sana**, merci pour ta bonne humeur, ta bienveillance infinie et pour tout ce que nous avons partagé.

Aux membres de l'équipe du LETIAM,

Un grand merci pour votre accueil chaleureux lors des analyses en GC/MS. Merci de m'avoir donné l'opportunité de marcher sur les traces de ma très chère encadrante au sein de votre laboratoire. Un immense remerciement, une très grande pensée et une profonde reconnaissance particulière envers **Jean**. Vous m'avez appris énormément et je ferai tout pour garder un petit peu de votre immense expertise. Merci à **Myriam** et à **Philippe** pour votre aide et votre accompagnement tout au long des campagnes d'analyses.

Aux membres de la plateforme SAMM,

Un grand merci à **Audrey Solgadi** et à **Bastien Prost** pour leur aide et leur accompagnement. Merci particulièrement à Audrey pour le temps consacré et les échanges, malgré l'accumulation des situations improbables !

Aux chers doctorants qui ont partagé cette grande aventure avec moi,

Joudi, Rindala, Ali, Kodjo, merci d'avoir été présent pour partager cette aventure, merci pour votre bonne humeur perpétuelle et votre présence. J'espère que nos chemins continueront de se croiser et je vous souhaite toute la réussite que vous méritez.

Aux explorateurs et participants de l'expédition « Under The Pole »,

Un grand merci à **Véronique Merour** et **Ghislain Bardout** d'avoir accepté d'emporter avec eux un peu de ces travaux. Un grand merci à tous les explorateurs ayant accepté de participer à nos mesures, même à l'autre bout du monde.

Un grand merci à **Ali Assi** et à **Thomas Methlicki** pour la réalisation des analyses ATR.

A tout l'équipe de la Maison d'Initiation et de Sensibilisation aux Sciences,

Un immense merci à **Valérie Fortuna**, directrice de la MISS, qui m'a permis de m'épanouir dans ce rôle d'animatrice scientifique. Merci à **Elisabeth** et **Sylvie** pour leur présence et leur aide indispensable. Merci aux responsables des ateliers, à tous les doctorants avec qui j'ai pu partager ces journées très enrichissantes. Evidemment un merci particulier aux enfants, sans qui cette aventure n'aurait pas eu le même sens. Merci d'avoir vécu ces journées avec des étoiles dans les yeux, et de nous avoir tant appris.

A mes très chères amies,

Maéva, Flora, Fanny, Manon, Pauline, merci pour votre soutien à toute épreuve, merci pour votre présence et vos encouragements de toujours.

A mes parents, ma famille, mon soutien de toujours,

Je n'aurai jamais la possibilité de vous adresser des remerciements à la hauteur de ce que vous avez et ce que vous faites pour moi. Merci à mes parents, **Jeanine** et **Jean-Pierre** de m'avoir toujours soutenue, de toujours être présents, de croire en moi et de m'avoir permis de devenir la femme épanouie que je suis aujourd'hui, dans les meilleures conditions possibles, je vous en suis extrêmement reconnaissante. Merci à mon frère **Jean-Baptiste**, ma belle-sœur **Sophie**, mes nièces **Maëlle** et **Thelma** et mon neveu, **Paul**, pour l'amour et le soutien infailible qu'ils m'apportent depuis toujours.

Un immense merci à tous les autres membres de ma famille, si chers à mes yeux, pour leur soutien de toujours.

A mon mari,

Un immense merci à mon mari, **Florian**, mon confident, mon partenaire de tous les jours. Merci d'avoir toujours été présent malgré les difficultés, merci de toujours y croire, merci de ton soutien sans limite. Merci de partager ce chemin à mes côtés.

Enfin, je termine ces remerciements en dédiant ce travail à mon fils, mon **Louis**. Merci d'être le petit homme tellement fabuleux que tu es, de m'apporter tant d'amour et de bonheur. J'espère t'apporter autant que ce que tous les gens qui m'ont soutenu m'ont apporté dans ce grand projet, et j'espère que tu seras fier de ta maman, autant que je le suis de toi.

Résumé

Le film hydrolipidique (FHL) et le *Stratum Corneum* (SC) représentent l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement et contribuent ainsi à la fonction primordiale de barrière cutanée. Les lipides constituent un composant essentiel de cette barrière, leurs composition et structure possèdent une importance particulière dans l'état de la peau. Ils sont intimement liés aux modifications cutanées. En effet, les différentes manifestations cliniques pouvant être observées au niveau cutané sont liées à des phénomènes moléculaires complexes sous-jacents, ayant lieux dans les différentes couches de la peau et peuvent influencer les lipides du SC et/ou du FHL.

L'objectif de ce travail consiste en la mise en place d'une approche analytique multiparamétrique permettant la caractérisation des modifications liées à la barrière cutanée, notamment aux lipides, dans différentes conditions physiopathologiques. Pour cela, des techniques biométriques courantes ont été utilisées telles que la mesure du contenu en eau, la perte insensible en eau, le pH, les paramètres mécaniques ou encore les paramètres colorimétriques. Des prélèvements de FHL et des lipides de SC ont été effectués afin d'analyser respectivement la composition des lipides cutanés de surface par HT-GC/MS et des lipides du SC par NP-HPLC/HR-MS. En parallèle, la microspectroscopie Raman *in vivo* a permis l'obtention d'informations structurales complémentaires, concernant notamment les lipides, les protéines et le contenu en eau au sein du *Stratum Corneum*.

Cette approche a été appliquée à l'étude de trois conditions physiopathologiques différentes : i/le vieillissement cutané, plus particulièrement sur des femmes âgées de plus de 70 ans ; ii/ l'hyperséborrhée et la peau acnéique chez la femme adulte ; iii/ et l'impact des conditions environnementales extrêmes.

Les résultats obtenus à partir de ces travaux expérimentaux nous ont permis de mettre en avant de nombreuses modifications cutanées dans les différentes situations :

- Le vieillissement cutané est associé à une diminution de la totalité des lipides cutanés, comprenant une diminution de l'activité des glandes sébacées, ainsi qu'une diminution de la quantité de lipides au sein du SC. La modification de composition des lipides cutanés de surface, avec une augmentation de l'hydrolyse des triglycérides et une augmentation du 2,3-oxydosqualène suggère une modification de l'activité enzymatique. En parallèle, d'importantes modifications structurales au niveau du SC ont lieu, avec une augmentation de son épaisseur, une organisation lipidique plus compacte, ainsi qu'une augmentation de la longueur de chaînes des céramides et de leur estérification, menant à une diminution de la perte transdermique en eau et évoquant ainsi une adaptation dans le sens d'un renforcement de la barrière cutanée.
- Bien que souvent associées, la peau grasse et l'acné chez la femme adulte représentent deux problématiques indépendantes. Dans le cas de la peau grasse, les modifications ont lieu majoritairement en surface, avec une augmentation de l'activité sébacée et une modification de la composition des lipides cutanés de surface, probablement impliquée dans l'augmentation observée de la brillance de la peau. L'acné entraîne l'augmentation de l'activité sébacée, et la modification de la composition des lipides cutanés de surface avec notamment l'augmentation de composés possédant une activité comédogène. Ces changements sont associés à des modifications du *Stratum Corneum* avec une diminution des sous-classes de céramides estérifiés, évoquant une altération de la matrice lipidique.
- L'étude des modifications cutanées dans des conditions environnementales extrêmes, de température et d'humidité notamment, nous a permis de mettre en évidence une adaptation marquée de la peau. En effet, après une altération marquée avec une désorganisation lipidique du *Stratum Corneum* durant les premiers jours, la peau retrouve son organisation initiale au bout de 56 jours.

L'approche multiparamétrique utilisée durant cette thèse a permis d'apporter des informations complémentaires concernant les nombreuses et importantes adaptations ayant lieu au niveau de la barrière cutanée, en mettant en avant certains descripteurs de l'état de la surface cutanée dans différentes conditions physio-pathologiques.

Mots clés : Lipides cutanés de surface, *Stratum Corneum*, Raman, acné, NP-HPLC/HR-MS, HT-GC/MS.

Abstract

The hydrolipidic film (HLF) and the *Stratum Corneum* (SC) represent the ultimate barrier between the organism and the environment and thus contribute to the primary function of the skin barrier. Lipids play a primordial role in this barrier, their composition and structure are of particular importance in the condition of the skin and are intimately linked to skin changes. Indeed, the different clinical manifestations that can be observed in the skin are linked to complex underlying molecular phenomena, taking place in the different layers of the skin and can influence the lipids of the SC and/or the HLF.

The objective of this work consists in the implementation of a multiparametric analytical approach allowing the characterization of the modifications related to the cutaneous barrier, in particular to the lipids, under various physio-pathological conditions. For this purpose, common biometric techniques were used such as the measurement of water content, trans-epidermal water loss, pH, mechanical parameters, or colorimetric parameters. Samples of HLF and SC were extracted in order to analyze respectively the composition of skin surface lipids by HT-GC/MS and SC lipids by NP-HPLC/HR-MS. In parallel, *in vivo* Raman microspectroscopy was used to obtain additional structural information, notably concerning lipids, proteins, and water content within the SC.

This approach was applied to the study of three different physio-pathological conditions: i/ skin aging, more particularly on women over 70 years old; ii/ hyperseborrhea and acneic skin in adult women; iii/ and the impact of extreme environmental conditions.

The results obtained from these experimental works have allowed us to highlight numerous skin modifications in the different situations:

- Skin aging is associated with a decrease in total skin lipids, including a decrease in sebaceous gland activity, as well as a decrease in the amount of lipids within the SC. The change in skin surface lipid composition, with an increase in triglyceride hydrolysis and an increase in 2,3-oxidosqualene suggests a change in enzymatic activity. In parallel, important structural changes in the SC take place, with an increase in its thickness, a more compact lipid organization, as well as an increase in the chain length of ceramides and their esterification, leading to a decrease in trans-epidermal water loss and thus evoking an adaptation in the sense of a reinforcement of the skin barrier.
- Although often associated, oily skin and acne in adult women represent two independent problems. In the case of oily skin, the changes occur mainly on the surface, with an increase in sebaceous activity and a change in the composition of skin surface lipids, probably involved in the observed increase in skin brightness. Acne leads to an increase in sebaceous activity, and a modification of the composition of cutaneous surface lipids with an increase in compounds with comedogenic activity. These changes are associated with modifications of the SC with a decrease in esterified ceramide subclasses, suggesting an alteration of the lipid matrix.
- The study of skin changes under extreme environmental conditions, particularly temperature and humidity, enabled to highlight a marked adaptation of the skin. Indeed, after a marked impairment with lipids disorganization in the SC during the first days, the skin recovers its initial organization after 56 days.

The multiparametric approach used during this thesis allowed to bring additional information concerning the numerous and important adaptations taking place at the level of the cutaneous barrier, by highlighting some descriptors of the state of the cutaneous surface under different physio-pathological conditions.

Key words: Skin surface lipids, *Stratum Corneum*, Raman, acne, NP-HPLC/HR-MS, HT-GC/MS.

Sommaire

Remerciements.....	5
Résumé.....	7
Abstract.....	8
Sommaire	9
Liste des abréviations.....	12
Liste des figures	13
Liste des tableaux	16
Introduction.....	17
Partie 1 : Etude bibliographique	23
I. Structure générale de la peau	25
1. Epiderme	26
2. Derme.....	28
3. Hypoderme.....	29
4. Annexes cutanées	29
5. Fonctions générales de la peau	30
II. Film hydrolipidique	32
1. Origine du film hydrolipidique.....	32
2. Composition des lipides cutanés de surface (LCS)	33
3. Rôles du film hydrolipidique	39
III. Stratum corneum	40
1. Origine du Stratum Corneum	40
2. Composition lipidique du Stratum Corneum.....	41
3. Rôles des lipides du SC	48
IV. Physiologie du vieillissement cutané.....	49
1. Vieillesse intrinsèque vs vieillissement extrinsèque.....	49
2. Modifications de la fonction barrière cutanée	50
3. Principales modifications du derme et de la jonction dermo-épidermique.....	55
V. Physiopathologie de l'acné	56
1. Généralités	56
2. Hyperséborrhée et modification de la composition du sébum	57
3. Hyperkératinisation du follicule pilo-sébacé.....	60

4.	Dysbiose du microbiome cutané.....	60
5.	Signes cliniques et grades de classification.....	63
VI.	Méthodes d'analyse et de caractérisation de la peau.....	64
1.	Caractérisation générale de la peau.....	65
2.	Caractérisation des lipides cutanés par chromatographie.....	72
3.	Techniques spectroscopiques appliquées à la caractérisation cutanée.....	82
	Partie 2 : Méthodologies expérimentales.....	93
I.	Mise en place des études <i>in vivo</i>	95
1.	Conditions environnementales.....	95
2.	Zones de mesures.....	95
3.	Statut réglementaire.....	96
4.	Critères d'inclusion et d'exclusion.....	96
5.	Calcul du nombre de sujets.....	100
6.	Mise en place des prélèvements dans le cadre du projet « Under The Pole ».....	100
II.	Mise en place des analyses des LCS par HT-GC/MS.....	101
1.	Prélèvement.....	101
2.	Préparation des solutions standards.....	101
3.	Préparation des échantillons.....	102
4.	Analyses en HT-GC/MS.....	102
III.	Mise en place des analyses des lipides du SC par NPLC/HR-MS.....	104
1.	Prélèvement des lipides du SC.....	104
2.	Préparation des solutions standards.....	105
3.	Extraction des lipides du SC.....	105
4.	Analyses en NPLC/HR-MS des lipides du SC.....	107
IV.	Mise en place des analyses par spectroscopie Raman <i>in vivo</i>	108
V.	Traitement des données analytiques.....	111
1.	Traitement des données obtenues en HT-GC/MS	111
2.	Identification des lipides cutanés de surface, obtenus par HT-GC/MS.....	113
3.	Traitement des données obtenues en NPLC/HR-MS	115
4.	Identification des lipides du SC, obtenus par NPLC/HR-MS.....	123
5.	Traitement des données obtenues en spectroscopie Raman.....	123
	Partie 3 : Travaux expérimentaux.....	127
	Chapitre 1 : Impact du vieillissement sur la fonction barrière cutanée.....	129
1.	Article 1 : "Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-	

oxidosqualene correlates with older age"	132
2. Article 2 : "Raman confocal microscopy and biophysics multiparametric characterization of the skin barrier evolution with age"	151
3. Evolution de la composition des lipides du Stratum Corneum avec l'âge.....	177
4. Conclusion : Principales adaptations ayant lieu au niveau de la barrière cutanée avec l'âge.....	180
Chapitre 2 : Impact de l'hyperséborrhée et de l'acné sur la fonction barrière cutanée ..	183
1. Matériel & Méthodes.....	185
2. Résultats : Impact de l'hyperséborrhée et de l'acné sur les paramètres de surface cutanée	188
3. Evolution quantitative et qualitative des Lipides Cutanés de Surface (sébum)	191
4. Evolution de la composition des lipides du SC, analysés par NPLC/HR-MS	205
5. Conclusion : impact de l'hyperséborrhée et de l'acné sur la barrière cutanée.	215
Chapitre 3 : Impacts des conditions environnementales extrêmes sur la barrière cutanée, dans le cadre du projet « Under The Pole »	219
1. Méthodologies expérimentales	221
1. Résultats : Impacts des conditions environnementales extrêmes sur la barrière cutanée.....	229
2. Conclusion : Adaptation de la peau dans des conditions de température et d'humidité extrêmes	235
Conclusion générale et perspectives.....	237
Références	245
Productions scientifiques	269
Annexes	275

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AGL : Acide gras libre
ANOVA : Analyse de la variance
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique
AUC : Aire sous la courbe
C. acnes : *Cutibacterium acnes*
CPP : Comité de protection des personnes
DG : Diglycéride
FHL : Film hydro-lipidique
FP : Empreinte digitale
GEA scale : Echelle mondiale de gravité de l'acné
HCD : Dissociation induite par collision
HT-GC/MS : Chromatographie gazeuse à haute température, couplée à la spectrométrie de masse
HW : Hauts nombres d'ondes
IC : Ionisation chimique
IE : Impact électronique
IR : Infra-Rouge
JDE : Jonction dermo-épidermique
LCS : Lipides cutanés de surface
m/z : Rapport masse / charge
MG : Monoglycéride
NMF : Facteurs naturels d'hydratation
NP : Phase normale
NPLC/HR-MS : Chromatographie liquide en phase normale, couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution
OCT : Tomographie en cohérence optique
PIE : Perte insensible en eau
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*
SC : *Stratum Corneum*
SQ : Squalène
SQO : 2,3-oxidosqualène
SQOOH : Squalène monohydroperoxide
TG : Triglycéride
TIC : Courant ionique total
TMS : Triméthylsilylation
TR : Temps de rétention
u.a. : Unité arbitraire
UV : Ultra-violet

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la structure générale de la peau ³	26
Figure 2. Structure de l'épiderme ⁴	26
Figure 3. Etapes de la différenciation sébocytaire ¹⁶	33
Figure 4. Structure et répartition des différentes classes de lipides cutanés de surface	34
Figure 5. Structure générale des triglycérides, diglycérides et monoglycérides ³⁹	37
Figure 6. Biosynthèse des lipides du Stratum Corneum (adapté de Feingold et Elias ⁶¹). AG : Acides gras, TG : triglycérides.....	41
Figure 7. Structure et répartition des différentes classes lipidiques du Stratum Corneum ..	41
Figure 8. Structure chimique du cholestérol et de ses dérivés, contenus dans la peau humaine ³⁹	43
Figure 9. Formule chimique générale des céramides ⁷²	44
Figure 10. Diversité structurale des sous-classes de céramides (adapté de Rabionet et al. ^{67,76} et mis à jour).....	45
Figure 11. Structure de la sous classe des céramides [1-O-E(EO)Cer] ^{78,79}	46
Figure 12. Les différents types de lésions acnéiques.....	64
Figure 13. Schéma de la sonde de pH-mètre cutané (Courage&Khazaka).....	67
Figure 14. Paramètres R, étudiés avec le Cutomètre ²⁵⁶ . A, Paramètres obtenus après un cycle d'aspiration/relâchement. B, paramètres obtenus après une succession de cycles aspiration/relâchement.....	70
Figure 15. Paramètres de surface (F), étudiés avec le Cutomètre ²⁵⁶	71
Figure 16. Paramètres Q, étudiés avec le Cutomètre ²⁵⁶	72
Figure 17. Profil chromatographique obtenu après analyse en HT-GC/MS, ionisation chimique, des lipides cutanés de surface ²⁸¹	77
Figure 18. A. Profil chromatographique obtenu après analyse en NPLC/HR-MS-APCI des lipides du Stratum Corneum. B. Spectre de masse correspondant à un temps de rétention donné du profil chromatographique (indiqué en rouge).	82
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 ³¹⁰	84
Figure 20. Structure tridimensionnelle des lamelles lipides du SC : organisation latérale et lamellaire ⁶⁰	85
Figure 21. Organisation moléculaire latérale des lipides du SC ⁶⁰	86
Figure 22. Spectres Raman in vivo, A. région « empreinte digitale » ; B, région « hauts nombres d'ondes ».....	87
Figure 23. Spectres de transmittance (à gauche) et d'absorbance (à droite).....	89
Figure 24. Représentation schématique du cristal ATR.....	90
Figure 25. Méthode d'analyse utilisée en HT-GC/MS, avec gradient de température. El : Etalon Interne (1-eicosanol).....	104
Figure 26. Etapes de pré-traitement appliquées aux données HT-GC/MS.....	111
Figure 27. Pré-traitement NPLC/HR-MS, chargement du chromatogramme.....	115
Figure 28. Pré-traitement NPLC/HR-MS, 2ème réduction en conservant les valeurs utiles (représentées par les étoiles rouges).....	116

Figure 29. Pré-traitement NPLC/HR-MS, chromatogrammes obtenus avant et après la 2ème réduction.....	117
Figure 30. Pré-traitement NPLC/HR-MS, spectre de masse obtenus avant et après réduction par le seuil d'intensité (3a).....	117
Figure 31. Pré-traitement NPLC/HR-MS, spectres de masse obtenus avant et après 1ère étape d'élimination des isotopes (3b)	118
Figure 32. Pré-traitement NPLC/HR-MS, spectres de masse obtenus avant et après 2ème étape d'élimination des isotopes (3b)	118
Figure 33. Matrice de référence vide	119
Figure 34. Un exemple de chromatogramme restructuré	120
Figure 35. Incrémentation des intensités de l'ensemble des chromatogrammes pour créer la matrice de référence cumulée DataRef1	120
Figure 36. Profil en profondeur, région des hauts nombres d'ondes.....	124
Figure 37. Evolution du rapport $\nu\text{OH}/\nu\text{CH}$ en fonction de la profondeur	124
Figure 38. Zones de réalisation du prélèvement de sébum et des mesures biométriques	187
Figure 39. Zone de prélèvement du Stratum Corneum	187
Figure 40. Evolution du taux de porphyrine totale (A) et du taux de porphyrine liée à C. acnes (B) dans le cas de la peau normale, de la peau grasse et de la peau acnéique, sur la zone du front. Moyenne \pm SEM.	189
Figure 41. Evolution de la brillance spéculaire dans le cas de la peau normale, de la peau grasse et de la peau acnéique.....	190
Figure 42. Evolution des paramètres biométriques sur le front de sujets ayant la peau normale, la peau grasse et la peau acnéique.	190
Figure 43. Evolution de l'intensité absolue (moyenne \pm SEM) de chaque classe lipidique présente au sein des LCS, entre la peau normale et la peau grasse. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde. * $pV < 0.05$ (ANOVA).	192
Figure 44. Tableau (A) et histogramme (B) présentant les proportions représentées par chaque classe lipidique au sein de la totalité du film hydrolipidique (FHL), chez les sujets ayant la peau normale et la peau grasse. Barre d'erreur : SEM associé à la classe correspondante. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde	193
Figure 45. Histogramme représentant les composés des LCS dont l'intensité augmente significativement chez les sujets ayant la peau grasse, comparé aux sujets ayant la peau saine. L'intensité considérée prend en compte l'abondance et la variation de chaque composé. AG : acide gras ; SqO : 2,3-oxydosqualène ; DG : diglycéride ; EChol : ester de cholestérol.	196
Figure 46. Evolution du nombre d'insaturations dans la classe lipidique des cires, selon les 3 groupes de volontaires. Groupe 1 : peau normale, groupe 2 : peau grasse (grade 0 et 1) ²⁴⁶ , groupe 3 : peau acnéique (grade 2 et 3) ²⁴⁶	198
Figure 47. Evolution de l'intensité absolue (moyenne \pm SEM) de chaque classe lipidique présente au sein des LCS, entre la peau normale et la peau grasse. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde. * $pV < 0.05$ (ANOVA).	199
Figure 48. Tableau (A) et histogramme (B) présentant les proportions représentées par chaque classe lipidique au sein de la totalité du film hydrolipidique (FHL), chez les sujets ayant la peau normale et la peau acnéique. Barre d'erreur : SEM associé à la classe correspondante. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde.	200

Figure 49. Histogramme représentant les composés des LCS dont l'intensité augmente significativement chez les sujets ayant la peau acnéique, comparé aux sujets ayant la peau saine. L'intensité considérée prend en compte l'abondance et la variation de chaque composé. AG : acide gras ; SqO : 2,3-oxydosqualène ; DG : diglycéride ; EChol : ester de cholestérol.	203
Figure 50. Spectres Raman obtenus avant et après soustraction du signal correspondant à la colle.	223
Figure 51. Extraction des spectres des images du SC, A/ Exemple d'une image pseudo-couleur reconstruite à partir de l'absorbance de chaque spectre (pixel) d'une image hyperspectrale de SC, B/ Spectres bruts extraits aléatoirement de l'image hyperspectrale.	224
Figure 52. Extraction des spectres à partir des images de références (sur colle), A/ Exemple d'une image contenant principalement des spectres de colle avec des traces de spectres de SC (partie rouge), B/ Spectres extraits aléatoirement de l'image hyperspectrale.	224
Figure 53. Spectres ATR extraits des images spectrales, A/ avant prétraitement, B/ après prétraitement.	225
Figure 54. Spectres moyens des clusters obtenus par K-means (centroïdes), 3 sont associés à la colle (en rouge) et 2 au signal du SC (en noir).	227
Figure 55. Exemple de spectre obtenu en ATR-imaging après étapes d'élimination du signal associé à la colle	228
Figure 56. Exemple de chromatogramme obtenu après analyse par NPLC/HRMS, dans le cadre du projet « Under The Pole »	229
Figure 57. A. Evolution du contenu en eau, mesurée par Moisturemeter, B. Evolution de la perte insensible en eau, mesurée par Vapometer, avant et après la plongée. Moyenne ± SEM. T0 : juste avant la plongée, T1 : juste après la plongée, T2 : 5min après la plongée.	230
Figure 58. Evolution du contenu en eau (en bleu) et de la perte insensible en eau (en rouge) au cours des dix premiers jours de l'expédition.	230
Figure 59. Evolution du contenu en eau (en bleu) et de la perte insensible en eau (en rouge) au cours de la totalité de l'expédition (J0, J28 et J56).	231
Figure 60. Apparence du visage à J0, J28 et J56 de l'expédition.	231
Figure 61. Evolution de l'ordre conformationnel des lipides du SC à J0, J28 et J56, obtenue par analyse du ratio $\nu_{C-Ctrans}/\nu_{C-Cgauche}$	232
Figure 62. Evolution de la structure secondaire des protéines : ratio entre les feuilletts β et les hélices α	233
Figure 63. Evolution de la position de ν_{symCH2} observée en ATR-imaging, à J0, J28 et J56 de l'expédition.	234
Figure 64. Evolution du rapport des structures secondaires des protéines : feuilletts β /hélices α ; à J0, J28 et J56 de l'expédition.	235

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature des sous-classes possibles de céramides. Les sous-classes soulignées correspondant à celles détectées au sein du SC jusqu'à aujourd'hui.	47
Tableau 2. Classification GEA ²⁴⁶	64
Tableau 3. Attribution des bandes et marqueurs Raman in-vivo d'intérêt ^{155,311,321-326}	88
Tableau 4. Détermination de la structure secondaire des protéines	91
Tableau 5. Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses Raman	110
Tableau 6. Rapports masse / charge (m/z) majoritaires obtenus pour chaque classe lipidique des LCS, après analyse en HT-GC/MS, ionisation chimique (IC). M : masse moléculaire, TMS : groupement triméthylsilyl.....	114
Tableau 7. Sous-classes de céramides augmentant significativement (pV<0.01) chez les volontaires âgées, comparativement aux volontaires jeunes. Tr : Temps de rétention.	178
Tableau 8. Sous-classes de céramides diminuant significativement (pV<0.01) dans les volontaires âgées, comparativement aux volontaires jeunes. Tr : Temps de rétention.	179
Tableau 9. Coefficients de réponse (K) associé à chaque classe lipidique, obtenus par analyses en HT-GC/MS dans le cas de l'étude sur l'acné.	188
Tableau 10. Composés lipidiques identifiés comme augmentant significativement (pV<0,05) chez les sujets ayant la peau grasse, comparés aux sujets ayant la peau normale, après analyses par HT-GC/MS.....	194
Tableau 11. Composés lipidiques identifiés comme augmentant significativement (pV<0,05) chez les sujets ayant la peau acnéique, comparés aux sujets ayant la peau normale, après analyses par HT-GC/MS.....	201
Tableau 12. Sous-classes de céramides augmentant significativement (pV<0.01) dans la peau grasse (groupe 2), comparativement à la peau normale (groupe 1). Tr : Temps de rétention.....	207
Tableau 13. Sous-classes de céramides augmentant significativement (pV<0,01) dans la peau à tendance acnéique (groupe 3), comparativement à la peau normale (groupe 1). Tr : Temps de rétention.....	211
Tableau 14. Sous-classes de céramides diminuant significativement (pV<0,01) dans la peau à tendance acnéique (groupe 3), comparativement à la peau normale (groupe 1). Tr : Temps de rétention.....	212
Tableau 15. Sous-classes de céramides diminuant significativement (pV<0,01) dans la peau à tendance acnéique (groupe 3), comparativement à la peau grasse (groupe 2). Tr : Temps de rétention.....	214
Tableau 16. Tableau récapitulatif des modifications significatives observées dans le cas de la peau grasse et de la peau acnéique, comparées à la peau saine. NS : non significatif...217	217

Introduction

Constituant l'enveloppe externe du corps, la peau assure la protection de l'organisme. Cela fait de cet organe un vaste sujet de recherche dans le domaine de la dermo-cosmétique, afin de mieux comprendre et ainsi de pallier aux diverses altérations et pathologies cutanées. Outre ce rôle majeur, la peau possède également un rôle crucial dans l'image que l'on renvoie et dans les relations sociales. Aujourd'hui, dans une société où l'aspect physique occupe une place très importante, la lutte contre les modifications de la peau dans des situations physiologiques et pathologiques représente un enjeu majeur.

Afin de maintenir ce rôle majeur de protection, la peau possède une fonction primordiale de barrière cutanée, protégeant des agressions extérieures mais également permettant de maintenir un environnement interne adéquat. Pour cela, le *Stratum Corneum*, constituant la couche la plus externe de l'épiderme, ainsi que le film hydrolipidique, le recouvrant, interviennent comme les éléments essentiels contribuant à la propriété barrière de la peau.

En effet, le SC est composé de cornéocytes entourés par un ciment lipidique possédant un rôle clé dans l'efficacité de la barrière cutanée. Il est constitué de différentes classes de lipides, parmi lesquelles les céramides représentent la majorité autant au niveau quantitatif (~ 50%) que qualitatif. Leur complexité structurale rend leur caractérisation complexe et l'utilisation de techniques analytiques performantes essentielle. Afin de parvenir à la caractérisation de leur composition, la chromatographie liquide haute performance en phase normale, couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (NPLC/HR-MS) apparaît comme étant la méthode la plus appropriée. En parallèle, la spectroscopie Raman *in vivo*, nous permettra d'obtenir des informations structurales concernant les lipides et les protéines constituant le SC.

Le film hydrolipidique constitue lui 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. Leur composition résulte i/ de la composition lipidique du sébum natif, ii/ de la composition lipidique du ciment intercornéocytaire, iii/ de l'activité enzymatique de la surface cutanée. Elle peut ainsi être modifiée quand le film

hydrolipidique est impliqué dans certaines perturbations cutanées telles que l'acné. Ces LCS permettent entre autres d'assurer une protection contre le dessèchement, ainsi que les agressions bactériennes ou oxydatives. Des travaux de caractérisation précédemment réalisés au sein du laboratoire Lip(Sys)² ont abouti à la détermination de la composition globale de l'ensemble des LCS en conservant les structures lipidiques dans leur intégrité structurale. Cette caractérisation a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS).

Les LCS ainsi que les lipides du SC jouent donc un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de la peau, et constituent de ce fait des éléments importants à étudier et à analyser afin d'obtenir une meilleure caractérisation des phénomènes cutanés physiologiques et pathologiques. Une observation large, prenant en compte l'état moléculaire quantitatif et qualitatif ainsi que les caractéristiques biométriques de la surface de l'épiderme semblent présenter un intérêt majeur.

L'objectif de cette thèse consistait en la mise en place d'une méthodologie analytique intégrée comprenant i/ l'optimisation de l'étude de la composition des LCS ii/ l'association de cette composition à celle des lipides du SC superficiel, iii/ la corrélation avec des marqueurs spectroscopiques (Raman *in vivo*) et biométriques (hydratation, PIE, pH, élasticité) et iv/ la mise en place d'un outil chimiométrique associant l'ensemble des données afin d'établir un « témoin analytique de la surface cutanée ».

Ces données nous ont permis d'accéder à une meilleure compréhension sur le plan moléculaire, structural et biométrique du rôle des lipides cutanés dans différentes situations physiopathologiques, dont le vieillissement cutané, l'acné, ou encore l'adaptation aux conditions environnementales extrêmes.

Les travaux expérimentaux réalisés durant cette thèse se sont déroulés en trois parties :

- Une première étude permettant la mise en place et l'optimisation des protocoles, du choix des méthodes, ainsi que des différentes analyses et du traitement de données. En effet, la seconde étude portant sur une population pathologique et nécessitant un

cadre juridique particulier, cette étape était indispensable. Afin d'optimiser les ressources, il a été choisi de réaliser cette étude sur le paramètre physiologique du vieillissement, sur un panel conséquent permettant l'utilisation et la valorisation des résultats obtenus. Les résultats obtenus et les optimisations réalisées ont pu être utilisés pour la réalisation des études cliniques suivantes.

- Une seconde étude permettant la caractérisation de la peau dans le cas de l'acné, en étudiant des sujets ayant la peau saine, la peau grasse et la peau à tendance acnéique. En raison du caractère pathologique des peaux étudiées, cette étude a été réalisée dans un cadre réglementaire spécifique, dont les informations seront présentées dans la partie dédiée.
- Enfin, la participation au projet « Under The Pole » a permis la réalisation d'une étude portant sur l'impact des conditions environnementales extrêmes sur la peau.

Partie 1 : Etude bibliographique

I. Structure générale de la peau

Barrière entre le milieu intérieur et extérieur de notre corps, la peau est un organe vital indispensable et complexe, recouvrant l'ensemble du corps, et dont le fonctionnement possède 2 finalités majeures :

- Assurer la communication entre notre propre organisme et le milieu environnant,
- Protéger l'ensemble de notre organisme contre de nombreuses agressions extérieures.

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).

Ayant une épaisseur allant de 0,5mm à 4-5mm selon la zone corporelle, et une surface d'environ 2m², cela fait de cet organe le plus étendu du corps humain, avec un poids qui atteint 5kg pour la totalité ainsi qu'une composition faite à 72% d'eau^{1,2}.

La peau est constituée de plusieurs couches, superposées les unes sur les autres. 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 et d'une flore cutanée importante (Figure 1). Au sein de ces différentes couches sont contenues diverses annexes cutanées telles que les glandes sudoripares, les glandes sébacées et les follicules pileux, un important réseau sanguin et lymphatique, des fibres nerveuses ainsi que des cellules immunitaires.

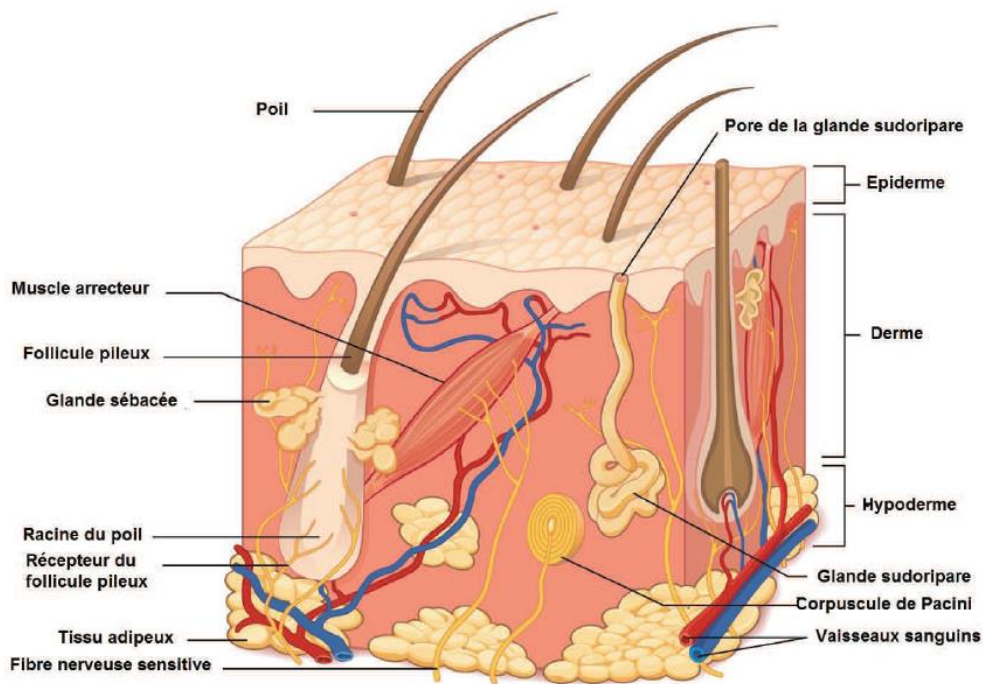


Figure 1. Schéma de la structure générale de la peau³

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

1. Epiderme

L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau, très résistante, et la plus fine avec une épaisseur moyenne de 100µm. C'est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé formé de plusieurs couches successives, non vascularisées⁴ (Figure 2).

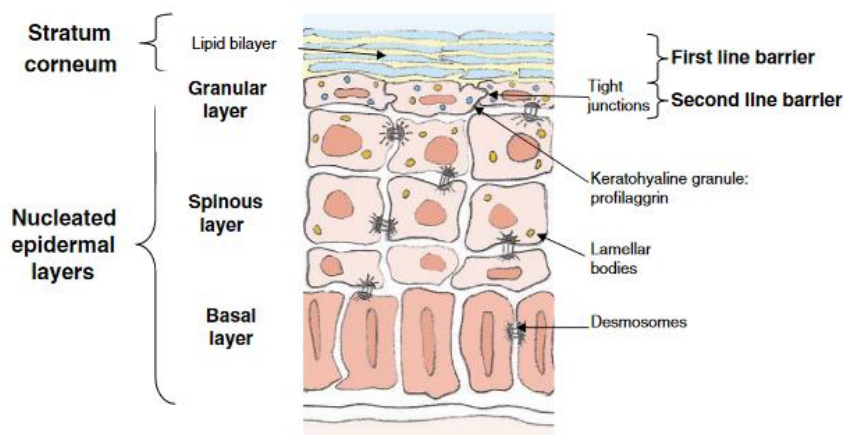


Figure 2. Structure de l'épiderme⁴

Le *stratum corneum* (SC) ou couche cornée, représentant la partie la plus superficielle et la plus fine de l'épiderme avec une épaisseur de 10 à 20 μm ⁵, est un élément fondamental permettant la protection de l'organisme. Il est constitué de piles de cellules anucléées aplaties, les cornéocytes, reliées entre elles par les desmosomes.

L'ensemble est contenu dans une matrice lipidique remplissant l'espace intercellulaire et constituée d'un mélange très complexe de céramides, cholestérol et acides gras libres dans des proportions très variables selon l'individu et la localisation anatomique⁶.

Cette couche est recouverte d'un microbiote formé de micro-organismes et d'un film hydrolipidique (FHL) composé d'un mélange de sueur et de lipides. Cette organisation procure à la peau des propriétés physico-chimiques permettant de lui conférer une certaine perméabilité à l'eau, tout en laissant passer de petites molécules, propriété très largement utilisée pour l'application de médicaments et cosmétiques.

Au sein de ces différentes couches, l'épiderme est formé de quatre types cellulaires :

- Les kératinocytes (80% des cellules de l'épiderme), qui possèdent une capacité à se différencier en fabriquant de la kératine. La kératine est une protéine fibreuse insoluble dans l'eau, qui contribue, à travers les kératinocytes, à la fonction barrière cutanée de l'épiderme. Ces kératinocytes naissent au niveau de la couche basale pour ensuite migrer vers la couche cornée, tout en se différenciant.
- Les mélanocytes (<1% des cellules de l'épiderme), assurent la synthèse de mélanine, responsable de l'absorption des rayons ultraviolets du soleil, protégeant ainsi les cellules dont l'ADN, sensible à ce type de rayonnement. Les mélanocytes sont également responsables, en partie, de la coloration de la peau.
- Les cellules de Langherans (2 à 7% des cellules épidermiques), appartiennent au système immunitaire et permettent ainsi de défendre l'organisme contre les agressions extérieures.
- Les cellules de Merkel sont des cellules neuroépithéliales possédant une fonction de mécanorécepteur.

L'épiderme constituant l'interface directe avec le milieu environnant, il est une cible privilégiée pour la réalisation de mesures cutanées.

Entre les kératinocytes basaux et le derme papillaire existe une ligne ondulée permettant l'adhérence entre le derme et l'épiderme. La jonction dermo-épidermique (JDE) possède une ondulation caractéristique des peaux jeunes. De l'épiderme vers le derme, elle est constituée de deux minces feuillets : la lame basale d'origine épithéliale, majoritairement constituée de collagène de type IV et de glycoprotéines ; et la lame réticulaire constituée de collagène de type III⁷.

2. Derme

Possédant une épaisseur de 1 à 4 mm⁸, le derme constitue une couche intermédiaire de tissu de soutien fibroélastique. Il peut être divisé en deux couches :

- le derme papillaire qui se trouve à l'interface avec l'épiderme, il est très vascularisé et possède une structure fibreuse et ordonnée constituée de fines fibres de collagène entrelacées et orientées perpendiculairement à l'épiderme. Cette couche constitue la zone d'échanges nutritifs avec les couches profondes de l'épiderme.
- le derme réticulaire constitue la majeure partie du derme. Ce derme profond dispose d'une structure dense en fibres et désordonnée, possédant des grosses fibres de collagène disposées en faisceaux épais et irréguliers. Cette couche est directement en contact avec l'hypoderme.

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. Ces cellules sont associées à des fibres de collagène, d'élastine et de réticuline. La cohésion de l'ensemble de ces éléments est assurée par la substance fondamentale, synthétisée par les fibroblastes et constituée essentiellement de mucopolysaccharides, dont l'acide hyaluronique.

Le derme renferme le système vasculaire de la peau, nécessaire à l'apport des nutriments et de l'oxygène. On y trouve également des fibres et terminaisons nerveuses, des récepteurs sensoriels (corpuscules de Meissner, de Ruffini et de Pacini) et des cellules musculaires lisses et striées. Le derme permet l'implantation de toutes les annexes cutanées : glandes et canal excréteur des glandes sudoripares, bulbes des poils et glandes sébacées.

3. Hypoderme

Couche la plus profonde de la peau, l'hypoderme possède une épaisseur très variable selon les individus et la localisation. Composé d'adipocytes qui stockent les graisses, il constitue un isolant thermique important et un protecteur mécanique essentiel, en étant responsable de la plasticité du tissu cutané et en jouant une fonction d'amortisseur des chocs. De plus, il constitue le réservoir énergétique du corps humain.

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé et innervé. Les adipocytes, contenus dans des lobules adipeux séparés les uns des autres par des fibres identiques à celles observées dans le derme, assurent nutrition et soutien de l'hypoderme, tout en permettant le passage de vaisseaux sanguins et de nerfs destinés au derme.

4. Annexes cutanées

a. Glandes sudoripares

Les glandes sudoripares, également appelées glandes sudorales sont constituées de deux sortes : les glandes sudoripares eccrines et les glandes sudoripares apocrines⁹.

Les glandes sudoripares eccrines, indépendantes du poil, sont réparties sur toute la surface corporelle et débouchent à la surface cutanée par un pore. Elles sont responsables de la plus grande partie de la sécrétion sudorale, dont la fonction première est de refroidir l'organisme. Ces glandes s'étendent sur toute l'épaisseur de la peau et permettent également le maintien du pH cutané, l'hydratation cutanée et possèdent une fonction immunologique.

Les glandes sudoripares apocrines quant à elles, débouchent dans le follicule pileux, et 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. Ces glandes sont situées dans le derme profond, et sécrètent de la sueur suite à une stimulation par les fibres sympathiques adrénérgiques, résultant de stimuli émotionnels importants, ou encore suite à un contrôle exercé par les hormones sexuelles. Chez l'homme, leur rôle reste flou, leur étude étant gênée par la présence des glandes eccrines à proximité, dont la sécrétion sudorale est beaucoup plus abondante.

b. Glandes sébacées

Les glandes sébacées sont des glandes vascularisées réparties sur l'ensemble de la surface corporelle, hormis les paumes et les plantes, et ont pour fonction essentielle la sécrétion de sébum. Ces glandes sont situées dans le derme moyen et arrivent au canal pileux par le canal sébacé, formant alors un follicule pilosébacé¹.

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. Le sébum possède un important rôle fungistatique et bactériostatique, protégeant ainsi la peau des agressions cutanées et participant à la bonne tenue du *stratum corneum* ; ainsi qu'un rôle de protection contre le rayonnement solaire sur le visage pour les peaux blanches¹⁰.

c. Follicules pileux

Les follicules pileux sont présents, chez l'homme, sur la quasi-totalité de la surface corporelle, hormis les paumes et les plantes et les muqueuses buccales et génitales, pour un nombre total d'environ 5 millions. Les poils possèdent des rôles de protection contre le soleil et le froid, particulièrement au niveau de la chevelure, ainsi qu'une fonction tactile pour les cils.

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^{3,11} :

- Auto-entretien et auto-réparation, grâce aux processus de réparation et de cicatrisation.
- Barrière contre les agressions extérieures, en apportant une protection mécanique contre les chocs et cisaillements, une protection chimique limitant l'absorption de substances exogènes et permettant la conservation de l'eau et des substances endogènes nécessaires, une protection microbiologique contre les bactéries pathogènes.
- Barrière photoprotectrice contre les rayons UV.
- Fonction psychorelationnelle en constituant un organe essentiel dans la relation sociale, dans l'aspect physique et dans la communication.
- Fonction neurosensorielle permettant la perception de la température et de la douleur.
- Organe de thermorégulation, particulièrement dans les pertes de chaleur, grâce à l'hypoderme.
- Fonction immunitaire en formant la première barrière et la première étape d'information et de défense dans les processus d'immunité.
- Fonction métabolique passant par la synthèse de la vitamine D, mais également par la conversion de la testostérone en di-hydrotestostérone, plus active.

Du fait de sa composition et l'importance de ses fonctions, l'étude de la structure de la peau constitue ainsi une étape fondamentale pour comprendre le comportement cutané dans différentes conditions physiologiques et pathologiques.

Au sein de sa composition, la peau contient une quantité importante de lipides, notamment 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 de la composition des lipides du sébum ainsi que celle des lipides du *Stratum Corneum* représentent alors un enjeu majeur dans la caractérisation de la peau dans différentes situations physiologiques et pathologiques.

II. Film hydrolipidique

1. Origine du film hydrolipidique

Le *Stratum Corneum*, couche la plus superficielle de l'épiderme, est recouvert par le film hydrolipidique, composé d'une phase aqueuse provenant majoritairement de la sueur et d'une phase lipidique. La phase lipidique, correspondant aux « lipides cutanés de surface » (LCS) est composée d'un mélange complexe de lipides provenant de la sécrétion sébacée, avec une contribution mineure des lipides d'origine épidermique (3-6%)^{12,13}.

La quantité de lipides à la surface de la peau varie en fonction de la zone corporelle, pouvant aller de 1µg/cm² au niveau de la jambe, 34µg/cm² au niveau du dos, à 189 ± 42.7µg/cm² sur le front, où la quantité de sébum est la plus importante¹⁴.

Les glandes sébacées sont des glandes exocrines, la plupart du temps associées à la partie supérieure d'un follicule pileux, formant ainsi l'unité pilo-sébacée. 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). Les glandes sébacées sont retrouvées sur toute la surface cutanée, hormis la paume des mains et la plante des pieds¹⁵.

La glande sébacée est composée de sébocytes à différents stades de différenciation et de maturation. La couche la plus externe de la glande, couche germinative, est composée de petits sébocytes indifférenciés en mitose active qui proviennent des cellules souches sébocytaires. Ces sébocytes arrêtent ensuite de se différencier et migrent vers la lumière de la glande. Cette période est appelée maturation, pendant laquelle les sébocytes se chargent en gouttelettes lipidiques et en équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des lipides. A la suite de cette étape a lieu la différenciation terminale, caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, la synthèse des lipides et une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et par 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)¹⁶.

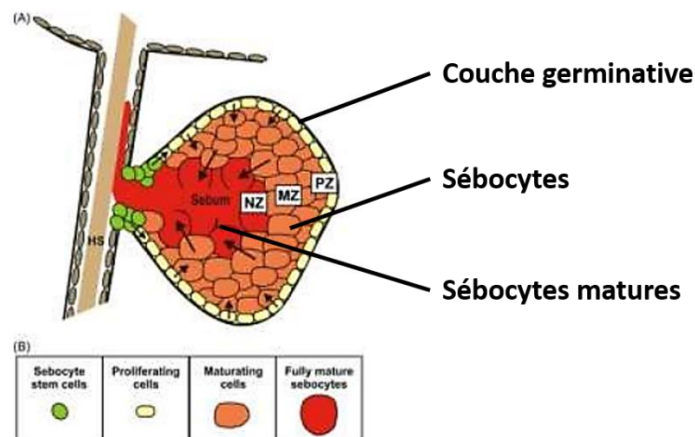


Figure 3. Etapes de la différenciation sébocytaire¹⁶

2. Composition des lipides cutanés de surface (LCS)

Les lipides cutanés de surface (LCS) représentent un mélange complexe de lipides, parmi lesquels on retrouve des **glycérides** (MG, DG et TG), des cires, des **acides gras libres**, du **squalène**, et en faible quantité du **cholestérol** et des **esters de cholestérol** (Figure 4)¹⁷.

D'après les travaux de Greene *et al.*¹², les triglycérides et les acides gras libres représentent la part la plus importante du sébum (57,5%), suivis ensuite par les cires (26%) et le squalène (12%). Les esters de cholestérol représentent environ 4,5% des lipides totaux. Cependant, une forte variation interindividuelle est observée, et la composition peut être modifiée par des facteurs individuels tels que les variations de concentrations enzymatiques, de pH ou encore de température extérieure^{16,18-20}.

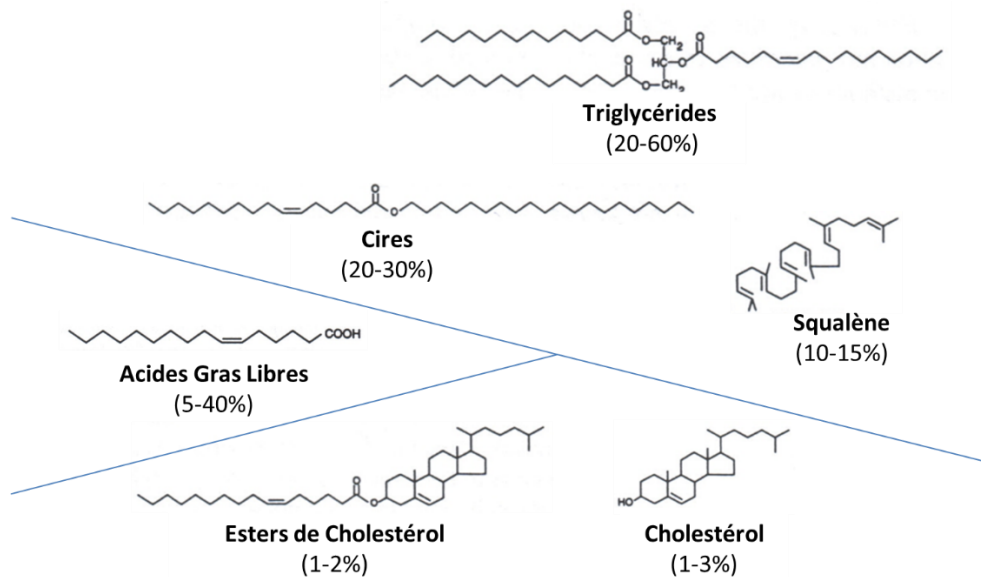


Figure 4. Structure et répartition des différentes classes de lipides cutanés de surface

a. Acides gras

Au sein des LCS, les acides gras sont présents sous forme libre ou sous forme estérifiée, *i.* par le glycérol (glycérides), *ii.* par des alcools gras (cires), *iii.* par des stérols (principalement le cholestérol). Ils possèdent une double origine, sébacée et épidermique¹³.

Les acides gras libres, représentant entre 5 et 40% des LCS, contiennent seulement 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) ou encore l'acide linoléique (C18 :2)²¹.

Les acides gras cutanés possèdent des longueurs de chaîne à nombre pair ou impair d'atomes de carbone, linéaires ou méthylées en différentes positions et pouvant être saturées ou insaturées. Les longueurs de chaîne vont essentiellement de C10:0 (acide décanoïque) à C24:1 (acide tétracosanoïque)²¹⁻²³. De plus, les acides gras comportant 16 et 18 atomes de carbone sont les plus représentés au sein des LCS, l'acide sapiénique (C16:1Δ6) étant le lipide majoritaire. Des acides gras libres comportant une plus petite chaîne carbonée peuvent également être retrouvés dans des quantités négligeables²³.

Le nombre d'insaturation augmente avec le nombre d'atomes de carbone^{21,24}. La présence d'une double liaison entre les carbones 6 et 7 est tout à fait caractéristique des AG cutanés ; mais la double liaison entre les carbones 9 et 10, est également retrouvée au niveau cutané. Les AG insaturés en position $\Delta 6$ seraient pratiquement tous d'origine sébacée, alors que les AG insaturés en position $\Delta 9$ seraient surtout d'origine épidermique¹⁸. Downing et Greene²⁵ ont montré que, quelle que soit la position de l'insaturation ($\Delta 6$ ou $\Delta 9$), les composés insaturés majoritaires présentent une chaîne en C16 alors que, dans les autres tissus animaux, les composés insaturés majoritaires présentent une chaîne en 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 cires²⁶.

b. Squalène

Le squalène est un hydrocarbure triterpénique composé de 30 atomes de carbone ($C_{30}H_{50}$). Marqueur de la fonction sébacée chez l'humain^{27,28}, sa proportion est très variable selon la zone corporelle. Il est majoritairement présent au niveau du front, avec une proportion de 10 à 15% des LCS¹².

Il est un intermédiaire essentiel dans la biosynthèse du cholestérol, possède diverses fonctions en tant qu'émollient, anti-oxydant ainsi que pour l'hydratation²⁹.

Par sa structure chimique possédant un nombre élevé d'insaturations, il est très sensible aux réactions de peroxydation. Le squalène monohydroperoxide (SQOOH) constitue le premier produit d'oxydation³⁰. Le 2,3-oxidoqualène ou 2,3-epoxysqualène (SQO) a également été retrouvé dans les LCS²³.

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 gras²¹.

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 surface¹³.

Les cires identifiées sont comprises entre le myristate de myristate ($C_{28}H_{56}O_2$) et le lignocérate de palmitoléyle ($C_{40}H_{76}O_2$). Des cires saturées et insaturées sont présentes, dans lesquelles l'entité acide et / ou l'entité alcool peuvent être insaturées. Les cires des LCS possèdent une proportion importante d'acides gras ramifiés et un pourcentage d'insaturation élevé^{21,24}.

Les entités d'acides gras identifiées sont principalement l'acide hexadécénoïque ($C_{16:1}$) et l'acide hexadécanoïque ($C_{16:0}$), ce qui suggère l'importance de l'acide palmitique et de son homologue insaturé dans le film hydrolipidique²³.

La structure des alcools gras des cires d'origine humaine est en relation étroite avec celle des acides gras. Il est en effet possible de rencontrer des composés de structures très variées : chaînes à nombre de carbones pair ou impair, ramifiées ou non, saturées ou insaturées (principalement en $\Delta 6$)¹⁸. Les longueurs des chaînes hydrocarbonées saturées et mono-insaturées se situent entre C_{12} et C_{24} , avec une proportion importante de composés en C_{20} , C_{22} et C_{24} ³¹. Au sein des lipides cutanés, les alcools gras sont seulement retrouvés dans les cires. Ils sont principalement synthétisés par la glande sébacée³².

Plusieurs études ont mentionné la rareté des acides gras supérieurs à C_{18} dans les cires par rapport aux acides gras présents dans les autres esters^{33,34}.

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. Les lipases bactériennes et épidermiques sembleraient incapables d'hydrolyser les cires^{26,35}.

d. Glycérides

Les triglycérides (TG) sont des triesters d'acides gras formés à partir d'une molécule de glycérol et de trois acides gras. Ils peuvent être simples si les trois acides gras sont

identiques, ou mixtes si les chaînes d'acides gras sont différentes.

Après leur sécrétion et sous l'influence de lipases issues de micro-organismes de la flore cutanée, les triglycérides sont partiellement hydrolysés^{21,36}. Cette hydrolyse entraîne la libération de glycérol, d'acides gras libres (AGL), de monoglycérides (MG) et de diglycérides (DG)³⁸⁻⁴² (Figure 5) et provoque ainsi l'augmentation de la teneur en acides gras libres présents à la surface de la peau^{21,36-38}. Les triglycérides ainsi que leurs produits d'hydrolyse représentent la majeure partie des LCS, avec une proportion allant de 55 à 65% selon les régions corporelles¹².

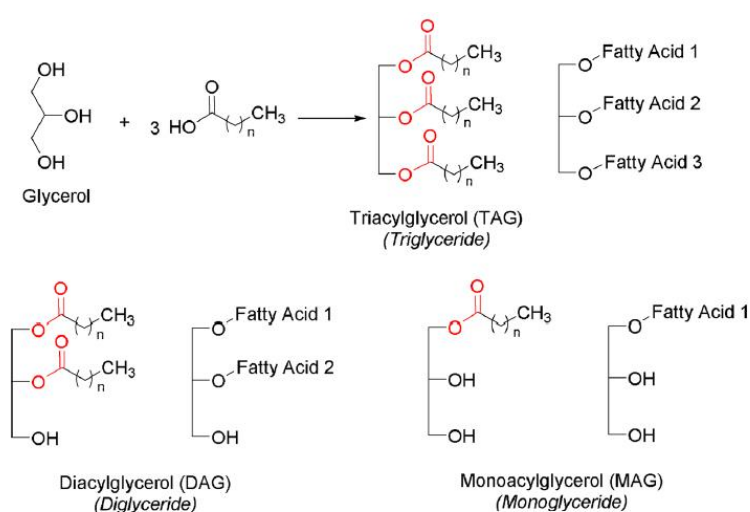


Figure 5. Structure générale des triglycérides, diglycérides et monoglycérides³⁹

Au sein des LCS, la classe des glycérides comporte des AG ayant des longueurs de chaînes entre C12 et C18. 5 monoglycérides ont été identifiés, allant de C14 à C18, le monopalmitine étant le MG prédominant. Concernant les diglycérides, le nombre total de carbone varie entre C34 et C39 au sein des LCS. Les triglycérides identifiés possèdent un nombre total de carbone compris entre C45 et C54. De plus, la majorité des TG sont constitués de TG mixtes avec différentes longueurs de chaînes d'hydrocarbures dans le même composé²³.

Des di- et triglycérides, d'origine sébacée, sont également retrouvés en faible quantité dans la matrice lipidique du SC^{40,41}. Ils possèdent une influence sur la différenciation épidermique et la fonction barrière cutanée. En effet, l'hydrolyse des TG forme les acides gras nécessaires

à la synthèse des oméga-O-acylcéramides, présents dans l'enveloppe cornifiée.

Des études lipidomiques suggèrent que ces glycérides provenant du sébum, pénètrent progressivement dans le SC. Une quantité stable est retrouvée à une profondeur d'environ 5 à 7 couches cellulaires dans le SC⁴².

e. Stérols

Cette classe est composée de stérols libres et estérifiés avec des acides gras libérés par le sébum ou l'épiderme. Ils constituent d'importants marqueurs au niveau de l'épiderme^{12,27}. En effet, leur contribution est directement liée à la dynamique de kératinisation. Plusieurs équipes ont montré que la glande sébacée produisait du squalène et peu ou pas de cholestérol, alors que l'épiderme synthétise du cholestérol sans accumulation de squalène^{12,27}.

La desquamation de l'épiderme est à l'origine de la libération, à la surface cutanée, de cholestérol libre et estérifié avec des acides gras. Une augmentation de la quantité de stérols au sein des LCS traduit une augmentation du renouvellement de l'épiderme²⁷.

- Stérols libres

Le cholestérol, marqueur de desquamation cutanée^{43,44}, est le principal stérol libre identifié. C'est un composant de la membrane cellulaire⁴⁵, représentant 1 à 2% de la totalité des LCS. Le lanostérol, intermédiaire de synthèse du cholestérol à partir du squalène^{28,46}, est également présent au sein des LCS²³.

- Stérols estérifiés

Les stérols libres sont synthétisés par l'épiderme, puis estérifiés par des acides gras provenant du sébum ou de l'épiderme³⁴. Les stérols estérifiés par les acides gras essentiels représenteraient des composés nécessaires au processus de kératinisation⁴⁷.

Les acides gras liés aux stérols possèdent des chaînes souvent monoinsaturées et plus rarement ramifiées¹³. Les esters de cholestérol identifiés au sein des LCS possèdent des

acides gras avec des longueurs de chaînes entre C14 et C18²³. Le composé le plus abondant observé est le « cholesteryl hexadecenoate ».

3. Rôles du film hydrolipidique

Les différents rôles du film hydrolipidique et particulièrement des LCS ne sont encore aujourd'hui pas complètement compris et font l'objet de diverses recherches^{48,49}. Il représente néanmoins un acteur essentiel de la fonction barrière cutanée⁵⁰⁻⁵².

Le film hydrolipidique permet principalement de réguler l'homéostasie de la peau, en la protégeant contre le dessèchement et la chaleur. Il joue en effet un rôle important dans le maintien de l'hydratation du SC⁵³. Il permet également une protection contre les effets toxiques du stress oxydatif comme l'irradiation par les UVB, et permet de lutter contre le vieillissement grâce à la présence d'antioxydants dans sa composition, notamment la vitamine E (tocophérol)^{45,48,54}. Grâce à la présence de l'acide sapiénique (C16 :1Δ6), il possède une importante fonction antimicrobienne⁵⁵. Les acides gras contenus dans le sébum participent à la régulation du pH cutané⁴³, essentiel pour l'homéostasie du microbiome⁵⁶.

Une dérégulation de la composition et/ou de la quantité du sébum peut être en lien avec diverses pathologies cutanées, comme par exemple l'acné et la dermatite atopique. La présence de sébum peut en effet perturber l'organisation des lipides épidermiques⁵¹. Il a été montré qu'en cas d'un excès de sébum, l'organisation hexagonale des lipides épidermiques devient beaucoup plus fréquente, reflétant une désorganisation des bicouches lipidiques⁵⁷ et donc une plus grande perméabilité du SC. Ces résultats ont été confirmés chez la souris après application topique en excès de sébum humain, une augmentation significative de la perméabilité du SC et l'apparition de réactions inflammatoires ont été observées⁵⁸.

III. Stratum corneum

1. Origine du Stratum Corneum

Le *Stratum Corneum*, couche la plus superficielle de l'épiderme 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. Des facteurs naturels d'hydratation (NMF), représentant un mélange de molécules hygroscopiques sont également retrouvés au sein du 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. La principale fonction de la peau étant de former une barrière entre le milieu interne et l'environnement extérieur hostile, une barrière de perméabilité qui empêche la perte d'eau et d'électrolytes est donc essentielle.

Cette barrière est médiée principalement par des membranes lamellaires enrichies en lipides qui sont localisées dans les espaces extracellulaires du *Stratum Corneum*. Au sein du SC, les lipides intercellulaires représentent 15% du poids total sec⁵⁹. Ces membranes enrichies en lipides ont une structure unique et contiennent environ 50% de céramides, 25% de cholestérol et 15% d'acides gras libres avec très peu de phospholipides⁶⁰. Les corps lamellaires, formés lors de la différenciation des kératinocytes, jouent un rôle clé dans la délivrance des lipides des cellules du *Stratum Granulosum* dans les espaces extracellulaires du *Stratum Corneum*. Les corps lamellaires contiennent principalement des glucosylcéramides, des sphingolmyélines, des phospholipides et du cholestérol. Après l'exocytose des lipides lamellaires dans l'espace extracellulaire du *Stratum Corneum*, ces lipides précurseurs sont convertis respectivement par la bêta-glucocérobrosidase, la sphingomyélinase, les phospholipides en céramides et en acides gras (Figure 6)⁶¹.

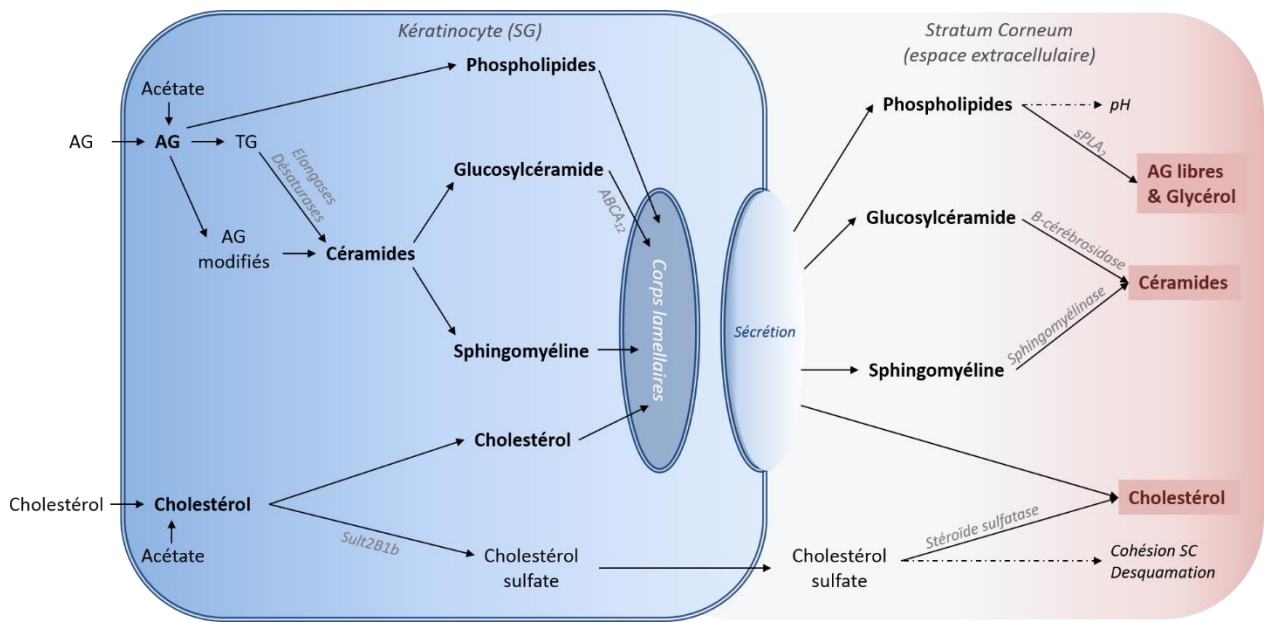


Figure 6. Biosynthèse des lipides du Stratum Corneum (adapté de Feingold et Elias ⁶¹). AG : Acides gras, TG : triglycérides.

2. Composition lipidique du Stratum Corneum

La matrice lipidique du *Stratum Corneum* est composée de 3 classes majoritaires (Figure 7): **céramides** (50%), **cholestérol** (25%) et **acides gras libres** non estérifiés (10-15%)⁶⁰. Le maintien d'une fonction barrière cutanée efficace résulte en partie de l'équilibre entre ces trois familles de lipides⁶².

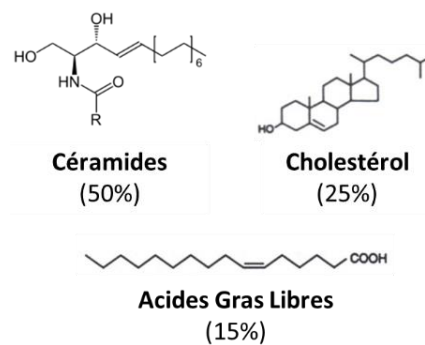


Figure 7. Structure et répartition des différentes classes lipidiques du Stratum Corneum

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%)^{59,60,63}.

La grande complexité de l'analyse lipidomique est par ailleurs augmentée par les nombreux facteurs de variations inter et intra-individuels dans la composition fine en sous-classes des lipides cutanés.

a. Acides gras libres

La classe des acides gras libres (AGL) est considérée comme essentielle dans le SC. Elle représente 10 à 15% de la totalité des lipides du ciment intercornéocytaire du SC⁶⁰.

Les AGL présentent des chaînes hydrocarbonées non ramifiées d'une longueur comprise entre C16 et C36, terminée par une fonction acide carboxylique (COOH) qui contribue à l'acidité de la peau. Au sein du SC humain, les AGL les plus abondants sont saturés, l'acide lignocérique (C24:0) et l'acide hexacosanoïque (C26:0) représentent à eux seuls 50% du poids total de cette classe lipidique⁶⁴. Les AGL possédant une longueur chaîne plus courte tels que l'acide palmitique (C16:0) ou encore l'acide stéarique (C18:0) sont situés principalement près de la surface du SC. On retrouve également des AGL mono-insaturés (acide oléique, C18:1) et poly-insaturés (acide eicosapentaénoïque, C20:5 ; acide docosahexaénoïque, C22:6 ; acide linoléique, C18:2) en plus faible quantité (25% de la totalité de la classe lipidique)⁴¹.

Wohlrab et *al.*⁶⁵, ont récemment montré que les AGL impairs (principalement C21:0, C23:0, C25:0 et C27:0)⁴¹ représentent 21% du total de cette classe dans le SC chez des sujets sains âgés de plus de 60 ans, et 23% chez les sujets sains âgés entre 18 et 40 ans.

Comme toutes les autres classes lipidiques, la composition des AGL varie selon le site anatomique. 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 pieds².

Des modifications ont également été observées dans des situations pathologiques. La concentration d'AGL insaturés et à plus courte chaîne augmente dans la dermatite atopique⁶⁶. Cette diminution de la chaîne hydrocarbonée entraîne une altération de la structure lamellaire et modifie ainsi la perméabilité de la peau.

Ces AGL possèdent un rôle primordial dans la synthèse des céramides et dans la formation

de phospholipides qui servent, eux, à générer à nouveau les AGL du ciment intercornéocytaire^{67,68}.

b. Cholestérol

Le cholestérol et ses dérivés sont des stéroïdes lipophiles (Figure 8). Le cholestérol représente environ 25% de la teneur en lipides du SC. Il possède un rôle important dans la fluidité et la rigidité du SC en contribuant à la bonne structure lamellaire et latérale des lipides.

Les esters de cholestérol quant à eux, représentent environ 10% des lipides du SC. Ces esters peuvent, en partie, être originaires de la glande sébacée⁶⁹.

Le dérivé sulfaté du cholestérol est un composant mineur, représentant 2 à 5% des lipides totaux du SC. Sa fonction n'est à l'heure actuelle pas encore bien élucidée, mais il semblerait être impliqué dans la cohésion au sein du SC et dans la régulation de la desquamation^{70,71}.

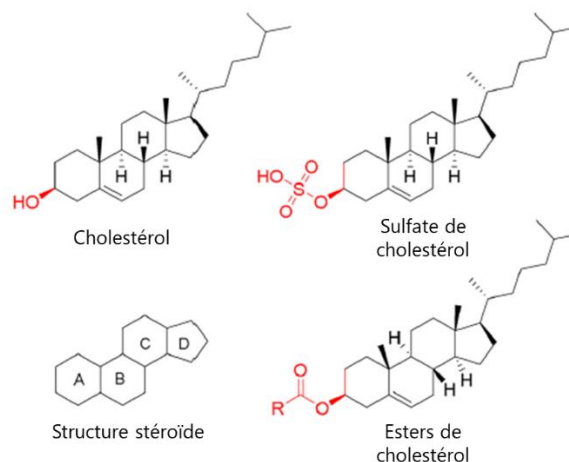


Figure 8. Structure chimique du cholestérol et de ses dérivés, contenus dans la peau humaine³⁹

c. Céramides

La classe des céramides représente 50% des lipides du ciment interconéocytaire⁶⁰. Ils sont constitués d'une partie acide gras, liée à une base sphingoïde par une liaison amide (Figure 9)⁶⁷.

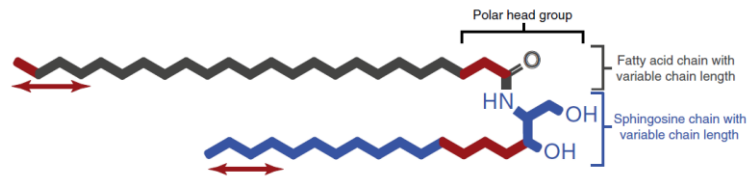


Figure 9. Formule chimique générale des céramides⁷²

La classification actuelle des céramides décrit différentes sous-classes de céramides potentiellement présentes dans l'espace extracellulaire du SC^{67,73,74}. Cette classification, très complexe en raison de la micro-hétérogénéité structurale des céramides, prend en compte différents paramètres : la longueur de la chaîne alkyle, le degré d'insaturation, le nombre de fonction hydroxyle et l'isomérisation⁶⁷.

Dans le SC, cinq bases sphingoïdes différentes ont été recensées (Figure 10)⁶⁷ :

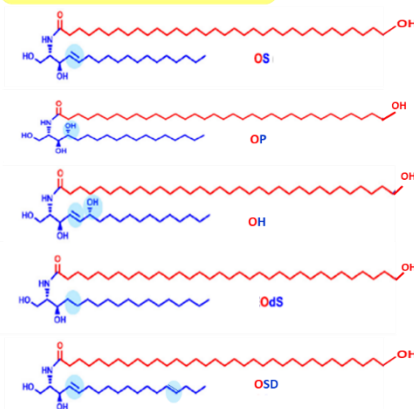
- **S** : sphingosine
- **dS** : dihydrosphingosine ou sphinganine
- **P** : phytosphingosine
- **H** : 6-hydroxy-sphingosine
- **T** : dihydroxysphinganine

Ces bases sphingoïdes, peuvent être associées à différents types d'acides gras⁶⁷ :

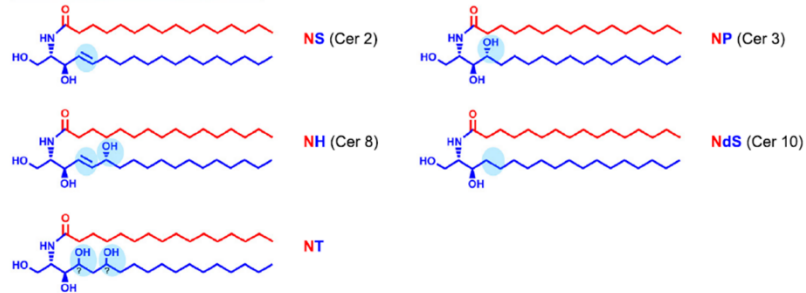
- **N** : acide gras non hydroxylé, non estérifié
- **A** : acide gras α -hydroxylé
- **O** : acide gras ω -hydroxylé, lié à l'enveloppe des cornéocytes⁷⁵
- **EO** : acide gras ω -estérifié par l'acide linoléique (C18:2)
- **1-O-E** : contient une chaîne d'acide gras supplémentaire. Le groupement hydroxyle en position 1 de la base sphingoïde est estérifié avec une chaîne d'acyle saturée.

La Figure 10 représente les différentes sous-classes de céramides regroupées selon la nature de la partie acide gras.

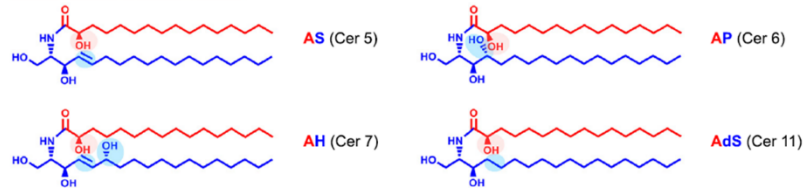
ω -Hydroxylated Ceramides



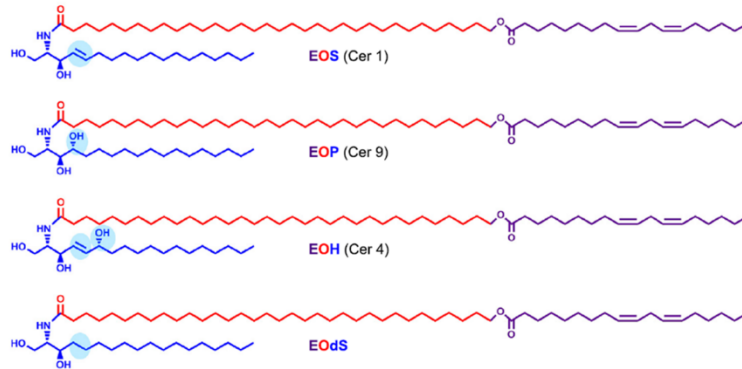
Non-Hydroxylated Ceramides



α -Hydroxylated Ceramides



ω -Esterified Ceramides



1-O-Acyl Ceramides

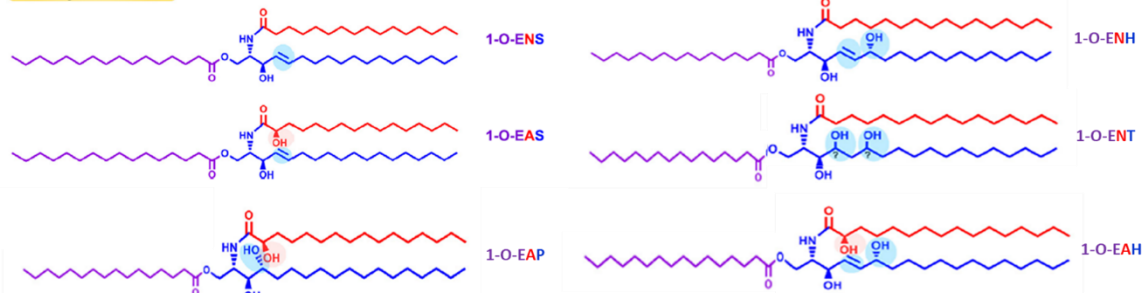


Figure 10. Diversité structurale des sous-classes de céramides (adapté de Rabionet et al.^{67,76} et mis à jour)

La description des différentes sous-classes de céramides est en constante évolution, de plus en plus d'espèces sont identifiées et mises en avant. Kawana et *al.*⁷⁷ ont identifié la base sphingoïde 4,14-sphingadiène [SD] dans le SC humain pour la première fois en 2020.

Récemment, une nouvelle sous-classe céramidique [1-O-E(EO)Cer] a également été mise en évidence dans un modèle d'épiderme reconstruit humain (EpiSkin) ainsi que dans le SC humain (Figure 11)^{78,79}.

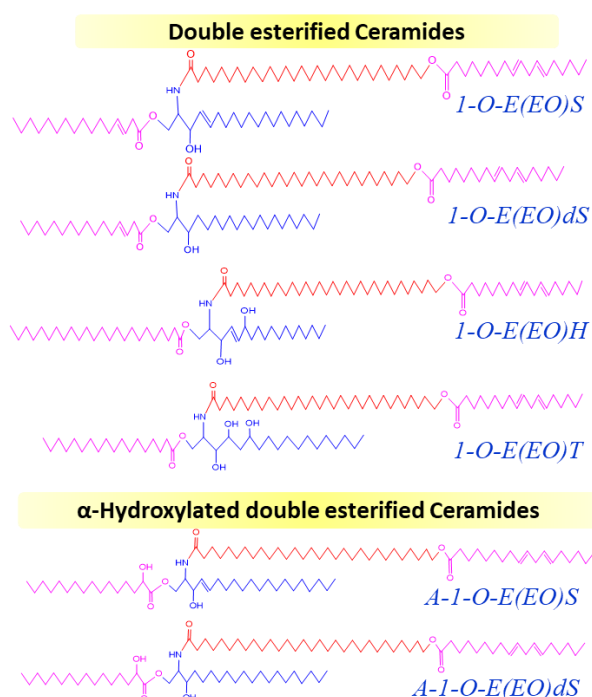


Figure 11. Structure de la sous classe des céramides [1-O-E(EO)Cer]^{78,79}

Afin d'identifier ces différentes sous-classes, Motta et *al.*⁸⁰ ont proposé une classification en désignant les classes et sous-classes de céramides par un minimum de 2 lettres. La première lettre indique le type d'acide gras attaché par la liaison amide. La dernière lettre indique la base sphingoïde. Le Tableau 1 récapitule les différentes nomenclatures qui peuvent être retrouvées pour les sous-classes en fonction de la composition de la molécule de céramide. En italique et souligné apparaissent les trente-trois sous-classes de céramides détectées dans le SC humain à ce jour.

Tableau 1. Nomenclature des sous-classes possibles de céramides. Les sous-classes soulignées correspondant à celles détectées au sein du SC jusqu'à aujourd'hui.

		Base sphingoïde					
		dS dihydrosphingosine	S sphingosine	P phytosphingosine	H 6-hydroxysphingosine	T dihydroxy- sphinganine	SD ⁷⁷ 4,14- sphingadiene
Acide gras	N non-hydroxylé	<u>NdS</u>	<u>NS</u>	<u>NP</u>	<u>NH</u>	<u>NT</u>	<u>NSD</u>
	A α-hydroxylé	<u>AdS</u>	<u>AS</u>	<u>AP</u>	<u>AH</u>	<u>AT</u>	<u>ASD</u>
	O ω-hydroxylé	<u>OdS</u>	<u>OS</u>	<u>OP</u>	<u>OH</u>	<u>OT</u>	<u>OSD</u>
	EO AG estérifié en position ω par l'acide linoléique (C18 :2)	<u>EoS</u>	<u>EOS</u>	<u>EOP</u>	<u>EOH</u>	<u>EOT</u>	<u>EOSD</u>
	1-O-EN Estérification avec chaîne acyle saturée, portée par la base sphingoïde	<u>1-O-ENdS</u>	<u>1-O-ENS</u>	<u>1-O-ENP</u>	<u>1-O-ENH</u>	<u>1-O-ENT</u>	<u>1-O-ENSD</u>
	1-O-EA Estérification avec chaîne acyle saturée, portée par la base sphingoïde	<u>1-O-EAdS</u>	<u>1-O-EAS</u>	<u>1-O-EAP</u>	<u>1-O-EAH</u>	<u>1-O-EAT</u>	<u>1-O-EASD</u>
	1-O-E(EO)⁷⁸	<u>1-O-E(EO)dS</u>	<u>1-O-E(EO)S</u>	<u>1-O-E(EO)P</u>	<u>1-O-E(EO)H</u>	<u>1-O-E(EO)T</u>	<u>1-O-E(EO)SD</u>
	A-1-O-E(EO)⁷⁹	<u>A-1-O-E(EO)dS</u>	<u>A-1-O-E(EO)S</u>	<u>A-1-O-E(EO)P</u>	<u>A-1-O-E(EO)H</u>	<u>A-1-O-E(EO)T</u>	<u>A-1-O-E(EO)SD</u>

Dans le SC humain, les sous-classes de céramides les plus représentées au niveau de l'intérieur de l'avant-bras sont [NP] et [NH]. Les chaînes d'acides gras les plus couramment retrouvées dans les céramides du SC sont principalement des longues chaînes hydrocarbonées saturées⁶⁰, allant de C24 et C26^{41,77,81}. Les chaînes hydrocarbonées des entités sphingoïdes les plus courantes sont comprises entre C18 et C22. D'autres études ont montré que les céramides comportant des longueurs de chaînes d'acides gras impaires sont potentiellement liés au métabolisme de la phytosphingosine^{82,83}.

Il a été montré que la longueur de la chaîne d'AG influence la perméabilité cutanée⁸⁴. En effet, les céramides à courte chaîne ne possèdent pas les propriétés de barrière des céramides à longue chaîne, bien qu'ils aient les mêmes groupes de tête polaires et la même

capacité de liaison hydrogène. Les chaînes aliphatiques courtes ne permettent pas le maintien d'interactions efficaces avec d'autres chaînes lipidiques, liens primordiaux dans l'architecture lamellaire du SC. La perméabilité la plus élevée a été trouvée dans les céramides contenant des acides gras ayant des longueurs de chaînes entre 4 et 6 atomes de carbone. D'autre part, il a été observé sur des modèles de membranes lipidiques que la base sphingoïde des oméga-O-acylcéramides, avec des chaînes de carbone ultra-longues (environ 32), affecte de manière significative l'architecture et la perméabilité de la membrane⁸⁵.

3. Rôles des lipides du SC

L'importance de la composition des lipides épidermiques dans des pathologies cutanées telles que le psoriasis ou la dermatite atopique a été mise en avant⁸⁶. L'activité antibactérienne de plusieurs sous-classes de lipides a également été observée^{87,88}, notamment des bases sphingoïdes à la surface de la peau⁸⁹.

Les céramides, précurseurs de tous les sphingolipides, représentent la classe lipidique du SC possédant un rôle majeur dans la formation d'une barrière cutanée efficace. En effet, une diminution du taux de céramides au niveau du SC, pouvant être observée dans diverses pathologies cutanées, entraîne une augmentation de la perte insensible en eau, reflétant une altération de sa fonction de barrière protectrice^{75,90}. Dans le cas de la dermatite atopique par exemple, une diminution de la sous-classe de céramides [EOS] a été mise en évidence, confirmant l'importance des céramides dans le maintien d'une fonction barrière optimale^{11,68,86,91}.

Hormis les situations pathologiques, de nombreux facteurs peuvent faire varier la composition lipidique du SC. Plusieurs études ont montré des variations selon le site anatomique², selon l'âge⁹²⁻⁹⁴, la densité des glandes sébacées⁹⁵, le genre⁹⁶, la variation saisonnière⁹⁷ ou encore l'exposition aux UV⁹². L'étude du maintien d'une composition permettant d'assurer une fonction barrière efficace apparaît comme étant déterminante dans les situations physiologiques et pathologiques impactant le SC et la barrière cutanée.

IV. Physiologie du vieillissement cutané

Avec l'augmentation constante de l'espérance de vie et de la vie active dans les pays développés, la recherche sur les pathologies liées à l'âge suscite un intérêt croissant. En effet, en France, l'âge moyen des femmes est de 42,8 ans, avec une espérance de vie de 85,6 ans (Insee, 2019). Les manifestations cliniques observées dans le vieillissement cutané tel que les rides sont liées à des phénomènes moléculaires complexes sous-jacents, intervenant dans les différentes couches de la peau. Les observations dépendent cependant des méthodes utilisées, des sites corporels et de l'âge étudiés⁹³. Deux phénomènes principaux sont connus pour entraîner une altération de la structure et de la fonction de la peau. Le vieillissement intrinsèque ou chronologique, et le vieillissement extrinsèque ou photo-vieillissement provoqué par l'exposition chronique aux agressions extérieures telles que les irradiations UV et la pollution⁹⁸. Ces deux types de vieillissement entraînent une altération des fonctions physiologiques cutanées au niveau épidermique⁹⁹ et dermique^{98,100,101} et provoquent des changements pouvant être caractérisés aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire^{100,102-105}.

Les processus impliqués dans la formation des rides impliquent toutes les couches de la peau, et sont depuis longtemps étudiés¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Nous nous sommes intéressés aux effets du vieillissement sur l'épiderme et plus particulièrement sur sa partie la plus externe : le *Stratum Corneum*, au niveau du visage.

1. Vieillesse intrinsèque vs vieillissement extrinsèque

Alors que le vieillissement intrinsèque ou chronologique correspond à des modifications inévitables liées à l'âge, le vieillissement extrinsèque ou photo-vieillissement est lui, lié à différents facteurs environnementaux.

Le terme « photovieillessement » a été utilisé pour la première fois en 1986. Il décrit particulièrement les effets d'une exposition chronique aux rayons UV sur la peau¹⁰⁹. Les irradiations UV provoquent, au niveau de l'épiderme, une peroxydation lipidique et des

dommages au niveau de l'ADN. Les effets à long terme de la lumière du soleil sur la peau sont profonds et on estime qu'ils représentent jusqu'à 90% du vieillissement cutané visible¹¹⁰, particulièrement chez les personnes sans protection naturelle associée à des taux plus élevés de mélanine dans la peau¹¹¹. L'exposition aux rayons UV peut entraîner une modification de la texture de la peau, l'apparition précoce de taches pigmentaires et de ridules¹¹². Le visage étant particulièrement photo-exposé, le vieillissement extrinsèque possède un impact plus important dans les altérations cutanées observées avec l'âge⁹⁸.

La combinaison du vieillissement intrinsèque et du photo-vieillissement aggrave l'altération de la fonction barrière cutanée¹¹³.

2. Modifications de la fonction barrière cutanée

Comme évoqué précédemment, la fonction barrière cutanée est très complexe et fait intervenir de nombreux facteurs principalement situés au niveau de l'épiderme et notamment du SC, comme la composition et l'organisation du ciment lipidique intercellulaire. De nombreuses variations ont été mises en avant au niveau de l'épiderme au cours du vieillissement cutané et seront évoquées dans ce paragraphe.

a. Variations de l'épaisseur de l'épiderme et du SC

Concernant l'épaisseur de l'épiderme et du SC, couches essentielles dans la fonction barrière, les résultats divergent. Certaines études ont montré que l'épaisseur totale de l'épiderme reste constante avec l'âge¹¹⁴, alors que d'autres ont montré un amincissement de l'épiderme au fil des ans grâce à l'imagerie confocale^{107,115,116}. L'épaisseur de l'épiderme aurait en effet tendance à diminuer progressivement à un rythme qui s'accélère avec l'âge^{100,101,117}, l'épiderme non exposé diminuant d'environ 10 à 50% entre 30 et 80 ans¹¹⁸. Cette diminution de l'épaisseur pourrait être due à une diminution importante du taux de renouvellement cellulaire épidermique^{119,120}. Ce phénomène compromet le rôle protecteur de la peau, mais contribue également à l'apparition de troubles cutanés, notamment une sécheresse excessive, ainsi qu'à une prédisposition accrue à la formation de rides¹²¹.

La réponse à une exposition chronique aux UV dépend du type de peau de l'individu. Un épaissement irrégulier de l'épiderme a été observé avec le photo-vieillessement⁹⁸.

Des variations sont également observées dans les analyses de l'épaisseur du SC. Alors que certaines études histologiques ont permis d'observer que l'épaisseur du SC ne change pas avec l'âge^{105,118} d'autres ont constaté une légère augmentation⁹³. Cette augmentation a également été observée dans le cas du photo-vieillessement, sur site cutané exposé⁹³. Cette augmentation de l'épaisseur du SC pourrait provenir de la diminution du renouvellement cellulaire chez les personnes âgées. Au sein d'une peau jeune, le SC entier est remplacé en 15 à 20 jours¹²² alors que ce phénomène peut prendre de 40 à 60 jours au sein d'une peau âgée^{123,124}. Une desquamation plus lente ainsi qu'une augmentation de la taille des cornéocytes au niveau du SC ont été observées chez les sujets âgés, par rapport aux sujets jeunes^{122,125}.

b. Intégrité de la barrière cutanée

Lors du vieillissement cutané, l'intégrité de la fonction barrière semble modifiée. Si certaines études n'ont montré aucun changement au niveau de la perte insensible en eau (PIE)¹²⁶⁻¹²⁸, d'autres montrent une légère amélioration de la fonction barrière avec une diminution de la PIE^{93,122,129}.

c. Evolution du taux de sébum et de la composition des LCS

Plusieurs auteurs ont montré que la production de sébum sur le visage diminue avec l'âge^{52,130,131}. La diminution observée pourrait provenir de modifications hormonales. Des études ont montré que les variations du taux d'hormones sexuelles, comme la testostérone et certains de ses métabolites, influencent la production de sébum^{19,132,133} et diminuent la différenciation sébacée après la ménopause^{134,135}.

Malgré l'absence de différences significatives dans la quantité de LCS en fonction de l'âge¹³⁶, leur composition semble être modifiée. Hayashi *et al.* ont montré une diminution du taux de

squalène et d'acides gras libres au sein des LCS chez les sujets âgés¹³⁷. Une diminution du taux d'esters de cires a également été observé¹³⁸.

Les LCS, particulièrement le squalène, représentent une cible importante des rayonnements UV. L'irradiation du squalène avec les UVB et les UVA conduit à la formation d'hydroperoxyde de squalène, entraînant un stress oxydatif^{30,139,140}. Cependant, les taux de squalène monohydroperoxyde (SQOOH) semblent similaires chez les sujets jeunes et âgés¹³⁷.

Certaines études montrent que le pH de la surface de la peau, en partie régulé par la composition des LCS⁴³, est relativement constant de l'enfance à environ 70 ans¹⁴¹. En revanche, Wilhelm et al. ont montré que le pH de la peau du visage est plus alcalin chez les sujets âgés¹²⁸.

d. Evolution de la composition et de l'organisation des lipides du SC

Bien que certaines études indiquent peu ou pas de relation entre l'âge et la teneur en lipides^{142,143}, de nombreux auteurs admettent que la teneur totale en lipides diminue dans le SC avec l'âge d'environ 30%^{93,144}. Cette diminution pourrait refléter un métabolisme plus lent des kératinocytes dans la peau âgée, qui se traduit par une diminution de la capacité de biosynthèse^{96,145}.

Concernant la composition lipidique, les résultats diffèrent également. Alors que certaines études ne montrent pas de différences en fonction de l'âge dans les principales classes lipidiques (cholestérol, AG, céramides)¹⁴², de plus en plus d'études mettent en avant des modifications au niveau de la composition lipidique des LCS et des lipides du SC.

Des modifications ont notamment été observées au niveau des céramides, avec une diminution de leur teneur de 30% au niveau du visage⁹⁶. Denda *et al.* ont observé des modifications au sein des sous-classes de céramides, en fonction de différents âges¹⁴⁶. Chez les femmes âgées de plus de 60 ans, une diminution de la proportion de la sous-classe de

céramides [NS], et une augmentation de la sous-classe des céramides [NP] ont été observées¹⁴⁶. Cependant, ces études ont été réalisées avant la mise en évidence des classes estérifiées et de leur importance dans la fonction barrière.

Les effets du vieillissement cutané sur les lipides du SC ne se limitent pas aux céramides. Une diminution du cholestérol sur le visage a été observé, bien que son pourcentage semble être constant tout au long de la vie^{96,93,147}, ainsi qu'une diminution des taux d'acides gras^{96,145}.

Organisation lipidique

Comme vu précédemment, l'organisation lipidique joue un rôle clé dans la fonction barrière^{148,149}. Des études préalables réalisées au sein de notre équipe ont montré que le vieillissement conduit à un relâchement de l'ordre organisationnel et à une diminution de la structure intermoléculaire ordonnée¹⁵⁰. Ils ont également observé que le vieillissement entraîne une diminution des structures de conformation trans / gauche dans la chaîne alkyle des lipides, indiquant une altération de l'organisation¹⁵⁰. Une diminution de la compacité lipidique sur le site du bras exposé par rapport au site du bras protégé avec le vieillissement a également été rapportée⁹³.

e. Evolution de la fonction mécanique

En plus de la barrière de protection chimique, la peau offre une protection mécanique contre les facteurs de stress physiques. Avec le vieillissement, la dégradation du réseau de collagène et de fibres élastiques induit une perte d'élasticité et une augmentation de la fatigabilité de la peau^{108,151,152}. Même si le comportement mécanique repose principalement sur les fibres d'élastine et de collagène du derme, il a été démontré que le SC présente une contribution significative aux propriétés mécaniques globales de la peau^{151,152}. Dans le cas du photo-vieillessement, une réduction significative de l'élasticité de la couche cornée après une exposition répétée aux UVB a été observée¹⁵³.

f. Evolution du contenu en eau et des NMF au sein du SC

Concernant les effets du vieillissement sur la teneur en eau dans le SC, des rapports contradictoires existent dans la littérature, montrant soit que la teneur en eau ne change pas¹²⁸, soit qu'elle diminue légèrement⁹³. Egawa & Tagami ont montré que la teneur en eau à une profondeur de 10-30 μm dans l'épiderme de l'avant-bras a tendance à être plus faible chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes. En revanche ils n'ont observé aucune différence dans le SC au niveau de la joue¹⁵⁴. Le vieillissement intrinsèque ne semble cependant pas modifier la structure de l'eau de manière significative¹⁵⁵, la distribution des trois états de l'eau en fonction de la mobilité moléculaire est indépendante de l'âge¹⁵⁶.

Dans le cas du photovieillissement, Gniadecka *et al.*, ont observé des teneurs en eau accrues au niveau du SC par spectroscopie Raman¹⁵⁷.

Alors que le vieillissement cutané s'accompagne d'une diminution de la production de facteurs naturels d'hydratation (NMF)¹⁵⁸, une quantité plus importante de NMF totaux a été observée chez les sujets âgés au niveau de la joue et de l'avant-bras^{122,159}. Cette augmentation de la teneur totale en NMF pourrait provenir d'un taux de renouvellement du SC plus lent dans la peau âgée^{122,159}. Parallèlement à cette augmentation de la teneur totale, des modifications dans la composition des NMF ont également été mises en avant. La teneur en urée, composant de la sueur contribuant à l'hydratation du SC est significativement diminuée avec l'âge^{154,160}. Une diminution de la teneur en lactate a également été observée chez les femmes âgées¹⁶⁰, ainsi qu'une diminution de la teneur en acide hyaluronique¹⁶¹.

g. Autres modifications biochimiques au sein de l'épiderme

Le vieillissement cutané entraîne également une diminution de l'efficacité de l'activité antioxydante¹⁶². Cette modification est due à la diminution de molécules antioxydantes et d'enzymes dans l'épiderme des peaux âgées, telles que l'acide ascorbique, l' α -tocophérol (vitamine E), le cuivre, le zinc, la superoxyde dismutase, la catalase ou encore la glutathion peroxydase^{163,164}.

Avec le vieillissement cutané, les niveaux de précurseur épidermique de la vitamine D3 diminuent, contribuant à une diminution de la production de vitamine D3 chez les sujets âgées¹⁶⁵. La vitamine D3 étant formée suite à l'irradiation UV de son précurseur épidermique, une exposition régulière au soleil permettrait d'éviter une carence¹⁶⁶.

Le photo-vieillessement entraîne également une destruction de la vitamine A, ainsi qu'une augmentation des niveaux de protéines modifiées par oxydation^{167,168}. De plus, les rayons UV stimulent et activent diverses cellules pouvant produire et libérer des cytokines jouant un rôle important dans le processus de photovieillessement¹⁶⁹.

3. Principales modifications du derme et de la jonction dermo-épidermique

L'objectif principal de cette thèse concerne la caractérisation de la barrière cutanée. Les modifications ayant lieu au niveau du derme et l'hypoderme, possédant un rôle moindre dans cette fonction, n'ont pas été étudiées. Cependant, de nombreuses études portent sur leur évolution et leur caractérisation, notamment lors du vieillissement cutané.

Dans les modifications principales observées, l'altération des couches épidermique et dermique au cours du vieillissement cutané induit un aplatissement de la jonction dermo-épidermique (JDE)^{102,170}, réduisant la surface d'échange d'eau et de nutriments du derme vers l'épiderme.

Le derme subit également d'importants changements avec l'âge. Il s'amincit et se fragilise, la production de collagène diminue progressivement au fil des ans tandis que les fibres de collagène restantes subissent une modification de leur structure et de leur organisation¹⁷¹. La fragmentation progressive de la matrice collagénique cutanée avec une désorganisation et des faisceaux de collagène épais et inhomogènes ont une conséquence importante : la diminution de la résistance globale de la peau, favorisant la formation des rides¹⁷².

V. Physiopathologie de l'acné

1. Généralités

L'acné vulgaire (acné) est une maladie cutanée inflammatoire chronique multifactorielle. Elle implique une interaction de différents facteurs que sont l'hyperséborrhée, l'hyperkératinisation du follicule pilo-sébacé^{173,174}, ainsi qu'une modification du microbiome cutané et de ses interactions avec le système immunitaire inné¹⁷⁵. Ces facteurs entraînent des modifications au niveau du film hydrolipidique avec une augmentation de la production et de la composition du sébum¹⁷⁶, ainsi qu'au niveau du *Stratum Corneum* avec l'altération de la barrière cutanée¹⁷⁷. Cependant, la séquence des évènements et les relations existantes entre les différents facteurs restent incertaines. De nombreux autres facteurs influent sur la gravité, l'incidence et la persistance de l'acné, tels que les facteurs environnementaux, les hormones, les antécédents familiaux, le stress^{174,178} ou encore le régime alimentaire¹⁷⁹⁻¹⁸¹. De récentes études se sont intéressées à l'impact de l'exposome dans l'acné. En effet, des facteurs internes et externes comme le grignotage, la consommation de produits laitiers, de sucreries, d'alcool, ainsi que l'exposition à la pollution, au stress, à certains facteurs mécaniques et à la chaleur ou au soleil, ont été significativement plus fréquemment rapportés chez les sujets acnéiques par rapport aux sujets sains^{182,183}. Un lien entre le microbiome intestinal et le microbiome cutané a également été mis en avant dans l'acné^{184,185}.

Ayant une prévalence de 80% dans la majorité des pays du monde, l'acné constitue un trouble cutané très répandu, chez les adolescents mais également chez les adultes¹⁸⁶. En effet, l'acné présent chez les adultes est en augmentation et touche environ 40% de cette population. Cependant, des données épidémiologiques montrent qu'en moyenne un sujet acnéique sur deux ne consulte pas et n'utilise pas de traitement adapté¹⁸⁷. Il apparaît donc comme intérêt majeur de mieux comprendre les mécanismes associés à cette pathologie cutanée, et ainsi pouvoir par la suite répondre à un réel besoin identifié chez les personnes présentant des peaux à tendance acnéique, à l'aide de soins adaptés.

2. Hyperséborrhée et modification de la composition du sébum

L'acné est depuis longtemps associée aux lipides¹⁸⁸ et se caractérise par une surproduction de sébum dans les glandes sébacées conduisant à la formation de comédons^{189,190}. Les changements observés dans la composition des LCS semble pouvoir déclencher une réaction inflammatoire précoce dans le développement des lésions acnéiques¹⁹¹. En effet, une augmentation de la sécrétion de sébum ainsi que des changements au niveau de ses composants sont corrélés avec l'apparition de l'acné^{192,193}.

a. Augmentation du squalène et peroxydation

Le squalène est un lipide spécifique produit par les glandes sébacées. L'augmentation importante de la quantité de squalène pourrait en faire un marqueur lipidique majeur associé à l'acné^{28,193}. Le squalène possède une activité antioxydante importante. Il peut en effet inhiber l'amplification en cascade de la peroxydation lipidique et ainsi participer à la protection contre les dommages causés par l'irradiation UV¹⁹⁴.

Sous l'action des rayons UV, le squalène, possédant 6 doubles liaisons, se transforme facilement en peroxyde de squalène, qui lui présente une activité comédogène sur modèle animal. En effet, plus le squalène est peroxydé, plus la taille des comédons semble importante¹⁹⁵. Un autre produit de la peroxydation du squalène, le squalène monohydroperoxyde (SQOOH) possède une action comédogène¹⁹⁶. Récemment, six isomères spécifiques du SQOOH ont été caractérisés¹⁹⁷, une analyse plus approfondie du profil lipidique des LCS pourrait apporter des informations complémentaires sur les altérations moléculaires de l'acné. La formation de peroxydes de squalène amplifierait le développement de l'inflammation cutanée¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

b. Modification des AGL et des glycérides

Dans la peau acnéique, une augmentation des AGL dans les LCS a été observée^{28,201}, avec une modification du ratio acides gras insaturés / acides gras saturés. En effet, il existe une augmentation de la part des acides gras insaturés, et une diminution des AGL saturés^{193,202}.

Cette augmentation des AGL insaturés est associée à la gravité des manifestations cliniques de l'acné et pourrait jouer un rôle majeur dans la sébogenèse, dans l'inflammation du follicule pilo-sébacé et dans la réponse immunitaire innée^{189,203}.

L'acide sapiénique (C16:1Δ6) constitue le principal acide gras retrouvé dans le sébum et n'existe que chez l'homme. Chez un sujet atteint d'acné, sa production augmente de 49% alors que la part des autres acides gras diminue²⁸. Cet acide gras semble être impliqué dans la pathogenèse de l'acné, tout en possédant une activité antibactérienne²⁰⁴.

Une diminution significative de l'acide linoléique (C18:2) a également été observée^{189,193,201}. Ses métabolites possèdent également un effet anti-inflammatoire¹⁹³. Downing *et al.* ont observé que la modification de la composition des LCS pouvait entraîner une modification au niveau du SC. En effet, une diminution en acide linoléique pourrait affecter la synthèse des sphingolipides, entraînant une kératose excessive au niveau des follicules pileux dans l'acné²⁰⁵.

Cunliffe *et al.* ont quant à eux émis l'hypothèse que la diminution d'acide linoléique et de ses métabolites pourrait entraîner une augmentation de la perte d'eau et ainsi une altération de la fonction barrière cutanée, augmentant la perméabilité de la peau à différents facteurs inflammatoires²⁰⁶. En effet, l'acide linoléique peut se lier aux molécules d'eau contenues dans la peau, par liaison hydrogène, et ainsi réduire la perte d'eau dans l'épiderme.

Alors que certains micro-organismes sont sensibles aux acides gras tels que des staphylocoques, *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) n'est pas connu pour y être sensible²⁰⁷.

Chez les sujets jeunes atteints d'acné, les diglycérides sont particulièrement abondants dans les LCS²⁰¹. Une augmentation significative de la quantité de TG, DG, AGL et céramides a également été observée entre des patients jeunes atteints d'acné légère et modérée²⁰⁸.

Une augmentation des triglycérides a également été mise en évidence, ainsi que l'augmentation de leur hydrolyse en AGL par les micro-organismes^{28,48,209}.

c. Modifications des autres classes lipidiques cutanées

D'autres modifications lipidiques ont été mises en avant dans l'acné chez l'adulte, avec notamment une augmentation significative de phosphatidylsérine, une augmentation des cires, du cholestérol ou encore une diminution de la longueur moyenne de la chaîne des céramides^{193,202}.

L'augmentation des cires dans l'acné pourrait être liée à l'augmentation des AGL¹⁹³. En effet, Les acides gras libres peuvent être facilement convertis en cires après catalyse par certaines enzymes²¹⁰.

La longueur de la chaîne des céramides est en relation directe avec la fonction de barrière cutanée. En effet, la perméabilité cutanée est augmentée avec des céramides à chaînes courtes. La diminution de la longueur de la chaîne des céramides observée dans l'acné induit donc un effet néfaste sur la fonction barrière cutanée^{211,212}.

d. Modification des sébocytes

Outre les changements observés dans la composition lipidique du sébum, de nombreux facteurs agissent sur les sébocytes et en modifiant ainsi le fonctionnement physiologique.

Parmi ces facteurs peuvent être retrouvés :

- Des hormones : testostérone, oestrogènes et progestérone¹⁹² ;
- Des facteurs de croissance : IGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1) et GH (Growth Hormone) ;
- Des neuropeptides : CRH (hormone corticotrope), bêta-endorphine, hormone mélanotrope, endocannabinoïdes, substance P, acétylcholine, agonistes du récepteur TRPV1 ;
- Des récepteurs nucléaires : PPAR & LXR
- La DPH (diphénhydramine)²¹³, les rétinoïdes, la vitamine D (calcitriol)²¹⁴, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), et le neuropeptide Y⁴⁹.

A travers différents mécanismes d'action, tous ces facteurs sont connus pour être impliqués,

en agissant positivement ou négativement, dans la modification de la production du sébum et/ou dans le processus d'inflammation⁴⁹.

3. Hyperkératinisation du follicule pilo-sébacé

Le second facteur impliqué dans la pathologie de l'acné est une anomalie de la kératinisation du follicule pilo-sébacé se traduisant par une augmentation de la prolifération des kératinocytes et une augmentation de leur adhésion. Le canal excréteur du follicule pilo-sébacé se retrouve alors obstrué en raison de ces anomalies, ce qui empêche l'évacuation normale du sébum, provoque une rétention et une dilatation au niveau du follicule pilo-sébacé, conduisant à la formation d'un micro-comédon puis d'un comédon²¹⁵.

4. Dysbiose du microbiome cutané

A la surface de la peau, la communauté microbienne est majoritairement constituée de bactéries appartenant aux trois principaux genres : *Corynebacteria*, *Propionibacteria* et *Staphylococci*²¹⁶. L'interaction entre les membres de ce microbiote cutané est essentielle pour le maintien d'une peau saine. Alors que la bactérie commensale *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), prédominante au sein des glandes sébacées, est essentielle dans la régulation de l'homéostasie cutanée²¹⁷ et empêche la colonisation par d'autres agents pathogènes nocifs^{218,219}, elle peut également agir comme un agent pathogène opportuniste dans l'acné²¹⁹⁻²²¹.

Le microbiome cutané fait référence aux micro-organismes (bactéries, virus et champignons) ainsi qu'à leur environnement. Il est divisé en germes cutanés commensaux « normaux » qui vivent en homéostasie avec l'hôte et forment le microbiome résident ; et en germes pathogènes de l'environnement, qui vivent temporairement sur la peau et forment le microbiome transitoire²²². Dans l'acné, le microbiome résident comprend *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) et *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)¹⁷⁵, tandis que le microbiome transitoire comprend *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)²²³. Un déséquilibre microbien ou dysbiose, par rapport à la distribution normale dans les tissus sains, a été suggéré comme

étant impliqué dans la physiopathologie de l'acné inflammatoire²²⁴. Les investigations génomiques et métagénomiques ont récemment conduit à changer la dénomination de *Propionibacterium acnes* en *Cutibacterium acnes*²²⁵ en tenant compte de ses spécificités pour coloniser la peau, et à commencer la caractérisation de ses différents phylotypes.

a. Perte de diversité dans les phylotypes de *Cutibacterium acnes*

Présent à un faible niveau à la surface de la peau, *C. acnes* constitue l'espèce bactérienne résidente dominante dans les follicules sébacés, particulièrement dans les zones riches en sébum. Cependant, contrairement à ce qui a longtemps été évoqué, l'acné ne serait pas uniquement associée à une prolifération excessive de *C. acnes*²²⁶⁻²²⁸. Des études de métagénomique ont permis de montrer que l'abondance relative de *C. acnes* est similaire chez les patients atteints d'acné et chez ceux ayant la peau saine^{221,229}. Des taux légèrement plus élevés chez les sujets sains ont également été rapportés²³⁰. En revanche, une perte de diversité microbienne et une perte d'équilibre entre les phylotypes de *C. acnes* semblent jouer un rôle dans des maladies inflammatoires chroniques cutanées^{219,220} et notamment dans le déclenchement de l'acné²²¹.

Plusieurs études très récentes ont montré que la sévérité de l'acné est associée à une perte de diversité des souches de *C. acnes* par rapport à celle des individus ayant la peau saine. Cette perte de diversité a été identifiée sur le visage des patients atteints d'acné légère à modérée, ainsi que sur le dos de ceux souffrant d'acné sévère²³¹. L'acné pourrait être déclenchée par un sous ensemble de souches de *C. acnes*, y compris le phylotype IA1, prédominant dans l'acné et probablement renforcé par un environnement hyperséborrhéique¹⁷⁵. En revanche, la perte de diversité phylotypique ne peut expliquer les différences observées entre l'acné chez l'adolescent et l'adulte, l'acné chez la femme adulte n'étant pas associée à un type spécifique de *C. acnes*²³². La résistance à *C. acnes* est similaire chez les femmes adultes et les adolescents, suggérant que les différences d'acné entre ces 2 groupes sont plus probablement liées à des facteurs non microbiens tels que les changements hormonaux, la stimulation de l'immunité innée ou encore des facteurs

environnementaux²³². En ce qui concerne la sévérité de l'acné, aucune différence significative dans la distribution des souches d'acné n'a été trouvée entre les patients atteints d'acné légère et sévère²³³.

La perte de diversité phylotypique de *C. acnes* agit comme un déclencheur de l'activation immunitaire innée et de l'inflammation cutanée dans l'acné. En effet, il a été démontré que l'incubation d'un explant cutané avec le phylotype IA1 seul conduit à une régulation à la hausse des marqueurs immunitaires innés (interleukines IL-6, IL-8, IL-10, IL-17), par rapport à l'incubation avec la combinaison de phylotypes IA1 + II + III²³⁴. Inversement, la restauration de la diversité microbienne a supprimé l'inflammation via une régulation négative de l'immunité innée²³⁴.

b. Virulence des différentes souches de *C. acnes* dans l'acné

Une analyse comparative du génome a montré que les souches liées à l'acné portent des gènes de virulence supplémentaires par rapport aux souches du même phylotype fonctionnant comme commensaux pour la santé de la peau²³⁵. Les souches liées à l'acné produisent des taux significativement plus élevés de porphyrines, métabolites pro-inflammatoires qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et induisent une inflammation des kératinocytes²³⁶. Les types IA et IB de *C. acnes* induisent des niveaux plus élevés de production du peptide antimicrobien humain (AMP), la β -défensine 2 (hBD2), à partir de sébocytes en culture, et présentent des niveaux plus élevés d'activité lipase qu'un isolat de type II²³⁷.

c. Autres micro-organismes impliqués dans l'acné

Comme évoqué précédemment, *S. epidermidis* et *C. acnes* interagissent²³⁸ et sont essentiels pour la régulation de l'homéostasie cutanée²³⁹. *S. epidermidis* peut inhiber la croissance de *C. acnes*²⁴⁰ et l'inflammation cutanée induite par *C. acnes*²⁴¹. Il contrôle la prolifération de *C. acnes* en favorisant la fermentation du glycérol produit naturellement par la peau et en libérant de l'acide succinique, un produit de fermentation des acides gras²⁴². À l'inverse, *C.*

acnes, résidant dans les follicules pilo-sébacés, inhibe le développement de *S. epidermidis* en maintenant le pH acide du follicule pilo-sébacé, en hydrolysant les triglycérides de sébum et en sécrétant de l'acide propionique^{222,240}. L'augmentation d'acides gras libres détectés dans les lésions d'acné semble alors provenir de l'action de la lipase sur les triglycérides sébacés²⁴³. Enfin, *Malassezia*, le champignon le plus abondant de la peau, pourrait être impliqué dans l'acné résistante. Sa lipase est 100 fois plus active que celle de *C. acnes*, elle peut attirer les neutrophiles et favoriser la libération de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et les kératinocytes. Cependant, son rôle exact dans la physiopathologie de l'acné reste à explorer²²³.

d. Interactions entre les micro-organismes et les mécanismes cellulaires cutanés

Les bactéries résidentes et transitoires interagissent également avec les molécules de signalisation cutanées. La substance P est un neuropeptide cutané majeur qui est modulé par la douleur, le stress et l'infection. Elle est impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies cutanées aux origines multifactorielles. Certains de ses effets sont médiés par des interactions avec la microflore cutanée²⁴⁴. La substance P peut augmenter la virulence des staphylocoques en induisant la sécrétion d'entérotoxine C2 par *S. aureus* et la formation de biofilm par *S. epidermidis* ; elle favorise également leur adhésion aux kératinocytes²⁴⁴. En modulant de manière différentielle la survie des mélanocytes, *C. acnes* et *S. epidermidis* jouent potentiellement un rôle dans la pigmentation post-inflammatoire des lésions acnéiques²⁴⁵.

5. Signes cliniques et grades de classification

Afin de parvenir au mieux à étudier et caractériser l'acné, une classification a été réalisée en fonction du type (Figure 12) et de l'importance des lésions observées (Tableau 2)²⁴⁶. Cette classification « GEA scale » a été utilisée pour la réalisation des travaux présentés dans ce manuscrit.

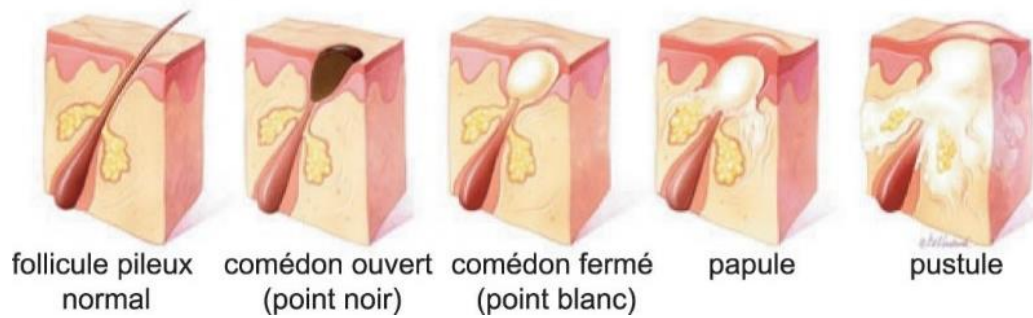


Figure 12. Les différents types de lésions acnéiques

Tableau 2. Classification GEA²⁴⁶

Grade		Modifications observées
0	Pas de lésion	Une pigmentation résiduelle et un érythème peuvent être présents
1	Pratiquement pas de lésion	Rares comédons ouverts ou fermés dispersés & rares papules
2	Légère	<i>Facilement identifiable</i> ; moins de la moitié du visage est atteinte. Quelques comédons ouverts ou fermés, et quelques papulo-pustules.
3	Moyenne	<i>Plus de la moitié de la surface du visage est atteinte.</i> <i>Nombreuses papulo-pustules.</i> Nombreux comédons ouverts ou fermés. Un nodule peut être présent
4	Sévère	<i>Tout le visage est atteint, couvert de nombreuses papulo-pustules, comédons ouverts ou fermés et rares nodules</i>
5	Très sévère	<i>Acné très inflammatoire recouvrant le visage avec des nodules</i>

VI. Méthodes d'analyse et de caractérisation de la peau

En raison de sa complexité, la compréhension des facteurs physiologiques et physiopathologiques de la peau nécessite une observation large, prenant en compte l'état moléculaire mais également les caractéristiques biométriques de la surface cutanée. Dans ce but, une importante mise en place a été effectuée afin d'utiliser une méthodologie analytique multiparamétrique adaptée et optimale comprenant l'étude complémentaire des marqueurs biométriques de la peau (contenu en eau, teneur en sébum, perte insensible en eau, paramètres mécaniques), la composition des LCS, la composition des lipides du SC superficiel et l'étude des marqueurs spectroscopiques Raman tels que l'organisation et la structure lipidique, le contenu en eau, l'épaisseur du SC. Une optimisation des traitements de données a également été réalisée pour chaque technique analytique afin de mettre en place, par la suite, un outil chimiométrique associant l'ensemble des résultats obtenus dans le but d'établir un « témoin analytique de la surface cutanée » dans différentes conditions physiologiques et pathologiques.

1. Caractérisation générale de la peau

Afin d'obtenir une caractérisation générale et rapide des propriétés cutanées, de nombreux outils existent et peuvent être utilisés. Parmi eux, des sondes apportant des résultats fiables, rapides et reproductibles ont été sélectionnées, leur principe ainsi que les paramètres étudiés sont décrits ci-dessous.

a. Evaluation des paramètres colorimétriques, de la brillance et du taux de porphyrine à la surface cutanée

Afin d'évaluer les paramètres colorimétriques, la brillance cutanée²⁴⁷ ainsi que le taux de porphyrine à la surface de la peau^{248,249}, le VISIA-CR (Canfield), appareil d'imagerie faciale, a été utilisé. Il permet l'acquisition d'images numériques standardisées de haute résolution du visage entier avec différentes modalités d'éclairage :

- Lumière standard, permettant d'avoir une photo de l'état général cutané (présence de lésions, etc.)

- Lumière polarisée croisée
- Lumière polarisée parallèle

Les photos obtenues en lumière polarisée croisée et polarisée parallèle permettent l'évaluation des paramètres colorimétriques (L^* (luminosité), a^* (composante chromatique rouge/vert), b^* (composante chromatique jaune/bleu), C^* (saturation) et h^* (angle de teinte)) et de la brillance de la peau.

Les paramètres ITA et IWA permettent d'obtenir des informations sur la pigmentation.

A l'aide des photos obtenues, la porphyrine a été analysée à l'aide d'un traitement d'image développé au sein des laboratoires Clarins, permettant la détection de :

- L'aire : nombre de pixels contenus dans les points associés à la porphyrine
- Le volume : somme des intensités des points associés à la porphyrine

b. Evaluation du contenu en eau

Les mesures de contenu en eau ont été réalisées avec le cornéomètre CM-825 (Courage & Khazaka, Cologne Allemagne).

Cet appareil est basé sur la mesure de la capacité électrique d'une portion de peau placée sous la sonde²⁵⁰. La sonde est composée d'une plaque en céramique recouverte d'un grand nombre de lignes d'or. Les lignes paires tout comme les lignes impaires sont liées entre elles pour former un condensateur. Une fine couche d'isolant vitrifié de faible constante diélectrique recouvre la sonde pour éviter tout passage de courant électrique. Un ressort assure une pression d'application constante : la mesure se déclenche pour une pression de l'ordre de 0,7-0,8 N. La surface de mesure est de l'ordre de 49 mm² et la profondeur de mesure est évaluée entre 60 et 100 μm . Cependant, la contribution d'une couche placée à cette profondeur ne dépasse pas le dixième que celle qu'elle aurait en surface. La mesure reflète donc principalement les modifications de la constante diélectrique de la couche cornée (< 15 μm). La valeur finale analysée est exprimée en unité arbitraire (**u.a.**).

c. Evaluation du taux de sébum

Le Sébumètre (Courage&Khazaka) est un appareil de mesure qui permet de déterminer à un instant donné le taux de sébum qu'un sujet possède à la surface de sa peau²⁵¹.

Une cellule analyse la transparence du film dépoli qui augmente quand sa surface est recouverte d'un film lipidique. La lumière transmise permet de quantifier le sébum contenu sur la zone mesurée. Un microprocesseur calcule les résultats, qui sont ensuite affichés sur l'écran en **µg /cm²** de peau.

d. Evaluation du pH-cutané

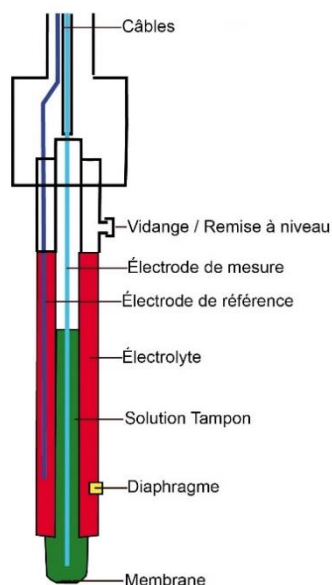
La mesure du pH permet d'obtenir une importante caractéristique d'une solution aqueuse : son acidité ou son alcalinité. Cette valeur est déterminée par la concentration en ions hydrogènes (protons H⁺) et en ions hydroxydes (anions OH⁻).

Une molécule d'eau se dissocie selon la formule suivante : **H₂O ⇌ H⁺ + OH⁻**

H⁺ : ion hydrogène chargé positivement, acide.

OH⁻ : ion hydroxyde chargé négativement, basique.

Le pH, obtenu selon la formule suivante : **pH = -log[H⁺]**, se situe sur une échelle de 0 (très acide) à 14 (très basique), 7 étant la valeur neutre.



Le pH-mètre cutané (Courage&Khazaka) permet d'obtenir une mesure de pH basée sur le principe de l'électrochimie, grâce à une électrode en verre²⁵² (Figure 13), permettant une meilleure reproductibilité de la différence de potentiel développée sur celle-ci.

Figure 13. Schéma de la sonde de pH-mètre cutané (Courage&Khazaka)

L'intérieur de l'électrode en verre est rempli d'une solution tampon (Argent / chlorure d'argent : Ag/AgCl), séparée de la solution à mesurer par une fine membrane en verre. Au contact de la solution, le tampon transporte le potentiel ionique de la solution du côté intérieur vers le côté extérieur de la membrane en verre. Cette électrode de référence est remplie d'électrolytes (KCl) et est équipée d'un diaphragme garantissant le transport des ions de la solution à mesurer vers le tampon, sans mélanger les deux substances.

Les sécrétions de l'épiderme constituant une phase aqueuse, la mesure du pH peut s'effectuer directement sur la peau.

e. Evaluation de la perte insensible en eau

La Perte Insensible en Eau trans-épidermique (PIE) correspond à la densité du flux d'eau à travers la barrière cutanée, ce qui permet d'évaluer la fonction barrière de la peau²⁵³. Une augmentation de la perte en eau indique une baisse de l'intégrité du *Stratum Corneum* donc une barrière cutanée endommagée.

Le principe du Tewameter (Courage&Khazaka) repose sur la mesure de la température et de l'humidité relative en deux points situés à des distances différentes de la surface de la peau. En effet, l'étude par évaporimétrie applique la loi de Fick qui définit la diffusion de l'eau à partir d'une surface selon la formule suivante :

$$1/S \, dm/dt = -D \, dp/dx$$

Où :

- S = surface en m²
- dm = différence de quantité d'eau en gramme
- dt = différence de temps en heures
- D = constante de diffusion
- dp = différence de pression de vapeur dans l'air ambiant en mm de mercure (mm Hg)
- dx = différence de distance de la surface au point de mesure en mètres

Ainsi le taux d'évaporation dm/dt est proportionnel au gradient de pression de vapeur d'eau dp/dx . En mesurant la pression de vapeur d'eau en deux points situés à des distances différentes de la peau, il est possible d'apprécier l'évaporation d'eau à la surface cutanée. Les valeurs mesurées sont exprimées en **g/h/m²**.

f. Evaluation des paramètres d'élasticité

Le Cutomètre mesure l'élasticité et les propriétés mécaniques de la surface de la peau en appliquant une pression négative (aspiration) qui déforme la peau^{254,255}. Le principe de la mesure est basé sur la méthode de succion. Une pression négative est créée dans l'appareil grâce à un compresseur d'air et à une chambre à vide. La peau est alors aspirée dans l'orifice de la sonde (2 ou 6 mm). Après un temps défini, la peau est relâchée à l'intérieur de la sonde.

La profondeur de pénétration est déterminée par un système de mesure optique sans contact. Ce système de mesure optique se compose de 2 cellules en regard l'une de l'autre : une source de lumière et un récepteur de lumière. L'intensité de la lumière varie en fonction de la profondeur de pénétration de la peau. La résistance de la peau face à la pression négative (fermeté) et sa capacité à retourner dans sa position d'origine (élasticité) sont affichées sous forme de courbes (profondeur de pénétration en mm/unité de temps) en temps réel pendant la mesure.

Le cycle de mesure peut se décomposer en 5 étapes :

- Paramétrage : choix de la pression à appliquer, du temps d'aspiration et de relaxation
- Initialisation : le compresseur crée la dépression voulue suivant la pression prédéfinie dans la chambre à vide. La sonde doit être posée sur la peau
- Aspiration : la mesure est lancée et le système applique la dépression de la chambre à vide à l'intérieur de la sonde pour aspirer la surface de la peau pendant le temps d'aspiration. Le système commence à enregistrer les mesures
- Relaxation : A la fin du temps d'aspiration, le système rétablit la pression ambiante à l'intérieur de la sonde ce qui stoppe l'aspiration. La peau est alors libérée de toutes

contraintes mécaniques et elle essaie de retrouver sa forme initiale. Le système stoppe l'enregistrement des mesures à la fin du temps de relaxation

- Mesures : les cellules optiques mesurent la déformation de la peau à l'intérieur de la sonde tout au long du cycle « aspiration - relaxation » : des lentilles se trouvent de part et d'autre de l'entrée de l'orifice de la sonde, dès que la peau est aspirée, elle masque une partie des lentilles et l'intensité de la lumière transmise diminue. Cette variation d'intensité est ensuite convertie en millimètre.

Cette technique permet de récupérer différents paramètres que l'on peut visualiser sur la courbe représentant la profondeur de pénétration en fonction du temps.

Paramètres étudiés :

- Paramètres R (Figure 14), les plus couramment rencontrés dans la littérature :

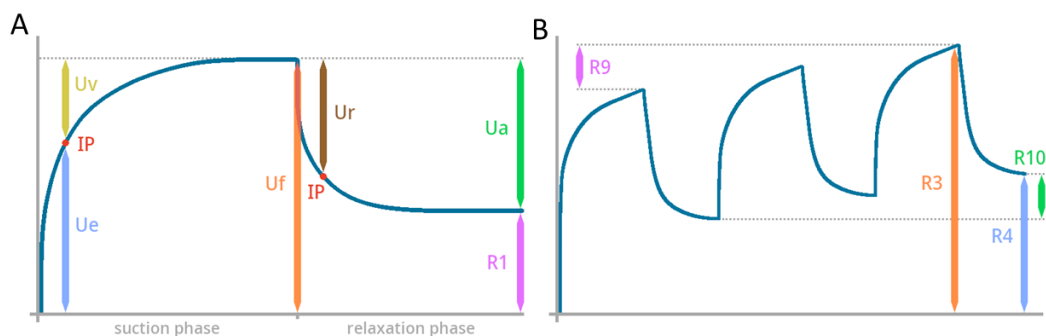


Figure 14. Paramètres R, étudiés avec le Cutomètre²⁵⁶. A, Paramètres obtenus après un cycle d'aspiration/relâchement. B, paramètres obtenus après une succession de cycles aspiration/relâchement.

- $R0 = Uf$: Amplitude maximale. Représente le comportement passif de la peau par rapport à la force appliquée (fermeté).
- $R1 = Uf - Ua$: Capacité de la peau à revenir à son état initial.
- $R2 = Ua/Uf$: Elasticité brute. Portion entre l'amplitude maximale Uf et la faculté de la peau à retourner dans sa position d'origine. Plus $R2$ tend vers 1, plus la peau est élastique.
- $R3$: Comparaison de la dernière amplitude maximale avec la première, lorsqu'il y a répétition du cycle « aspiration-relâchement ». L'effet de « fatigue » de la peau est visible lorsque l'amplitude augmente avec chaque nouvelle aspiration

- R4 : Comparaison du dernier point de mesure avec l'amplitude minimale de la première courbe. L'effet de fatigue est visible lorsque la capacité de déformation diminue avec chaque nouvelle aspiration
- R5 = U_r/U_e : Elasticité nette. Portion élastique de la région de succion contre la portion élastique de la région de relaxation. Plus R5 tend vers 1, plus la peau est élastique.
- R6 = U_v/U_e : Portion visco-élastique de la courbe. Plus la valeur est basse, plus l'élasticité est importante.
- R7 = U_r/U_f : Portion de la récupération élastique comparée à la courbe complète. Plus R7 tend vers 1, plus la peau est élastique.
- R8 = U_a de la première courbe : Retour maximal de la peau à la fin du temps de relaxation. Plus U_a est proche de U_f , plus la capacité de la peau à retourner dans son état initial est importante.
- R9 = R3-R0 : Représentation de l'effet de fatigue de la peau. Plus R9 est petit, moins l'effet de fatigue est important.
- Paramètres de surface (F) (Figure 15) :

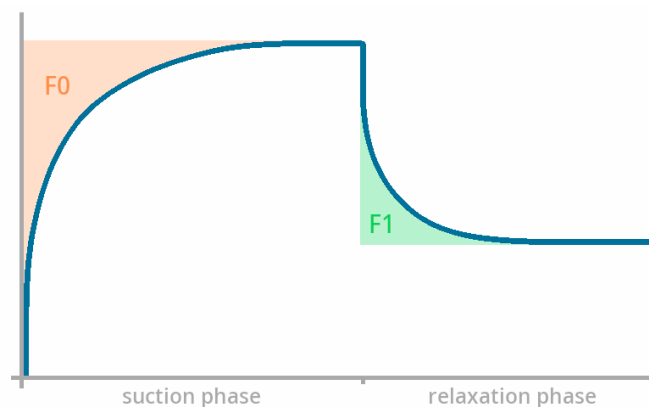


Figure 15. Paramètres de surface (F), étudiés avec le Cutomètre²⁵⁶.

- F0 = U_f / temps d'aspiration : Aire à l'intérieur du rectangle. Plus la valeur tend vers 0, plus la peau est élastique.
- F1 = U_f / temps de relaxation : Aire à l'intérieur du rectangle. Plus la valeur tend vers 0, plus la peau est élastique.

- Paramètres Q :

Un ensemble de paramètres a été ajouté²⁵⁷, montrant des corrélations intéressantes entre l'âge de la peau et les récupérations élastiques et visqueuses des courbes (Figure 16) :

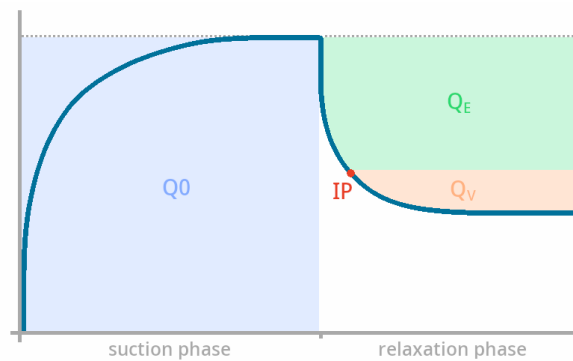


Figure 16. Paramètres Q, étudiés avec le Cutomètre²⁵⁶.

- Q0 : aire sous le point le plus haut de la courbe (R0). Aire maximale si le matériau est 100% élastique.
- Q1 = $(Q_E + Q_V)/Q_0$: Récupération visco-élastique
- Q2 = Q_E/Q_0 : récupération élastique
- Q3 = Q_V/Q_0 : récupération visqueuse

2. Caractérisation des lipides cutanés par chromatographie

Les lipides cutanés de surface (LCS) ainsi que les lipides du *Stratum Corneum* (SC) constituent tous deux des mélanges très complexes dans l'environnement biologique et sont généralement présents à de très faibles concentrations²⁵⁸. Ces mélanges contiennent de très nombreuses molécules (environ 250 lipides cutanés de surface et 1000 lipides du SC) 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 représente un réel défi analytique et nécessite l'utilisation de méthodes séparatives efficaces et adaptées.

Afin d'obtenir une analyse optimale, la technique séparative utilisée est basée sur les caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées. Les choix spécifiques effectués en fonction de l'analyse des LCS ou des lipides du SC seront détaillés par la suite.

La chromatographie gazeuse ainsi que la chromatographie liquide sont parmi les techniques séparatives couramment utilisées dans l'analyse des lipides cutanés^{22,23,64}.

La **chromatographie gazeuse** possède un pouvoir séparatif supérieur à la chromatographie liquide. En effet, la très grande longueur des colonnes chromatographiques (30m) permet d'obtenir une très bonne résolution. En revanche, elle nécessite que les molécules étudiées soient volatiles afin de pouvoir être éluées. Un ajustement, ou un gradient de température sur la colonne peut permettre de rendre les molécules plus volatiles au cours de l'analyse. La phase stationnaire étant peu polaire, la séparation des molécules est effectuée selon la longueur de la/des chaîne(s) hydrocarbonée(s).

Afin de rendre les molécules volatiles, une dérivation peut être effectuée, par exemple par ajout d'un groupement triméthylsilyl^{259,260}. Cette dérivation consiste en un remplacement de la molécule d'hydrogène sur le groupement hydroxyle par un groupement triméthylsilyl. Sur des molécules possédant plusieurs groupements hydroxyles, telles que les céramides dans les lipides du SC, le risque est important d'obtenir une dérivation incomplète à cause d'un encombrement stérique. D'autre part, l'ajout d'un groupement triméthylsilyl (TMS) augmentant significativement la masse moléculaire de la molécule, celle-ci serait trop élevée pour être détectée en chromatographie gazeuse. En effet, dans le cas d'un couplage avec la spectrométrie de masse comme évoqué par la suite, les différents analyseurs utilisés avec la chromatographie gazeuse tels que le quadripôle ou la trappe ionique ne permettent pas de détecter les ions présentant un rapport masse/charge (m/z) supérieur à 1000g/mol²⁶¹.

La **chromatographie liquide** possède un pouvoir séparatif moins résolutif, les colonnes chromatographiques ayant une longueur allant de 10 à 15cm. En revanche, elle permet l'analyse de molécules polaires, non volatiles et donc non analysables en

chromatographie gazeuse telles que les céramides. L'analyse peut être réalisée en phase normale afin d'obtenir une séparation des molécules en fonction de la structure de leur tête polaire, ou en phase inverse afin d'obtenir une séparation des molécules selon la longueur de leur(s) chaîne(s) hydrocarbonée(s).

Dans l'analyse des mélanges complexes tels que les LCS et les lipides du SC, le couplage des méthodes séparatives utilisées avec la **spectrométrie de masse** apparaît comme étant indispensable. En effet, la spectrométrie de masse permet d'intervenir comme une technique de caractérisation ou comme une deuxième dimension de séparation dans l'étude des lipides cutanés. Elle permet de déterminer les masses moléculaires des composés et de les caractériser après étude des fragmentations²⁶².

Cette technique est basée sur l'analyse des molécules sous forme d'ions, et nécessite donc une source d'ionisation capable de générer les ions puis un analyseur qui assure leur séparation en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), et enfin un détecteur.

Les techniques séparatives sont nombreuses et possèdent chacune leurs avantages et leurs inconvénients. De plus, les analyses effectuées après prélèvement et préparation des échantillons sont à l'interface entre la chimie et la biologie cutanée. Nos choix ont donc été réalisés afin de parvenir à une cohérence entre l'information chimique de départ et l'interprétation biologique finale.

a. Caractérisation des lipides cutanés de surface

i. *Prélèvements non invasifs des lipides cutanés de surface*

- Extraction par solvants

La technique est basée sur la solubilité des LCS dans les solvants organiques. Les LCS peuvent être collectés en frottant la surface de la peau avec un coton dégraissé, une éponge en polyuréthane, un écouvillon (les LCS sont ensuite extraits par un solvant organique adapté) ou en appuyant sur la surface cutanée avec une cupule en verre ou en plastique contenant un solvant²⁶³. L'éther de pétrole et l'hexane semblent perturber la physiologie

cutanée et donc la répétabilité des prélèvements. Le mélange méthanol/chloroforme produit des lésions épidermiques, il est alors trop agressif pour les études *in vivo*. L'acétone quant à lui, ne permet pas de solubiliser les cires. L'éther apparaît comme étant le solvant le plus adapté à l'étude de la composition des LCS. Cependant, la différence importante de solubilité de certains composés des LCS pouvant induire une extraction sélective, rend cette méthode difficile à utiliser afin d'obtenir des résultats pertinents. De plus, L'application de ces solvants pouvant modifier la physiologie et la structure du SC, cette méthode n'est plus recommandée pour évaluer la quantité de LCS²⁵¹.

- Extraction par absorption

Cette technique a comme principe l'absorption des LCS sur différents supports²⁶³ : papiers absorbants, films de polymères (Sebutape©, Sebufix), ou encore patches d'argile de bentonite, suivie d'une étape d'extraction des lipides à l'aide d'un solvant.

L'utilisation des papiers absorbants type papiers de cigarette représente la technique la plus aisée à mettre en place²⁶⁴. Cependant, la capacité d'absorption des papiers diffère, il est donc nécessaire de vérifier que le point de saturation ne sera pas atteint et que le papier absorbe les différents composants de manière égale à l'aide de sébum artificiel^{265,266}.

ii. *Analyse des LCS par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse*

Les lipides cutanés de surface sont étudiés depuis de nombreuses années, mais principalement après séparation des classes lipidiques. Leur micro-hétérogénéité structurale est couramment analysée en séparant les classes par chromatographie sur couche mince (CCM) dans un premier temps : acides gras libres²⁶⁷⁻²⁶⁹, cires avec ou sans clivage²⁶⁹⁻²⁷³ et triglycérides généralement après clivage^{269,274,275}. L'identification individuelle des composés et la quantification sont ensuite effectuées à l'aide de techniques additionnelles telles que la photodensitométrie^{26,276,277}, 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)²⁷³, la chromatographie gazeuse couplée à un détecteur

à ionisation de flamme (GC-FID)^{267,272,275,176} ou à un spectromètre de masse en impact électronique (GC-MS)^{267,269,271}. La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton a également été utilisée comme méthode d'analyse semi-quantitative des différentes classes lipidiques du sébum²⁷⁸.

Pour mener à bien l'identification de substances dans des matrices biologiques complexes, une technique physico-chimique alliant sensibilité et sélectivité est nécessaire^{279,280}.

Camera et *al.*²² 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 électrobuliseur (électrospray). Dans cette étude, les composés ont été séparés en utilisant une phase stationnaire de silice greffée n-octyle (type C8) de 2 µm de granulométrie. Les composés ont été ionisés dans une interface d'ionisation de type électrospray (ESI). Une mesure très précise de la masse a été réalisée à l'aide d'un analyseur à temps de vol (TOF-MS) et d'un analyseur triple quadripole (tandem MS/MS). L'identification des constituants des lipides cutanés de surface a été effectuée en intégrant les données obtenues avec les 2 systèmes.

Les molécules du sébum étant très volatiles, une analyse par chromatographie gazeuse semble optimale afin d'avoir une meilleure résolution. L'équipe Lip(Sys)² a développé une méthode de chromatographie gazeuse haute température couplée à la spectrométrie de masse (HT-GC/MS) permettant d'établir un profil global du mélange complexe que constituent les lipides cutanés de surface, tout en conservant l'intégrité structurale de tous les composés présents²³.

Plusieurs avantages ont été mis en avant dans cette méthode²³, justifiant notre choix de l'utiliser afin d'obtenir une évaluation qualitative et quantitative fine des lipides cutanés de surface dans différentes conditions physiologiques et pathologiques :

- 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% diphényl / 95% diméthylpolysiloxane]) et supportant des températures élevées.
- La haute température est utilisée afin de permettre la détermination de profils lipidiques totaux, et éluer les tri-glycérides²⁷⁹.
- L'injection à froid grâce au mode d'injection « on-column » permet d'éviter la dégradation thermique de composés fragiles tels que les esters de cholestérol.

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 17).

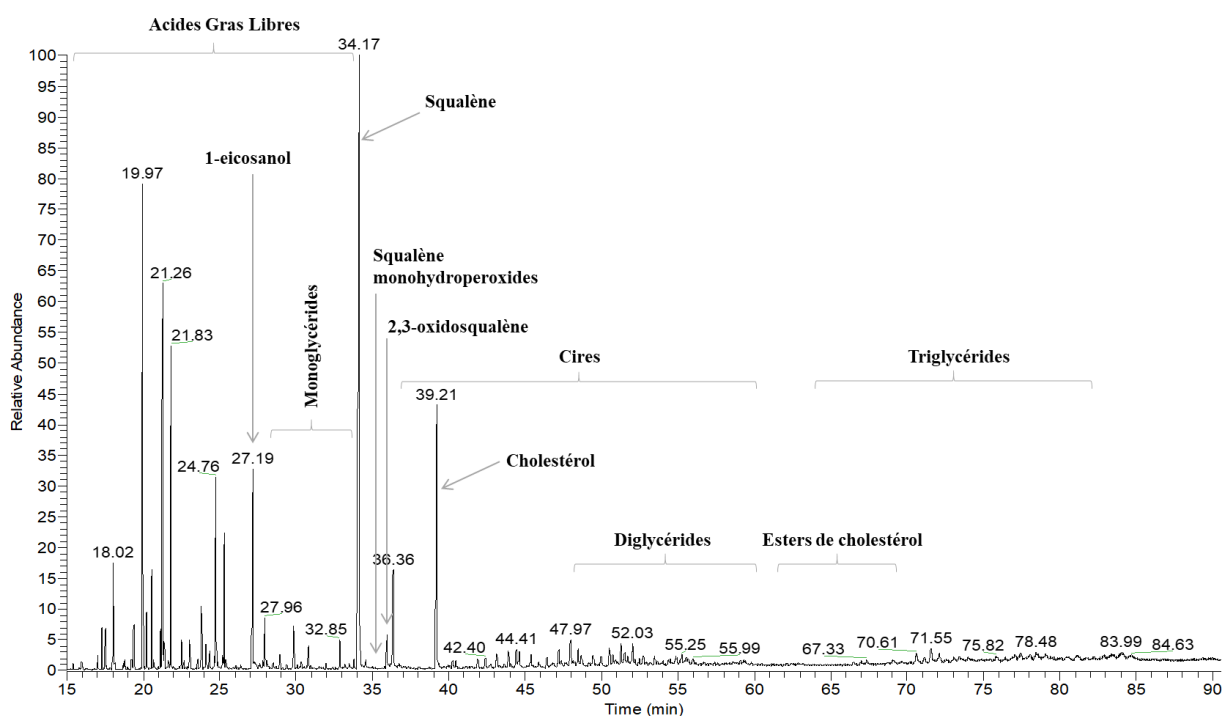


Figure 17. Profil chromatographique obtenu après analyse en HT-GC/MS, ionisation chimique, des lipides cutanés de surface²⁸¹

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

L'utilisation de phases stationnaires peu polaires nécessite la dérivation des éventuels groupes fonctionnels polaires. Pour cela, la triméthylsilylation (TMS)^{259,260} permet d'augmenter la volatilité des composés et ainsi faciliter leur élution à des temps de rétention inférieurs à ceux des dérivés acétylés.

Au niveau du spectromètre de masse, et plus particulièrement au niveau de la source d'ionisation, il est conseillé d'utiliser 2 types d'ionisation afin de cumuler leurs avantages dans l'identification des composés^{282,283} :

- L'ionisation par impact électronique (IE), ionisation dite forte, impliquant des énergies élevées et entraînant la formation d'un nombre important de fragments. Elle apporte des informations structurales.
- L'ionisation chimique (IC), ionisation dite douce, permettant d'accéder aux masses moléculaires. Dans ce cadre, plusieurs gaz peuvent être utilisés comme gaz réactant (méthane, isobutane, l'ammoniac) mais seul l'ammoniac permet d'observer l'ion moléculaire protoné des esters de cholestérol et donc de déterminer leur masse moléculaire et la longueur de chaîne de leur partie acide²⁸⁴. L'ionisation chimique avec l'ammoniac comme gaz réactant entraîne la formation d'adduits $[M+NH_4]^+$.

b. Caractérisation des lipides du *Stratum Corneum*

i. *Prélèvements non invasifs des lipides du Stratum Corneum*

- Prélèvement du SC par tape-stripping

La méthode du tape-stripping consiste à prélever plusieurs assises de couches cellulaires du SC en appliquant de manière successive des bandes adhésives à la surface de la peau. Cette technique est très utilisée afin d'étudier la pénétration de substances dans les couches cellulaires plus profondes^{285,286}, ou encore dans l'étude de pathologies telles que la dermatite atopique²⁸⁷⁻²⁸⁹.

Des protocoles standardisés ont été proposés, permettant de prélever entre 30 et 50% de l'épaisseur du SC, par application successive de plusieurs strips²⁹⁰.

- Prélèvement du SC par écouvillonnage

Après avoir été lavés de leurs impuretés, des écouvillons peuvent être utilisés afin de prélever les lipides cutanés de chaque volontaire, de manière non invasive, pour ensuite les extraire grâce à des solvants organiques.

Associés à des techniques analytiques telles que chromatographie²⁹¹ et la spectroscopie²⁹², ces techniques de prélèvement permettent d'analyser et de quantifier les lipides du SC²⁹³. Le prélèvement par écouvillonnage présente l'avantage de diminuer les interférences dues aux polymères, observées avec la méthode de prélèvement par « tape-stripping ».

ii. Analyse des lipides du SC par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution

L'importance des sous-classes de céramides et de la longueur des chaînes insaturées sur la compacité des édifices lipidiques a clairement été mise en évidence. Seules les méthodes chromatographiques peuvent donner des informations qualitatives et quantitatives sur ces compositions^{294,295}.

Après avoir été prélevés de manière non invasive, les lipides du SC peuvent être extraits et analysés par chromatographie. Utilisée avec un détecteur adapté²⁹⁶ la chromatographie permet d'effectuer des études quantitatives et/ou qualitatives. Comme vu précédemment, ces techniques analytiques sont particulièrement adaptées pour générer des profils lipidiques en raison de la complexité de la composition lipidique du SC.

Les lipides du SC, particulièrement les céramides, sont très rarement analysés par chromatographie gazeuse en raison notamment de leur caractère non volatil^{64,258,297}. D'autre part, la chromatographie gazeuse permet une séparation en fonction de la longueur des chaînes en utilisant une phase apolaire. Les différentes sous-classes de céramides pouvant avoir une longueur de chaîne identique, une analyse selon la longueur de la chaîne rendrait l'interprétation biologique moins adaptée.

La chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) permet l'analyse des lipides cutanés mais nécessite une quantité importante d'échantillon^{298,299}.

Le couplage le plus utilisé actuellement pour l'analyse des lipides cutanés est la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS). Il permet d'obtenir une caractérisation fine des espèces moléculaires de chaque sous-classe et nécessite de petites quantités d'échantillon^{64,295}.

Les céramides cutanés, classe lipidique d'intérêt dans l'étude de la barrière cutanée, possèdent une micro-hétérogénéité structurale (longueur de la chaîne alkyle, nombre d'insaturation, nombre de fonction hydroxyle, isomérisation) très importante, rendant leur analyse très complexe⁶⁷. A ce jour, 33 sous-classes de céramides ont été détectées au niveau de la peau humaine, représentant plus de 1000 composés différents^{76,78}.

Bien que cette méthode conduise à un chromatogramme où les espèces moléculaires d'une même classe peuvent être co-éluées en un seul pic chromatographique, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est le moyen le plus utilisé pour accéder à l'identification des espèces moléculaires³⁰⁰.

Une méthode d'analyse par chromatographie liquide en phase normale couplée à un spectromètre de masse à haute résolution équipé d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (NP-HPLC/HR-MS-APCI) et d'un détecteur Orbitrap, précédemment développée²⁹¹ a été optimisée afin d'étudier les lipides du SC et notamment les céramides. Différents avantages nous ont conduits à utiliser cette méthode :

- La chromatographie liquide permet une analyse fine des lipides du SC, notamment des classes lipidiques et des sous-classes de céramides ;
- L'utilisation de la phase normale permet de séparer les molécules en fonction de leur tête polaire, contrairement à la phase inverse qui permet de séparer les molécules en fonction de la longueur de leur chaîne hydrocarbonée³⁰¹. Les sous-classes céramidiques étant établies selon la tête polaire, l'utilisation de la phase normale apparaît comme optimale afin de parvenir à une interprétation biologique^{64,302} ;

- La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) permet une ionisation douce des molécules et la détection des différentes sous-classes de céramides^{74,302}. La HR-MS-APCI utilisée en mode négatif d'ionisation conduit à la formation d'adduits chlorés [M+Cl].
- L'utilisation du spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos Pro® (ThermoFisher Scientific) intégrant une trappe ionique linéaire LTQ Velos™ et un analyseur Orbitrap™⁸⁶ permet d'acquérir des spectres de masse en « full scan » en haute résolution ainsi qu'en MSⁿ, pour la caractérisation et l'identification des différents composés.
- La fragmentation dans le mode HCD (dissociation induite par collision) permet d'appréhender la structure des céramides³⁰³.

Malgré la co-élution de différentes espèces moléculaires dans un même pic chromatographique, cette méthode permet d'obtenir une caractérisation des sous-classes de céramides grâce au couplage de la spectrométrie de masse en intervenant comme une deuxième dimension de séparation (Figure 18.A). En effet, plusieurs massifs isotopiques peuvent être observés sur le spectre de masse obtenu à un temps de rétention donné, correspondant chacun à une molécule différente (Figure 18.B).

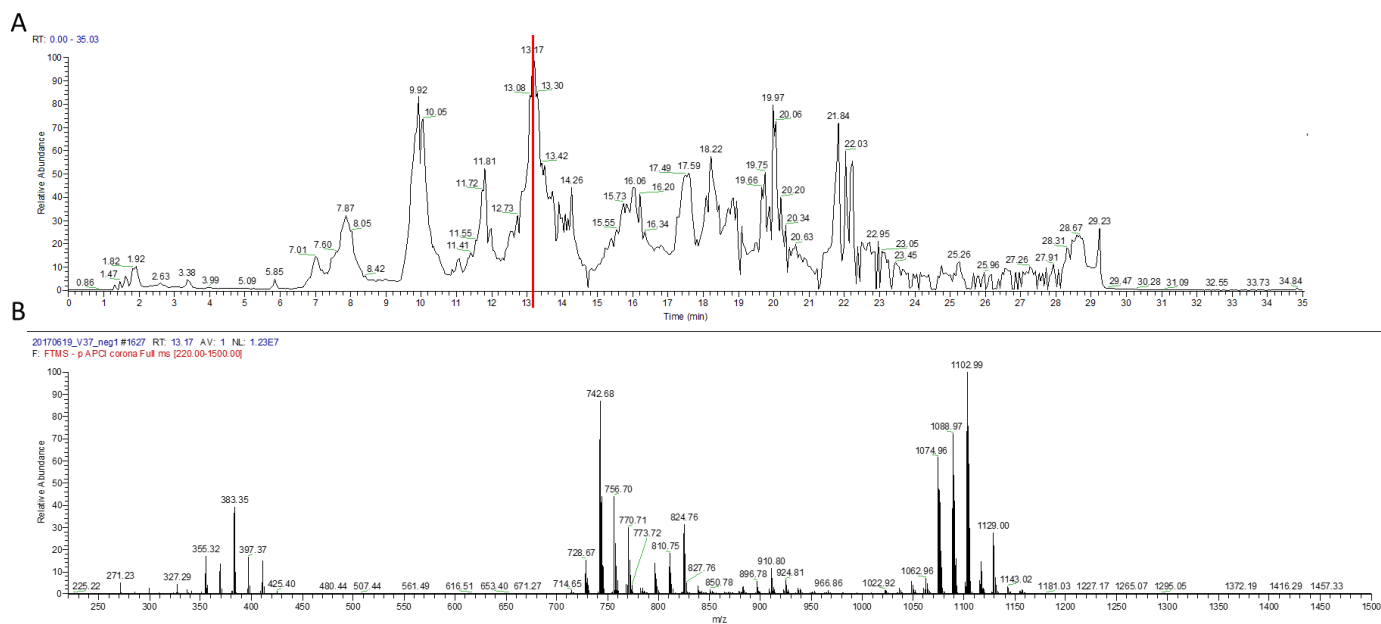


Figure 18. A. Profil chromatographique obtenu après analyse en NPLC/HR-MS-APCI des lipides du Stratum Corneum. B. Spectre de masse correspondant à un temps de rétention donné du profil chromatographique (indiqué en rouge).

L'analyse des temps de rétention ainsi que du rapport masse sur charge (m/z) permet d'obtenir une caractérisation fine des molécules présentes dans le mélange étudié.

3. Techniques spectroscopiques appliquées à la caractérisation cutanée

Comme vu précédemment, les techniques chromatographiques et de spectrométrie de masse permettent d'obtenir une analyse fine de la composition des lipides cutanés. Cependant, ces lipides font partie intégrante d'une matrice moléculaire plus complexe, intervenant de manière essentielle dans la fonction barrière cutanée. Les méthodes d'analyse par spectroscopies reposent sur les interactions de la lumière avec les composants du tissu étudié et permettent ainsi de fournir des informations structurales ainsi que des caractérisations supramoléculaires de différents composants cutanés. Ces techniques apparaissent alors comme complémentaires de celles précédemment décrites et présentent les avantages d'être non destructives, de ne pas nécessiter de préparation spécifique d'échantillon et de pouvoir être utilisées *in vivo* afin d'évaluer de façon objective les propriétés cutanées.

Parmi ces différentes méthodes, la spectroscopie à réflectance diffuse (DRS) permet de déterminer la concentration des chromophores au sein de la peau, comprenant la mélanine ainsi que l'hémoglobine³⁰⁴.

Les spectroscopies vibrationnelles permettent également d'obtenir des informations pertinentes dans le cas de la caractérisation cutanée. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) permet d'obtenir des informations vibratoires détaillées sur la composition moléculaire et la structure moléculaire mais ne permettent d'étudier que la partie très superficielle de la peau³⁰⁵.

La spectroscopie de fluorescence permet également d'étudier la physiologie cutanée³⁰⁶, en exploitant la présence de fluorophores endogènes tels que le tryptophane, les porphyrines, la kératine, le collagène, l'élastine, ou encore certaines enzymes³⁰⁷.

La spectroscopie Raman³⁰⁸ représente actuellement la méthode vibrationnelle la plus utilisée pour l'étude *in vivo* de l'organisation supramoléculaire et de la composition biochimique du SC.

a. Effet Raman

La spectroscopie Raman étudie les transitions vibrationnelles à partir de la diffusion inélastique de la lumière³⁰⁹. 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 diffusion élastique, correspond à la diffusion majoritaire (environ 1 photon sur 10^4), sans échange d'énergie. Elle se traduit par une simple diffusion du rayonnement incident, sans changement de fréquence, dans une direction quelconque. La longueur d'onde est donc la même que celle de la source excitatrice.
- 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.

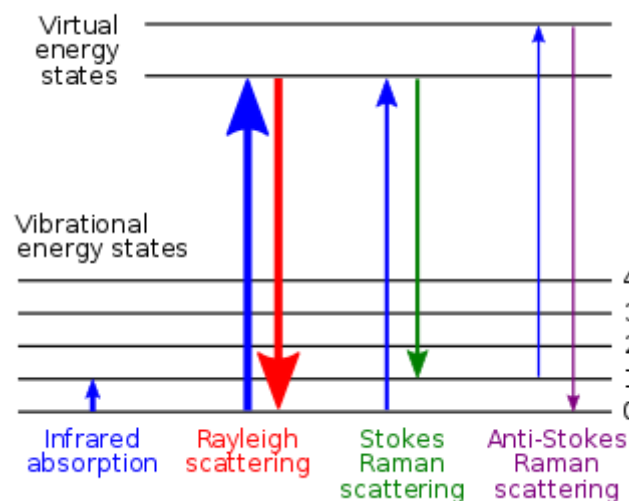


Figure 19. Diagramme des niveaux d'énergie impliqués dans la spectroscopie infrarouge, la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman. L'épaisseur des lignes indique qualitativement l'intensité des signaux de chaque transition³¹⁰

b. Apports de la spectroscopie Raman dans la caractérisation cutanée

La spectroscopie Raman est particulièrement utilisée pour la caractérisation de la barrière cutanée *in vivo*^{150,311}. En effet, cette méthode permet d'obtenir des informations moléculaires et organisationnelles concernant les lipides, les protéines, les facteurs naturels d'hydratation (NMF) ou encore les molécules d'eau contenues dans le SC^{150,312}, tous représentant des composants essentiels dans le maintien d'une fonction barrière optimale.

La spectroscopie Raman est capable de mesurer des spectres à des profondeurs spécifiques de la surface de la peau, jusqu'à 100-200 μ m. Les informations structurelles et

organisationnelles des liaisons moléculaires possèdent des signatures caractéristiques, rendant ainsi possible l'identification de la nature et la structure d'une molécule sous des formes libres ou liées ainsi que l'interaction avec son environnement. Cette méthode peut donc être utilisée pour recueillir des informations sur la qualité de la fonction de barrière du SC, ainsi que sur l'épaisseur du SC³¹³. Elle peut être utilisée également pour étudier la pénétration d'une substance active et sa distribution de concentration à travers le SC³¹⁴.

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.

La matrice lipidique du SC contient des quantités variables de céramides, d'acides gras libres et de cholestérol^{2,315,316}. Au sein du SC, ces molécules lipidiques forment des lamelles étendues dans l'espace extracellulaire, entourant les cornéocytes³¹⁷. Dans ces structures tridimensionnelles, on distingue 2 types d'organisation : latérale et lamellaire (Figure 20).

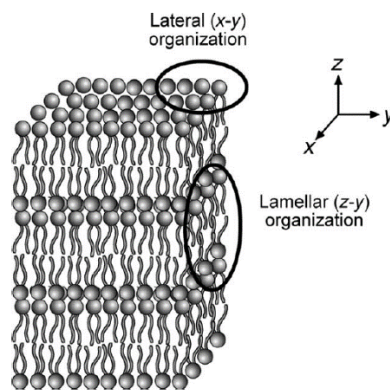


Figure 20. Structure tridimensionnelle des lamelles lipides du SC : organisation latérale et lamellaire⁶⁰.

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 21) :

- 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.

Les arrangements de cette organisation latérale influencent de manière importante la perméabilité du SC à l'eau : une conformation désordonnée des lipides au sein du SC le rendra ainsi plus perméable qu'une conformation ordonnée³¹⁸.

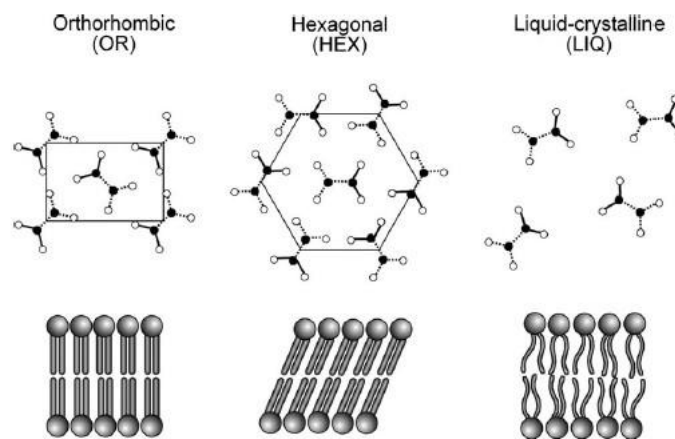


Figure 21. Organisation moléculaire latérale des lipides du SC⁶⁰

Bien que cette organisation latérale des lipides soit un facteur déterminant de la perméabilité du SC, il a également été montré que l'organisation lamellaire joue aussi un rôle important dans la régulation de l'efficacité de la barrière cutanée^{319,320}.

c. Interprétation du spectre Raman

Le spectre Raman obtenu correspond à une « empreinte » caractéristique de l'échantillon biologique étudié à un instant donné (Figure 22), englobant les différents composants cutanés et rendant ainsi cette signature très riche en informations.

Les mesures sont réalisées sur 2 zones spectrales :

- Région « empreinte digitale » : 400 - 2200 cm^{-1} (Figure 22.A)
- Région « hauts nombres d'ondes » : 2500 - 4000 cm^{-1} (Figure 22.B)

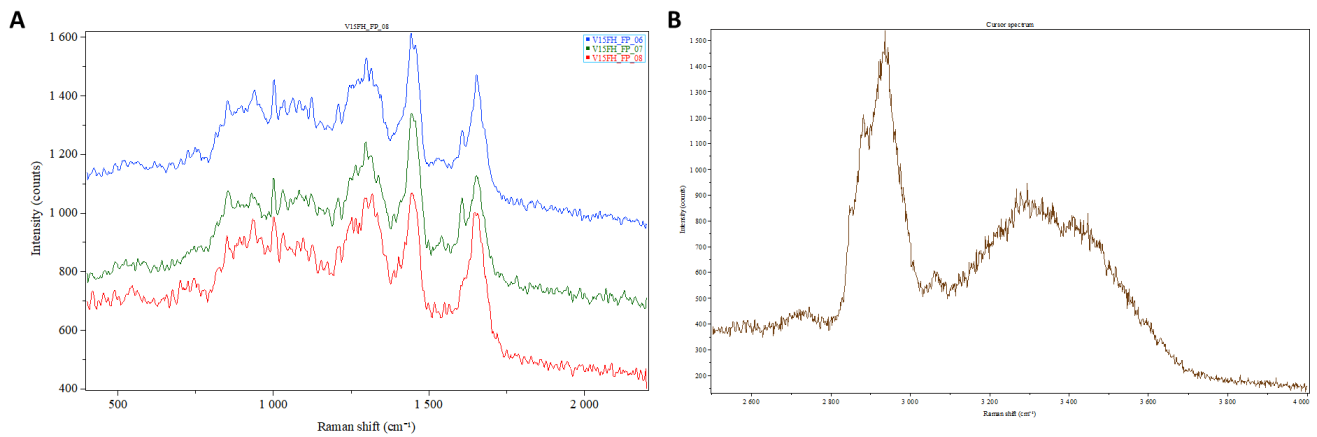


Figure 22. Spectres Raman *in vivo*, A. région « empreinte digitale » ; B, région « hauts nombres d'ondes »

De très nombreuses informations peuvent être extraites de ces spectres, notamment sur les conformations et l'organisation des lipides, les structures secondaires des protéines ainsi que l'état d'hydratation dans le 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.

Tableau 3. Attribution des bandes et marqueurs Raman in-vivo d'intérêt^{155,311,321-326}

Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Attribution (ν : élancement δ : déformation)	Caractérisation cutanée et observations physio-pathologiques
1050 – 1150	νC-C	Associé à l'état conformationnel
1060 & 1130 1080	ν C-C _{trans} ν C-C _{gauche}	
AUC (1060 + 1130) / 1080	ν C-C _{trans} / ν C-C _{gauche}	Reflète l'organisation des chaînes lipidiques. Augmentation du ratio : organisation plus compacte. Diminution du rapport dans la peau atopique, reflétant une altération de la fonction barrière ³²⁷
1296	δCH₂	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 Tours et struct. aléatoires	
2800 – 3000	νCH₂ et νCH₃	
2850 2885 2932	ν CH _{2sym} ν CH _{2asym} ν CH _{3asym}	Associé aux lipides (symétriques) Associé aux lipides (asymétriques) Associé aux protéines
AUC 2885 / 2850	ν CH _{2asym} / ν CH _{2sym}	Marqueur de compacité Diminution du ratio dans la peau atopique : altération de l'organisation de la matrice lipidique, moins compacte ³²⁷
AUC (2885+2850)/2932	(ν CH _{2asym} + ν CH _{2sym})/ ν CH ₃	Ratio significativement inférieur au niveau du SC des patients atteints d'eczéma et présentant une peau atopique ^{327,328}
2930	Position du maximum bande ν CH _{3asym}	Structure tertiaire de la kératine. Décalage du pic vers nombre d'onde inférieur montre un repliement de la kératine, favorise les interactions intramoléculaires.
3060	ν=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 (ν OH) permet de mettre en évidence la mobilité de l'eau au sein du SC.
AUC 3500 / 2900	ν OH/ ν CH	Diminution du rapport dans le cas de la peau atopique, diminution de l'eau totale au sein du SC ³²⁷

d. Absorption infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une méthode vibrationnelle tout comme la spectroscopie Raman. Contrairement au Raman, le phénomène qui permet de mettre en évidence les transitions vibrationnelles est l'absorption des photons incidents par les vibrations des liaisons. Elle consiste à envoyer sur l'échantillon une lumière polychromatique (entre 2,5 μm et 25 μm dans le cas de l'infrarouge moyen) et à analyser la lumière transmise. Lorsque la lumière incidente contient des photons ayant la même fréquence que celle d'une vibration donnée, une partie des photons peut être absorbée par la vibration. Cela résulte par une augmentation de l'amplitude de la vibration (sans changer sa fréquence). Pour la lumière, l'absorption d'une partie des photons à une fréquence (ou nombre d'onde $\nu = \tilde{\nu}c$) donnée se traduit par moins de photons arrivant sur le détecteur (transmise). Le pourcentage de transmission est donc plus faible au niveau du nombre d'onde en question.

Un exemple de spectre IR est présenté sur la Figure 23. L'absorption de l'échantillon, qui varie suivant la longueur d'onde des radiations émises par la source, est représentée par le spectre infrarouge obtenu avec le spectromètre. L'ordonnée du graphe représente le rapport des intensités transmises, avec et sans échantillon, calculé pour chaque longueur d'onde inscrite en abscisse. Ce quotient est appelé transmittance et noté T. Sur le graphe, il est souvent remplacé par son pourcentage (%T) ou par l'absorbance, $A = \log(1/T)$. Enfin, comme en spectroscopie Raman l'axe des abscisses est exprimé en nombres d'onde, dont l'unité est le cm^{-1} .

Aspect des spectres infrarouge: Absorbance et transmission

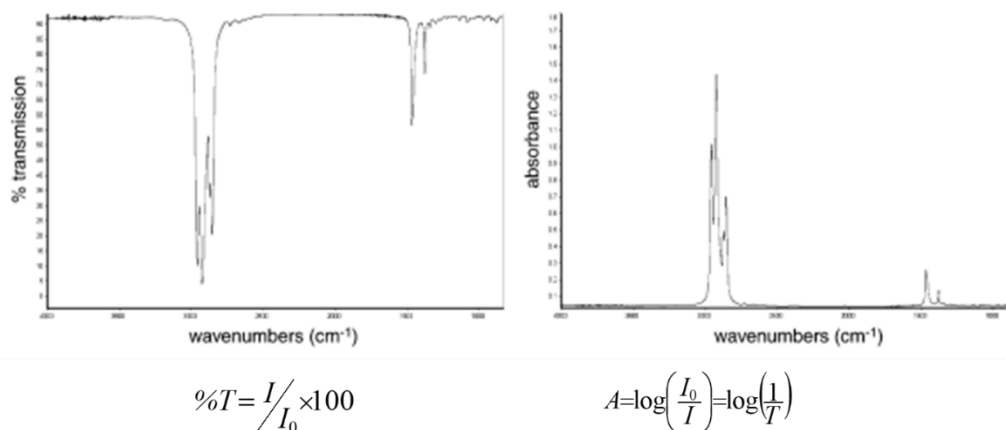


Figure 23. Spectres de transmittance (à gauche) et d'absorbance (à droite)

e. Réflexion Totale Atténuée (ATR) et Imagerie par ATR-FTIR (infrarouge à transformée de Fourier)

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.

Les spectres sont acquis à partir d'échantillons observés soit par transmission, soit par réflexion. Ce second procédé, devenu courant dans l'infrarouge est à l'origine de plusieurs techniques pour l'examen de toutes sortes d'échantillons solides, gazeux et de solutions aqueuses. Les dispositifs correspondants au second procédé sont basés sur la réflexion spéculaire, la réflexion diffuse et la réflexion totale atténuée (ATR).

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, d'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 24). 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 qui dépend de la longueur d'onde, des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon et de l'angle d'incidence. On dit qu'on est en présence d'une onde évanescente.

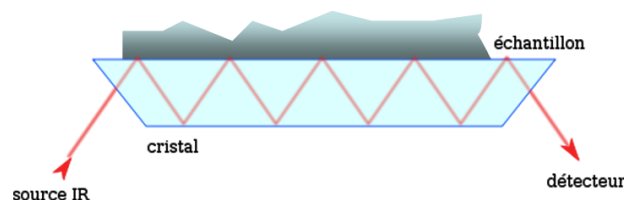


Figure 24. Représentation schématique du cristal ATR

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 μ m.

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 μ m.

Le second avantage exploité dans nos expériences étant la faible pénétration du faisceau dans l'échantillon. Les signaux obtenus sont moins pollués par les contributions sous-jacentes (signal de la colle des strips dans notre cas).

f. Spectres infrarouges 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^{322,329,330}. Nous présentons ici uniquement les bandes utilisées dans le cadre de notre travail.

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).

Tableau 4. Détermination de la structure secondaire des protéines

Structure secondaire	Fréquence (cm ⁻¹) (a)	
	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

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 notre travail, nous avons exploités uniquement les bandes des élongations symétrique et asymétrique CH₂ des lipides pour suivre l'ordre organisationnel des lipides. En effet, 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 sont indicatif d'un désordre.

Partie 2 : Méthodologies expérimentales

Les optimisations présentées dans cette partie ainsi que les choix de méthodes permettant l'acquisition d'un package analytique optimal, ont été réalisées lors de l'étude sur le vieillissement cutané. L'étude sur l'acné portant sur des volontaires ayant une pathologie cutanée nécessite un cadre juridique particulier, les optimisations réalisées en amont ont permis la constitution d'un dossier pertinent.

La qualité des résultats obtenus a été vérifiée en se basant sur trois points principaux :

- Le nombre suffisamment important de volontaires inclus dans chaque étude,
- Le traitement chimiométrique appliqué sur le vaste volume ainsi que la particularité des données obtenues,
- L'interprétation biologique des résultats obtenus.

Après avoir été validées, les conditions ont été utilisées pour l'ensemble des études expérimentales effectuées durant cette thèse.

I. Mise en place des études *in vivo*

1. Conditions environnementales

Les séances de mesure ont été réalisées dans une salle d'étude ayant des conditions environnementales (température et humidité relative) contrôlées, après une période d'acclimatation de 20 minutes pour chaque volontaire.

Afin de réaliser les mesures dans des conditions optimales pour les différentes acquisitions pouvant nécessiter le maintien d'une même position pendant 20 minutes, et le confort des volontaires, celles-ci ont été installées en position allongée.

2. Zones de mesures

Pour chaque étude, l'ensemble des mesures a été réalisé sur la zone du front. La ligne médiane du front nous a permis de séparer 2 zones :

- 1 côté dédié au prélèvement de sébum (avec papier de 7 x 3,5cm)
- 1 côté dédié aux mesures biophysiques et spectroscopiques. La zone a été délimitée à l'aide d'un masque d'une dimension de 3,5cm x 3cm.

Le côté de réalisation des mesures a été randomisé.

Le prélèvement de *Stratum Corneum* a été réalisé à la fin de la séance et sur la totalité du front, sur une zone préalablement délimitée par un masque d'une dimension de 7cm x 3cm.

3. Statut réglementaire

Avant d'entamer toute procédure relative aux différentes études, chaque volontaire a donné son consentement éclairé par écrit quant à sa participation à l'étude.

L'étude sur **l'acné** étant réalisée sur les personnes avec une peau pathologique, entre dans le champ des recherches impliquant la personne humaine. Compte tenu des actes pratiqués, elle relève de la catégorie « à risques et contraintes minimales » du 2° de l'article L.1121-1 du code de la santé publique.

D'autre part, aucun produit n'ayant été utilisé, cette recherche relève des recherches ne portant pas sur un produit mentionné à l'article L.5311-1 du code de la santé publique.

Compte tenu de ces informations et après confirmation auprès de l'agence nationale pour la santé et le médicament (ANSM), cette étude a été soumise et **acceptée** par le comité d'éthique CPP OUEST IV – Nantes.

Afin de valider ces conditions, le dossier de demande d'avis au comité de protection des personnes (CPP) a été réalisé avec l'aide d'une société extérieure spécialisée et soumis pour validation par le comité d'éthique.

4. Critères d'inclusion et d'exclusion

Afin d'obtenir des résultats pertinents et de limiter les biais éventuels, différents critères d'inclusion et d'exclusion ont été déterminés pour chaque étude. De plus, les sujets participant aux différentes études n'ont pas été autorisés à participer simultanément à une

autre étude.

a. Etude portant sur le vieillissement cutané

2 groupes de femmes caucasiennes en bonne santé ont été considérés :

- 22 femmes âgées entre 18 à 24 ans (âge moyen (\pm SEM) = 21,8 (\pm 0,35))
- 18 femmes âgées entre 70 à 75 ans (âge moyen (\pm SEM) = 72,1 (\pm 0,38))

Pour être inclus dans l'étude, les sujets ont dû remplir tous les **critères d'inclusion** suivants :

- Sujet féminin, âgée entre 18 et 24 ans ou entre 70 et 75 ans
- Sujet de type caucasien, présentant un phototype de I à III (Fitzpatrick)
- Sujet non fumeur
- Sujet ayant un Indice de Masse Corporelle <27
- Sujet présentant une peau saine sur le visage
- Sujet affilié à un régime d'assurance maladie

Les sujets remplissant au moins l'un des **critères d'exclusion** suivants n'ont pas été inclus dans l'étude :

- Grossesse ou allaitement en cours
- Accouchement au cours des 6 derniers mois
- Lésions cutanées et/ou affections dermatologiques (acné, rosacée...) au niveau du visage
- Chirurgie esthétique et/ou soins de dermatologie esthétique (endermologie, ultrasons, radiofréquence, mésothérapie...) sur le visage
- Volontaires ayant appliqué un produit sur le visage la veille au soir et le jour du test
- Volontaires ayant effectué un gommage du visage dans les 5 jours précédant le test
- Exposition au soleil ou aux lampes UV dans les 3 semaines précédant l'étude
- Affection chronique, pathologie aiguë ou traitement médicamenteux pouvant interférer avec les paramètres de l'étude
- Incapacité de suivre les impératifs du protocole.

Avant la réalisation des mesures, les examens suivants ont été effectués par la personne en charge de la réalisation des mesures :

- Vérification des données démographiques
- Vérification des antécédents médicaux/traitements antérieurs et/ou concomitants
- Examen clinique du visage et détermination du type de peau
- Vérifications des critères d'inclusion et d'exclusion

b. Etude portant sur l'acné

L'étude a été réalisée sur 60 sujets :

- Groupe 1 : 20 femmes ayant la peau normale
- Groupe 2 : 20 femmes ayant la peau grasse (au toucher et visuellement) pouvant correspondre au grade 1 de la classification GEA²⁴⁶,
- Groupe 3 : 20 femmes présentant une acné légère à modérée : grade 2 ou 3 de la classification GEA²⁴⁶.

Pour être inclus dans l'étude, les sujets ont dû remplir tous les **critères d'inclusion** suivants :

- Sujets féminins âgés de 18 à 30 ans
- Sujets de type caucasien, présentant un phototype de II à IV (Fitzpatrick)³³¹
- Sujet présentant une peau normale ou une peau grasse (grade 0 ou 1 de la classification GEA²⁴⁶) ou une acné légère à modérée (grade 2 ou 3 de la classification GEA²⁴⁶) au niveau du visage
- Sujet déclarant ne pas avoir modifié son type de contraception dans les 6 derniers mois précédant l'étude ou sujet ménopausée (chirurgicalement ou naturellement) depuis au moins 6 mois,
- Sujet non fumeur (< 5 cigarettes/semaine depuis au moins un an)
- Sujet ayant un Indice de Masse Corporelle < 25³³²
- Sujets ayant donné leur consentement par écrit et acceptant de se conformer aux exigences de l'étude
- Sujets possédant une couverture sociale (assurance maladie) conformément aux exigences de la loi française

Les sujets remplissant au moins l'un des **critères d'exclusion** suivants n'ont pas été inclus dans l'étude :

- Sujet présentant une maladie systémique ou une affection dermatologique pouvant interférer avec les résultats de l'étude (autre que l'acné légère à moyenne)
- Sujet ayant un état de santé ou prenant un traitement, qui d'après le jugement de l'investigateur, ferait courir un risque excessif aux sujets (si le sujet est en cours de soin chez un médecin, l'approbation de celui-ci devra être demandé selon la décision de l'investigateur et/ou conformément aux exigences réglementaires)
- Sujet ayant des antécédents médicaux ou chirurgicaux pouvant affecter, d'après l'investigateur, la sécurité des sujets ou les résultats de l'étude
- Sujet ayant réalisé une chirurgie esthétique et/ou des soins de dermatologie esthétique (peelings, endermologie, ultrasons, radiofréquence, mésothérapie...) sur le visage,
- Femme enceinte (test urinaire de grossesse positif) ou allaitante
- Femme ayant accouché dans les 6 derniers mois
- Sujet recevant ou ayant reçu un traitement oral par isotrétinoïne
- Sujet recevant ou ayant reçu un traitement oral contenant de l'acétate de cyprotérone ou spironolactone dans les 6 derniers mois
- Sujet prenant ou ayant pris un traitement antibiotique contre l'acné par voie orale dans les 2 derniers mois
- Sujet ayant appliqué sur le visage des traitements médicaux et/ou cosmétiques contre l'acné (actif type AHA, rétinaldéhyde), dans le mois précédant le début de l'étude
- Sujet s'étant exposé de façon intense ou excessive aux UV (artificiels ou naturels) dans les 3 semaines avant le début de l'étude
- Sujet ayant effectué un gommage ou un soin en institut de beauté type nettoyage de peau au niveau du visage dans les 5 jours précédant le début de l'étude
- Sujet ayant appliqué un produit (d'hygiène, de soin ou du maquillage) au niveau du visage la veille au soir et le jour de l'étude
- Sujet déclarant être privé de liberté par décision administrative ou judiciaire ou sous

tutelle

- Sujet qui ne pourrait être contacté par téléphone en cas d'urgence
- Sujet salarié du centre de recherche clinique
- Sujets déclarant être privés de leur liberté par une décision administrative ou légale ou sujets sous tutelle
- Sujets déclarant être en période d'exclusion ou participant à une autre étude biomédicale exclusive.

Avant la réalisation des mesures, les examens suivants ont été effectués :

- Vérification de l'absence de grossesse par test urinaire
- Vérification des données démographiques
- Vérification des antécédents médicaux/traitements antérieurs et/ou concomitants
- Examen clinique du visage et détermination du type de peau par un dermatologue
- Vérifications des critères d'inclusion et d'exclusion

5. Calcul du nombre de sujets

Pour les différentes études menées, aucun calcul du nombre de sujets n'a été effectué. Plusieurs articles décrivant le même type d'étude ont été publiés^{176,333}. Par conséquent, un nombre arbitraire de 20 sujets par groupe a été défini en se basant sur ces articles. Ce nombre de sujets par groupe nous permet ainsi d'étudier de manière pertinente les propriétés de la barrière cutanée ainsi que la composition moléculaire détaillée des lipides cutanés malgré les différences interindividuelles importantes.

6. Mise en place des prélèvements dans le cadre du projet « Under The Pole »

Des analyses ont été réalisées dans le cas du projet « Under The Pole », afin d'étudier l'effet de conditions extrêmes (notamment de température et humidité) sur la fonction barrière cutanée. Le projet consistant en une expédition au pôle Nord sur un bateau, les mesures devaient être réalisées dans des conditions particulières, et par les personnes participant à l'expédition. Dans ce cadre, une vidéo explicative ainsi que des procédures

écrites ont été réalisés et fournis avec le matériel nécessaire afin de permettre aux explorateurs de réaliser les mesures dans les meilleures conditions possibles. Le temps pouvant être dédié à nos mesures étant limité (en raison d'un nombre important de projets de recherche inclus dans l'expédition), les prélèvements de sébum, nécessitant 2h de prélèvement, n'ont pas été réalisés. Des photos de l'expédition sont présentées en Annexe 3.

II. Mise en place des analyses des LCS par HT-GC/MS

1. Prélèvement

Le prélèvement de sébum a été réalisé au moyen d'un papier absorbant de 7 x 3,5cm : le sébum est recueilli sur une durée totale de 2 heures, pour cela le papier absorbant est changé toutes les 30 minutes, soit 4 papiers absorbants au total (Annexe 1). Les papiers absorbants ont été maintenus à l'aide d'une bande médicale élastique. Les prélèvements ont ensuite été placés dans des tubes, puis stockés à -20°C avant d'être analysés.

2. Préparation des solutions standards

- Mélange de Folch : Chloroforme : Méthanol [2:1]
- Réactif silylant : BSTFA : Pyridine [1:1]
- Solution d'étalon interne (EI) 1-eicosanol (C₂₄:O/C₂₀H₄₂O) à 0.3mg/mL, préparée dans l'iso-octane
- Solution de lipides standards, chacun à une concentration de 0.5mg/mL, préparés dans le mélange de Folch : 1-Monostearin (C₁₈:0), Dipalmitin (C₁₆:1), Tripalmitin (C₁₆:0), Cholesteryl palmitate, Cire (arachidic acid lauryl ester), Acide palmitique (C₁₆:0), Squalène, 2,3-Oxidosqualene, Cholestérol.

200µL de chaque solution de lipides standards et de solution d'étalon interne ont été prélevés et mélangés dans un flacon en verre. La solution finale a été évaporée à sec sous flux d'azote puis reprise dans 1mL d'iso-octane, avant d'être conservée à -20°C.

Après avoir été remis à température ambiante, le mélange de solutions standards a été triméthylsilylé pendant 30min, à température ambiante, avec 300µL de réactif silylant. Le résidu à sec obtenu après évaporation de l'excès de réactif a été repris dans 400µL d'isooctane.

3. Préparation des échantillons

a. Extraction des lipides

L'extraction des lipides prélevés à l'aide des papiers absorbants a été réalisée après retour des échantillons à température ambiante. 200µL d'une solution contenant l'étalon interne (1-eicosanol) ont été ajoutés directement sur les papiers, dans les tubes en verre. Les lipides ont ensuite été extraits des papiers, à 3 reprises, avec 10mL d'éther diéthylique. Entre chaque extraction, la solution a été vortexée pendant 2min puis évaporée à sec sous flux d'azote. L'extrait final obtenu a été concentré à un volume d'environ 1mL et transféré dans un flacon de verre brun 2mL puis évaporé à sec. Le résidu a ensuite été conservé à -20°C.

b. Silylation des composés

Avant d'être analysés, les échantillons ont été silylés et analysés en HT-GC/MS. La silylation a été effectuée à l'aide du réactif silylant BSTFA/Pyridine 50/50 (V/V). Les échantillons ont été triméthylsilylés à température ambiante, pendant 30min, avec 200µL de solution. L'excès de réactif a ensuite été évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis le résidu sec a été repris dans 400µL d'isooctane pour l'étude vieillissement.

En raison d'un changement d'appareil de mesure dans l'étude acné, et suite à une optimisation, les échantillons ont été repris dans 800µL d'isooctane.

Pour l'injection, un volume de 1µL a été prélevé dans la solution d'échantillon, puis directement injecté « on-column ».

4. Analyses en HT-GC/MS

La caractérisation de la composition lipidique du sébum a été effectuée, après extraction des

lipides, par analyse en HT-GC/MS.

Dans le cadre de l'étude sur le **vieillessement**, les analyses ont été réalisées au LETIAM (IUT d'Orsay), 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 simple quadripôle (DSQ II) via une interface haute température.

Dans l'étude sur **l'acné**, les analyses ont été réalisées au SAMM (Faculté de pharmacie, UPSaclay) 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.

Dans les deux études, la séparation a été réalisée en utilisant une colonne OPTIMA-5HT capillaire (Macherey-Nagel) 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 2mL/min. L'injecteur et la ligne de transfert étaient à une température de 80°C et 350°C respectivement. La température du four était programmée de 80°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 25). Les spectres de masse en ionisation chimique (IC) ont été enregistrés en courant ionique total (TIC). La température de la source d'ionisation était fixée à 250°C et l'énergie d'ionisation à 120eV.

L'ammoniac a été utilisé comme gaz réactant, avec un débit constant de 1mL/min. Le mode de balayage fullscan a été utilisé, entre les rapports masse sur charge (m/z) 230 et 1000, avec une périodicité de 1s.

Les échantillons ont été analysés de manière aléatoire. La reproductibilité de la méthode a été vérifiée au cours de l'étude à travers l'analyse d'un échantillon test 1 fois par semaine d'analyse. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel ThermoFisher Xcalibur.

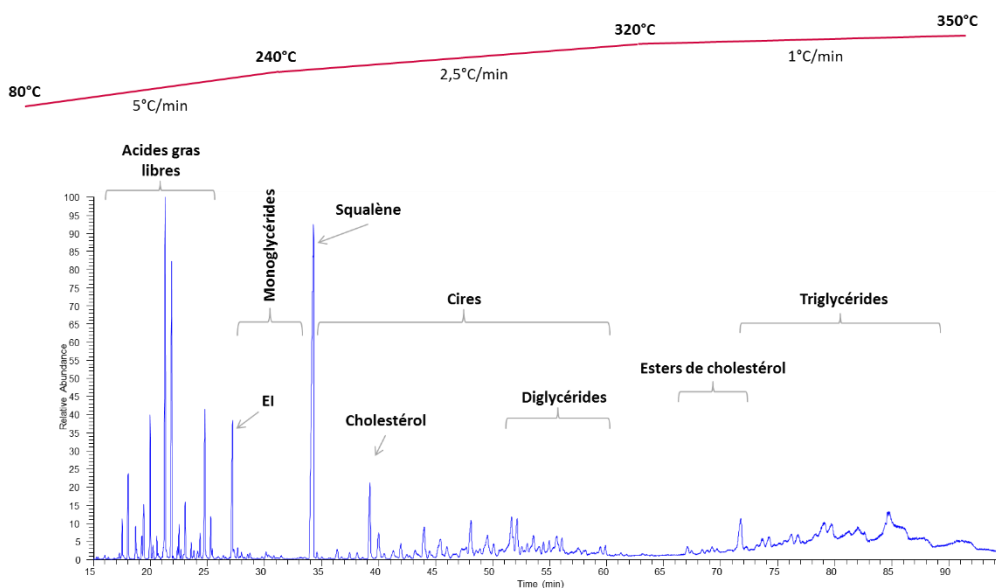


Figure 25. Méthode d'analyse utilisée en HT-GC/MS, avec gradient de température. EI : Etalon Interne (1-éicosanol)

III. Mise en place des analyses des lipides du SC par NPLC/HR-MS

1. Prélèvement des lipides du SC

Dans le cas de l'étude sur le vieillissement cutané, les écouvillons utilisés ont été rincés dans un mélange de Folch avant les prélèvements : 2 flacons contenant 15mL de Folch ont été utilisés pour rincer 4 écouvillons (dans le 1^{er} puis dans le 2^{ème} flacon). Les écouvillons ont ensuite été placés dans un béccher propre et séchés sous hotte.

Après avoir délipidé la zone du front à l'aide d'éther diéthylique et de papier filtre, le prélèvement de SC a été réalisé à l'aide de 4 écouvillons imbibés d'une solution de solvants spécifiques (Acétate d'éthyle : Méthanol [2:8]), sur une zone de 7cm x 3 cm (Annexe 2). Les 2 faces de tissus des écouvillons ont ensuite été réunis dans un flacon en verre puis stockés à -20°C avant d'être préparés puis analysés.

Afin de débarrasser au mieux les écouvillons des impuretés qui peuvent être retrouvées lors de nos analyses, un protocole de rinçage optimisé a été utilisé pour les écouvillons servant aux prélèvements lors de l'étude acné.

Les écouvillons ont été rincés trois fois de suite dans une solution de Folch placée aux ultrasons pendant 5min.

2. *Préparation des solutions standards*

- Mélange de Folch : Chloroforme / Méthanol, 2/1, v/v
- Solution d'étalon interne (Céramide like « Ω^6 Ceramide », Solabia, France) préparée dans le mélange de Folch, à une concentration de 0,102mg/mL
- Solution de lipides standards, chacun à une concentration de 0.5mg/mL, préparés dans le mélange de Folch : Acide oléique (C18:1), Cholestérol, Céramide 6 (AP(t18:0/18:0)), ainsi que l'étalon interne à une concentration de 0,102mg/mL.

3. *Extraction des lipides du SC*

Les lipides ont été extraits à partir des tissus d'écouvillon décongelés. Après ajout de 10 μ L de solution d'étalon interne, 3 extractions successives ont été réalisées avec 5mL de solution Folch. Entre chaque extraction, les solutions ont été vortexées pendant 2min puis évaporées à sec sous flux d'azote. L'extrait final obtenu a été concentré à un volume d'environ 1mL et transféré dans un flacon de verre brun 2mL puis évaporé à sec.

a. *Optimisation des étapes d'extraction dans l'étude acné*

Lors des analyses en NPLC/HR-MS des échantillons de l'étude acné, nous avons observé une variation très importante du temps de rétention de l'étalon interne, pouvant aller de 2min à 10min. En observant à l'œil nu les flacons contenant les extraits, nous avons observé que les échantillons étaient, pour la majorité, non homogènes et présentaient plusieurs phases. A ce stade, tous les échantillons de l'acné étaient repris dans une solution d'injection de 200 μ L : heptane/chloroforme 80/20.

A cette étape de l'étude, et n'ayant pas rencontré ces problèmes lors des analyses de l'étude vieillissement et des différents tests d'optimisation réalisés, nous avons fait l'hypothèse que la composition de nos échantillons en terme de quantité plus importante en lipides ne permettait pas une solubilité optimale entre l'heptane et le chloroforme, les 2 solvants constituant notre solution d'injection.

Par la suite, différents tests ont donc dû être effectués afin de résoudre ce problème. Des prélèvements ont été effectués en dehors de l'étude afin de réaliser ces tests sans risquer de

perdre des échantillons de l'étude acné.

- Test d'augmentation du volume de solvant d'injection utilisé pour la reprise des échantillons : 400µL de solution heptane/chloroforme 80/20 au lieu de 200µL.
Après reprise avec 400µL de solvant d'injection, nous avons à nouveau obtenu une solution non homogène et présentant différentes phases, cette solution n'a donc pas été adoptée. De plus, cette étape induit la dilution de l'échantillon.
- Test de modification du solvant d'injection : la solution heptane/chloroforme a été remplacée par une solution de chloroforme 100%, permettant une meilleure solubilisation des lipides.
- Tests de filtres adaptés aux solvants

Afin de conclure pour la suite des analyses, les conditions suivantes ont été comparées :

- Reprise d'un extrait sec d'échantillon directement avec 200µL de chloroforme (sans filtration)
- Reprise d'un extrait sec avec la solution d'injection heptane/chloroforme 80/20, puis filtration, évaporation à sec et reprise dans 200µL de chloroforme.

Suite à ces analyses, nous avons observés que nous n'avions pas de perte d'information entre les échantillons repris directement avec 100% de chloroforme suite à l'extraction, et avec les échantillons filtrés avant d'être évaporés puis repris dans 100% de chloroforme.

Afin de valider le protocole de filtration des échantillons puis la reprise dans 100% de chloroforme, ces étapes ont été appliquées à 4 échantillons de l'étude de vieillissement avant d'être appliqués à la totalité des échantillons de l'étude acné.

Ces analyses nous ont permis de valider les étapes de filtration, le choix du matériel nécessaire tels que les filtres en PTFE compatibles avec les solvants organiques ainsi que les seringues en verre, et ont permis de confirmer que nous n'avions pas de perte d'informations suite à la filtration.

Protocole de filtration appliqué aux échantillons de l'étude acné :

Suite aux tests réalisés et validés sur les échantillons de l'étude sur le vieillissement, les étapes suivantes ont été réalisées pour procéder à la filtration des échantillons de l'étude acné : Rinçage du filtre avec 200µL de chloroforme (volume mort). Prélèvement des 200µL de l'échantillon contenus dans le flacon, puis les filtrer et les placer dans un nouveau flacon. Rinçage de l'insert de l'échantillon avec 200µL de chloroforme, puis filtration et ajout dans le flacon contenant les 200µL d'échantillon filtrés précédemment. Evaporation à sec des 400µL récupérés dans le nouveau flacon. Juste avant injection : reprise du résidu sec dans 200µL de chloroforme, vortex puis passage dans un insert. Volume d'injection : 10µL.

Pour résumer, afin de permettre une meilleure solubilisation de nos lipides et d'obtenir des solutions homogènes, une filtration a donc été effectuée. De plus, une optimisation du solvant d'injection a été effectuée en utilisant le chloroforme comme solution d'injection, et le rack contenant les échantillons avant analyse a été placé à 15°C.

4. Analyses en NPLC/HR-MS des lipides du SC

La caractérisation de la composition lipidique du *Stratum Corneum* a été effectuée, après extraction des lipides, par analyse en NP-HPLC/HR-MS (Normal Phase, High Performance Liquid Chromatography / High Resolution Mass Spectrometry).

Tous les échantillons ont été analysés dans une seule séquence NPLC (Ultimate 3000 Dionex, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). La séparation des lipides a été effectuée en chromatographie liquide de partage en phase normale, en utilisant une colonne PVA-Sil (YMC, KYOTO, Japon) de longueur 150mm, diamètre interne de 2.1mm et une granulométrie des particules de 5µm. La séparation a été réalisée en utilisant un gradient de solvants : heptane : chloroforme [80 :20] (phase A), acétone (phase B) et isopropanol (phase C). Le gradient appliqué a démarré par 100% de phase A jusqu'au mélange 50% phase A + 50% phase B en 25min, puis 2 minutes de rinçage de la colonne avec la phase C et 10 minutes de remise en équilibre avec la phase A, ce qui représente une durée d'analyse d'environ 40 minutes. Le débit de la phase mobile a été réglé à 0.4mL/min, la température du four était

de 40°C.

Le choix des solvants de la phase mobile a été réalisé afin de respecter les propriétés physicochimiques des lipides du SC, en particulier les céramides, tout en assurant une compatibilité avec l'interface APCI du spectromètre de masse. Le gradient d'élution choisi est de polarité croissante afin d'augmenter la force d'élution. L'éluant A (heptane:chloroforme [80 :20]) a été choisi afin d'éluer les molécules les moins polaires. L'éluant B (acétone) a été sélectionné afin de permettre l'élution des molécules moyennement polaires, notamment les céramides. Le gradient permet quant à lui d'obtenir une séparation des sous-classes au sein de la classe des céramides. L'éluant C (isopropanol) permet un rinçage de la colonne de chromatographie en éluant les molécules les plus polaires, afin de pouvoir passer à l'analyse de l'échantillon suivant après une phase d'équilibre.

Le système chromatographique a été couplé à un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA), équipé d'une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les analyses ont été effectuées en mode full-scan (balayage entre les m/z 220 et 1500) et MS^2 , en ionisation négative et positive. La fragmentation a été effectuée en HCD (High Collision Dissociation) avec une énergie de collision de 45eV. Le volume d'injection a été fixé à 10 μ L. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel ThermoFisher Xcalibur.

Lors des analyses, une solution de standards de référence ainsi qu'un blanc de solvant d'injection et un témoin d'extraction ont été analysés tous les 3 échantillons. L'ordre de passage des échantillons a été randomisé.

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

Les acquisitions spectroscopiques ont été effectuées avec un microspectromètre Raman LabramHR evolution (Horiba scientifique, 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 200 μ m 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 5 μ m 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).

- **Optimisation des paramètres d'acquisition :**

Pour les analyses *in vivo*, un compromis entre la qualité spectrale et le temps d'acquisition a été recherché. Les paramètres suivants ont été choisis :

- Réseau dispersif : c'est le réseau dispersif qui détermine la résolution spectrale. Plus le nombre de traits/mm est important, plus la résolution spectrale est fine. Le nombre de pixels du détecteur étant limité, l'augmentation de la résolution spectrale se traduit par l'arrivée à chaque pixel du détecteur d'un nombre plus faible de photons et l'occupation de l'ensemble de pixels avec une fenêtre spectrale plus fine. A titre d'exemple, pour une résolution moyenne de 1 cm^{-1} une fenêtre spectrale couvre 1064 cm^{-1} , tandis que pour une résolution moyenne de 0.1 cm^{-1} une fenêtre spectrale ne couvre que 106 cm^{-1} . Les contre parties d'une meilleure résolution sont donc une perte d'intensité (sensibilité) par accumulation et le besoin d'un nombre plus grand de fenêtres spectrales pour couvrir la gamme d'analyse.

Pour nos mesures, nous avons utilisé le réseau dispersif à 300 traits/mm offrant une résolution spectrale moyenne de 4 cm^{-1} et permettant de couvrir la gamme spectrale

- d'analyse (400-3800 cm^{-1}) avec deux fenêtres spectrales uniquement.
- La gamme spectrale : la gamme spectrale choisie est 400-3800 cm^{-1} afin de couvrir les hauts nombres d'ondes et d'obtenir des informations supplémentaires sur l'organisation des lipides et l'état d'hydratation de la peau.
 - Le trou confocal (μm) : Il permet de contrôler la profondeur du spot de focalisation et donc la résolution axiale. La fermeture du trou confocal limite cependant le nombre de photons arrivant au détecteur ce qui diminue par conséquent le rapport signal sur bruit. La sonde superhead ne permet pas de changer l'ouverture confocale. Le diamètre de la fibre collectrice (5 μm) détermine la confocalité.
 - Le temps d'exposition : La qualité du signal augmente avec le temps d'acquisition mais ce dernier présente des limites. En effet, pour réaliser un profil en Z *in vivo*, le facteur temps devient un facteur limitant. Plus la durée est longue, plus est grand le risque de mouvement du volontaire. Un compromis entre la qualité spectrale et la durée de l'analyse a été trouvé avec 2 secondes * 2 accumulations par spectre.
 - Le nombre d'accumulations était fixé à 2. La répétition des acquisitions permet d'éliminer statistiquement d'éventuels "spikes" (rayons cosmiques) et améliorer le rapport signal/ bruit.
 - Analyses à la surface et en profondeur : Pour chaque volontaire 6 spectres de surface ont été réalisés et 3 profils en Z. Chaque profil spectral contient 16 spectres de -15 μm à +30 μm sous la surface de la peau avec un pas de 3 μm .

Tableau 5. Récapitulatif des paramètres choisis pour les analyses Raman

	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

V. Traitement des données analytiques

1. Traitement des données obtenues en HT-GC/MS

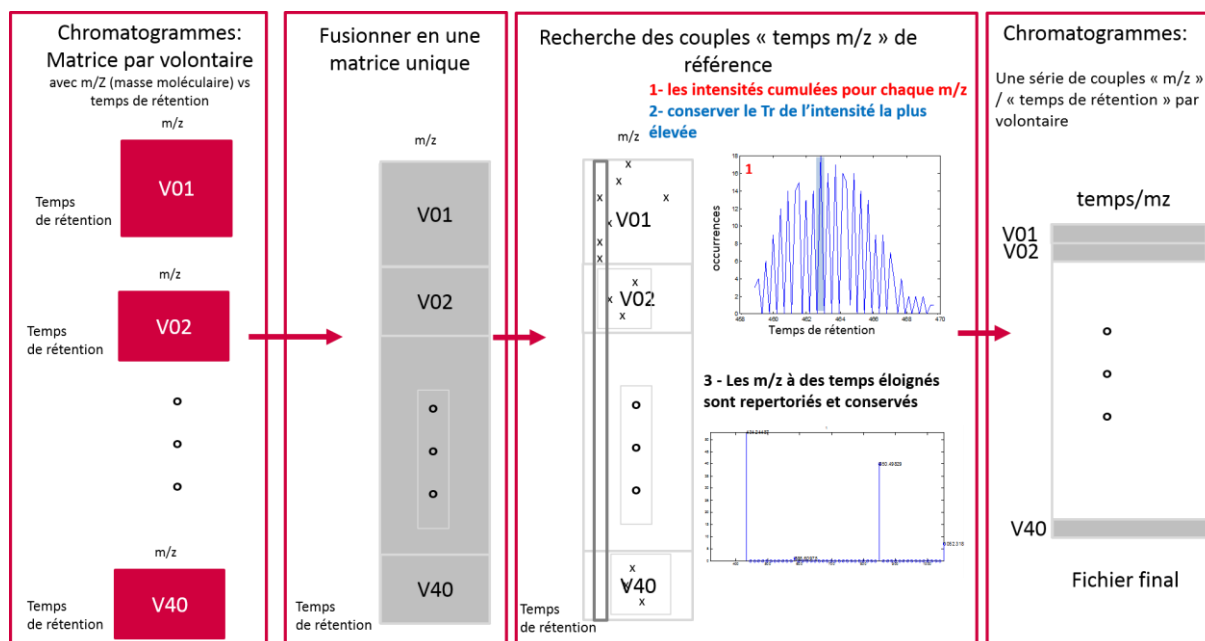


Figure 26. Etapes de pré-traitement appliquées aux données HT-GC/MS

Afin d'obtenir une matrice finale contenant les données à analyser, le pré-traitement suivant a été réalisé (Figure 26) :

- **Concaténation des chromatogrammes de chaque volontaire afin d'obtenir une matrice unique**
- **Recherche des couples Temps de rétention (Tr) et rapports masse/charge (m/z) de référence (couples Tr*m/z) :**
 - Pour chaque temps donné, recherche de l'intensité maximale : chaque ligne, correspondant à chaque temps de rétention est représentée par 0 ou intensité du maximum (maximum du spectre de masse).
 - Une matrice de vide est créée (zéros) dont les dimensions sont :
 - 5800 pour les Tr (5800 secondes étant la durée de l'analyse) et
 - Nombre de m/z : identique aux spectres de masses enregistrés
 - Afin de remplir la matrice chaque chromatogramme est lu dans le sens des m/z

- A chaque m/z correspond soit (a) aucune soit (b) une ou (c) plusieurs valeurs de Tr
 - (a) : la case correspondant à ce couple $Tr*m/z$ reste vide (zéro)
 - (b) : la case correspondant à ce couple $Tr*m/z$ est remplacée par l'intensité correspondante
 - (c) : une recherche est faite pour trouver si les Tr trouvés sont arrondis au même temps (à la seconde près)
 - Exemple : 1004.2, 1004.5, 1004.6 et 1005.1 donnent : 1004, 1004, 1005 et 1005
 - Les intensités seront additionnées dans les cases correspondant à $1004*m/z$ et $1005*m/z$
 - Une fois que toutes les intensités correspondantes aux $Tr*m/z$ du premier chromatogramme sont attribuées nous passons au chromatogramme suivant : les intensités viennent s'additionner à celles du premier.
 - Cette opération est répétée pour tous les chromatogrammes
 - A la fin de ces étapes, on dispose alors de l'ensemble des positions de références associant un temps de rétention (Tr) à un m/z . La matrice ainsi créée contient les positions de référence ($Tr*m/z$) :
 - $Tr = [1, 2, 3, 4, \dots, 5798, 5799, 5800]$
 - $m/z =$ uniquement les m/z correspondants à des valeurs supérieures à un seuil d'intensité fixé selon les besoins de l'opérateur (ici à 10^4) :
- **Nous rechargeons ensuite les chromatogrammes entiers (non réduits) un par un et nous les comparons à la matrice de référence**
 - La comparaison se fait en défilant la matrice de référence m/z par m/z :
 - Pour un chromatogramme, à chaque m/z nous avons des valeurs qui affichent des intensités à un ou plusieurs Tr .
 - Nous pouvons donc établir l'histogramme des intensités pour chaque valeur de m/z .
 - Dans le cas d'un massif unique (correspondant à une zone unique de

Tr), la zone représentative est identifiée par le Tr correspondant à la position maximale du massif. Le couple Tr^*m/z est ainsi identifié.

- Dans le cas où un même m/z est associé à plusieurs temps de rétention, les zones de temps sont identifiées séparément et plusieurs positions de référence sont attribuées à une même valeur de m/z : différents couples Tr^*m/z sont créés.
 - Chaque nouveau chromatogramme est représenté dans une nouvelle ligne.
 - L'ensemble des nouveaux chromatogrammes est représenté dans une matrice unique.
 - Chaque chromatogramme contient le couple Tr^*m/z correspondant à un étalon interne (1-eicosanol, $m/z = 372$) qui est utilisé pour normaliser les intensités.
- **A la suite de ce pré-traitement, une ANOVA (p -Value < 0.05) a été réalisée afin de mettre en avant les couples Tr^*m/z discriminants entre les différents groupes de sujets. Les couples obtenus nous ont ensuite permis d'identifier les lipides correspondants.**

2. Identification des lipides cutanés de surface, obtenus par HT-GC/MS

Dans le cas de l'étude des lipides cutanés de surface, analysés par HT-GC/MS, la totalité des lipides détectés ont été identifiés dans chaque étude, afin d'obtenir des informations individuelles mais également sur le pourcentage que représentait chaque classe lipidique au sein de la totalité des LCS.

a. Identification des espèces moléculaires détectés

Dans l'échantillon des LCS étudié, un composé correspond à un pic chromatographique donné. Il a donc été identifié par son temps de rétention (Tr) ainsi que par son rapport masse/charge (m/z) et par leurs fragments caractéristiques obtenus en spectrométrie de masse. La totalité des lipides détectés a ainsi pu être identifiée selon chaque classe lipidique, pour chaque étude. L'analyse du mélange de standards analytiques par HT-GC/MS en mode

d'ionisation chimique (IC) a permis la détermination des m/z majoritaires pour chaque classe lipidique (Tableau 6).

Tableau 6. Rapports masse / charge (m/z) majoritaires obtenus pour chaque classe lipidique des LCS, après analyse en HT-GC/MS, ionisation chimique (IC). M : masse moléculaire, TMS : groupement triméthylsilyl.

Classe lipidique		m/z de l'ion majoritaire (IC)	
Acides Gras Libres	<i>Saturés</i>	M+2	/
	<i>Insaturés</i>	M+1	[M+H] ⁺
Monoglycérides		M-89	[M-TMSiO] ⁺
Diglycérides		M-89	[M-TMSiO] ⁺
Triglycérides		M+18	[M+NH ₄] ⁺
Cires	<i>Saturées</i>	M+18	[M+NH ₄] ⁺
	<i>Insaturées</i>	M+1	[M+H] ⁺
Cholestérol		M-89 (m/z 369)	[M-TMSiO] ⁺
Esters de cholestérol		<i>Fragment - m/z 369</i>	[M-RCOO] ⁺
Squalène		M+1 (m/z 411)	[M+H] ⁺
		M+18 (m/z 428)	[M+NH ₄] ⁺
2,3-oxydosqualène (SqO)		M-17 (m/z 409)	[M+H-H ₂ O] ⁺
		M+1 (m/z 427)	[M+H] ⁺
		M+18 (m/z 444)	[M+NH ₄] ⁺
Squalène monohydroperoxyde (SqOOH)		M-72 (m/z 442)	[M+H-TMS] ⁺

b. Détermination des quantités relatives de chaque classe lipidique au sein de la totalité des LCS

Afin d'estimer la quantité relative de chaque classe de lipides, la normalisation par le coefficient de réponse a été utilisée³³⁴. En effet, les sensibilités correspondant aux analytes des différentes classes lipidiques sont différentes lors des analyses par spectrométrie de masse. Par conséquent, la réponse peut changer de manière significative d'une classe de lipides à une autre. Afin de s'affranchir de ces différences, un standard analytique représentatif de chaque classe de lipide a été analysé afin d'obtenir le coefficient de réponse (K) pour chaque classe. L'équation suivante a ensuite été appliquée : $C = K \times I$, où C est la concentration injectée de standard analytique représentation d'une classe lipidique, K est le

coefficient de réponse de la classe lipidique concernée. Cette normalisation a été appliquée à l'intensité maximale du pic du standard analytique, I. Ainsi, un composé de référence représentatif pour chaque classe lipidique de la peau a été choisi, analysé par HT-GC/MS, dans les mêmes conditions expérimentales que celles des échantillons étudiés, et utilisé pour calculer le coefficient de réponse (valeur K moyenne \pm SEM) de la classe. Les résultats ont été obtenus pour trois analyses sur 3 jours différents et sont présentés dans chaque étude. Une fois les lipides identifiés et associés à chaque classe lipidique correspondantes, les quantités relatives de chacune de ces classes ont pu être calculés pour chaque groupe étudié.

3. Traitement des données obtenues en NPLC/HR-MS

Les résultats obtenus grâce aux analyses réalisées par NPLC/HR-MS étant de haute résolution et représentant ainsi une quantité importante de données, un pré-traitement est nécessaire afin de réduire la matrice à analyser. Pour cela, différentes approches ont été développées et testées, seule la dernière approche retenue est détaillée ci-dessous. Pour une meilleure compréhension, l'approche a été en premier lieu appliquée sur 1 seul chromatogramme puis sera appliquée à la totalité des chromatogrammes obtenus.

1. **Chargement du/des chromatogramme(s)** (Figure 27)

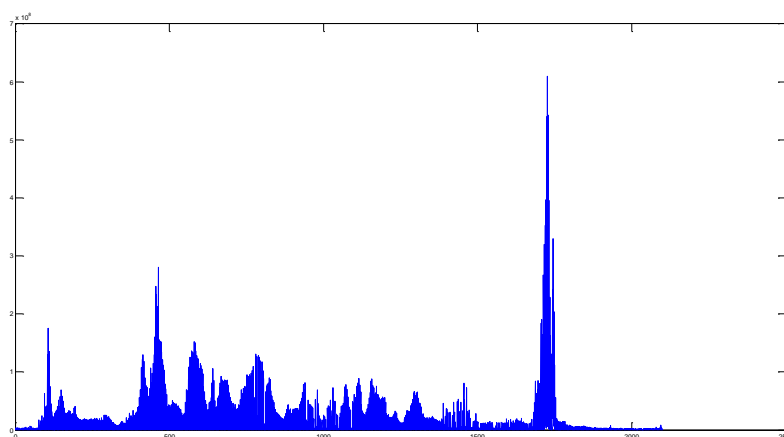


Figure 27. Pré-traitement NPLC/HR-MS, chargement du chromatogramme

Pour un seul chromatogramme, nous obtenons une matrice contenant 209901 m/z et 4210 temps de rétention (Tr) ($m/z \cdot Tr = 209901 \cdot 4210$).

2. Réduction de la taille des données :

- **1^{ère} étape de réduction** : suppression des m/z au début et à la fin du spectre de masse (afin de ne pas perdre d'information pertinente, le temps de rétention limite a été déterminé en fonction des analyses de chaque étude)

Taille des données après 1^{ère} réduction : 127999×4210 (m/z*Tr)

2^{ème} étape de réduction : conservation des valeurs utiles. Parmi les 4227 points que contient chaque chromatogramme, seulement 1 sur 6 a une valeur utile (représentées par une étoile rouge sur la Figure 28). Seuls les points correspondants aux sommets des pics sont conservés (Figure 29).

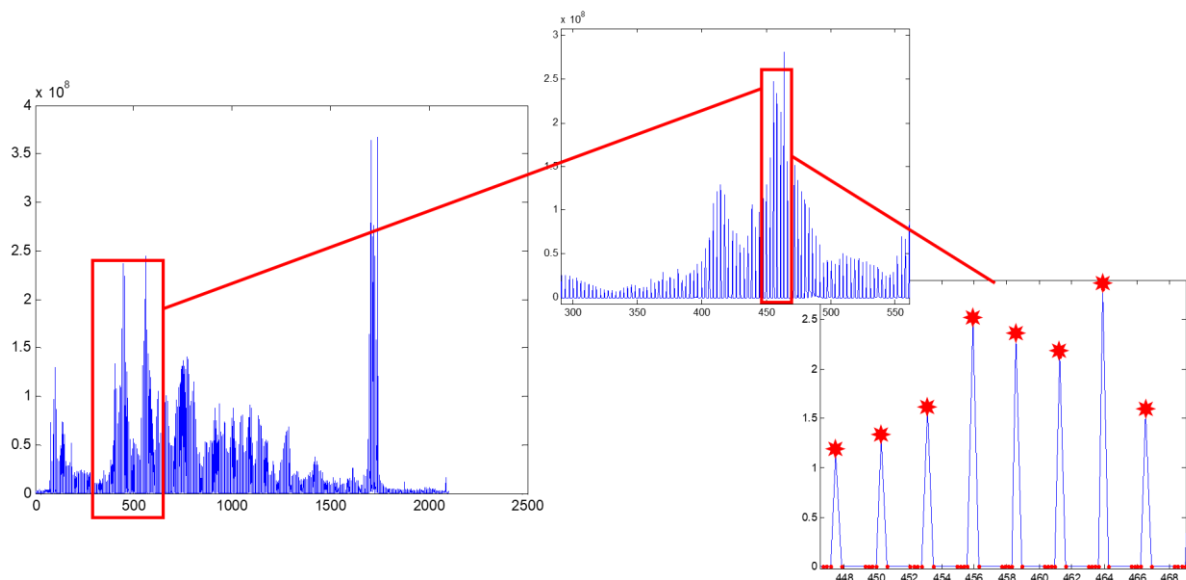


Figure 28. Pré-traitement NPLC/HR-MS, 2^{ème} réduction en conservant les valeurs utiles (représentées par les étoiles rouges)

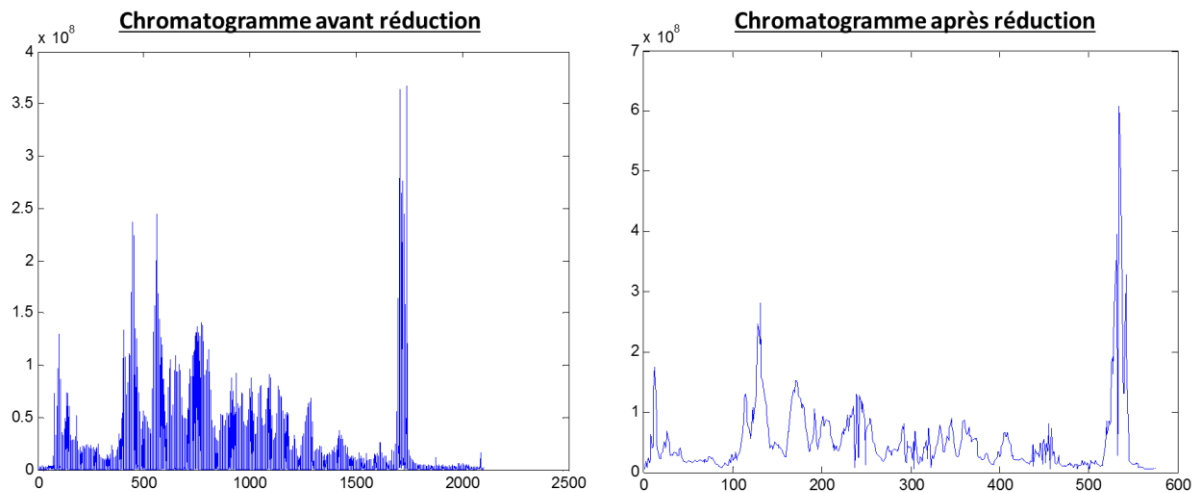


Figure 29. Pré-traitement NPLC/HR-MS, chromatogrammes obtenus avant et après la 2^{ème} réduction

Taille des données après la 2^{ème} étape de réduction : 127999*576 (m/z*Tr), soit 73727424 points.

- **3^{ème} étape de réduction** des spectres de masse :
 - 3a : Elimination par le seuil d'intensité au niveau de chaque point individuel. Un seuil d'intensité de $5 \cdot 10^3$ est fixé afin d'éliminer les points ayant une intensité trop faible (Figure 30).

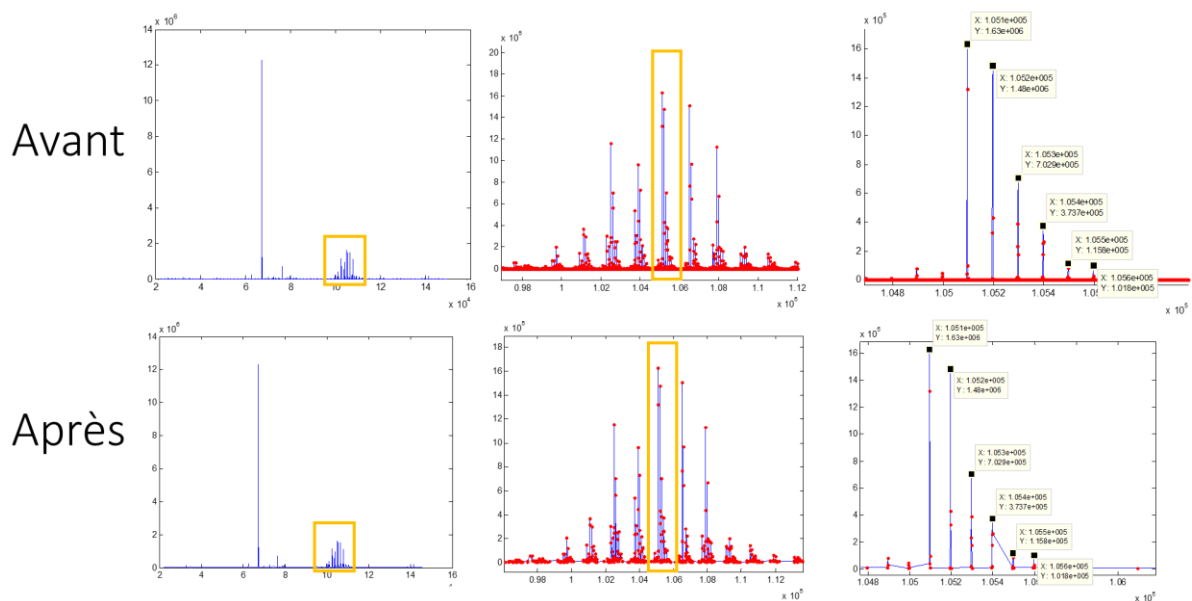


Figure 30. Pré-traitement NPLC/HR-MS, spectre de masse obtenus avant et après réduction par le seuil d'intensité (3a)

Taille des données après l'étape 3a de réduction : 1269*576 (m/z * Tr)

○ 3b : Elimination des isotopes

- La première étape consiste à éliminer les points au sein de chaque pic afin de ne garder que le sommet de chaque isotope (Figure 31).

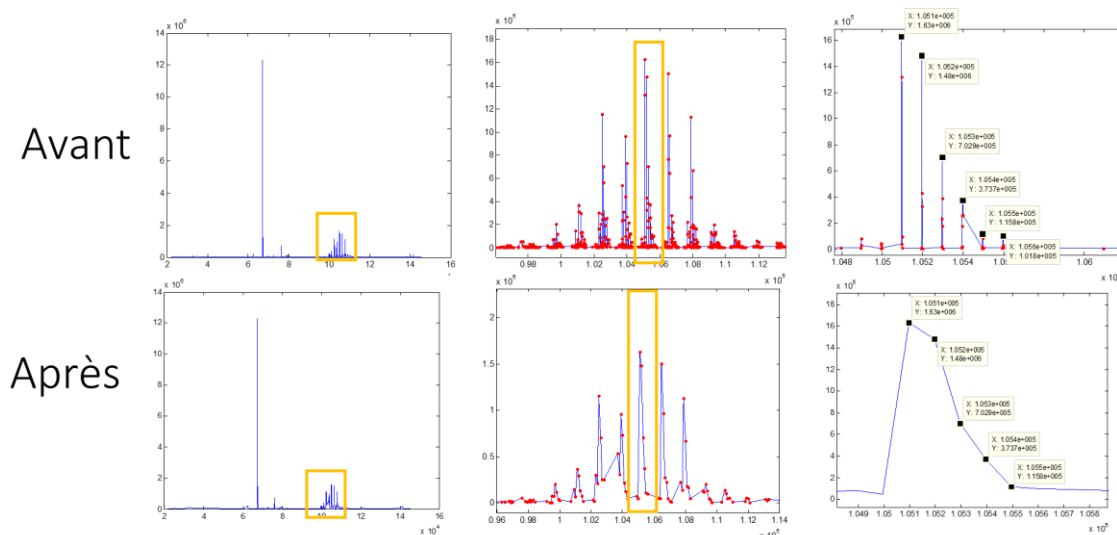


Figure 31. Pré-traitement NPLC/HR-MS, spectres de masse obtenus avant et après 1ère étape d'élimination des isotopes (3b)

- Une 2ème étape d'élimination des isotopes est nécessaire afin de ne conserver que le pic majoritaire (Figure 32).

Pour un affichage simplifié, les points conservés à la fin de cette réduction sont représentés en rouge sous formes d'étoile, sur un spectre de masse non réduit.

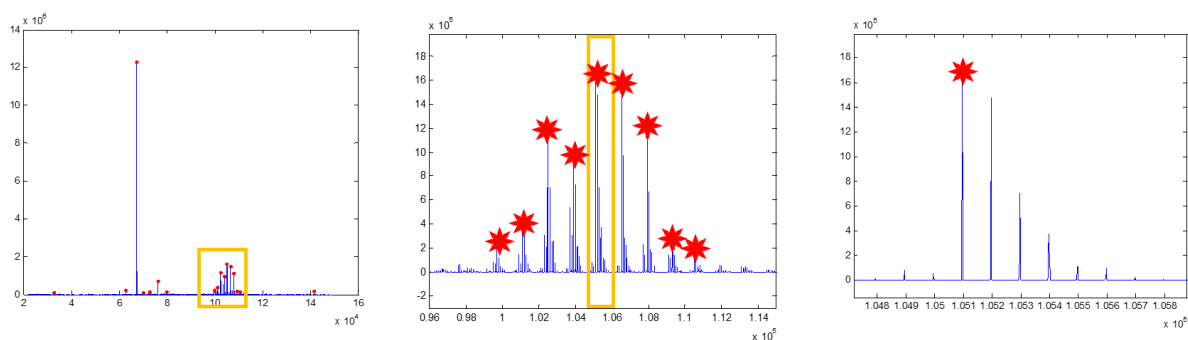


Figure 32. Pré-traitement NPLC/HR-MS, spectres de masse obtenus avant et après 2ème étape d'élimination des isotopes (3b)

A l'issue de cette étape, un vecteur m/z de référence (MZ-Ref) contenant tous les m/z retenus dans l'ensemble des chromatogrammes est créé.

3. Restructuration des matrices suivant le vecteur de référence (MZ-Ref) et le vecteur de temps de rétention de référence :

- Création de vecteur de référence pour les temps de rétention (TR-Ref) :

Pour créer le vecteur de tr référence, des valeurs tr uniques pour le début et la fin ont été identifiées pour l'ensemble des chromatogrammes.

Le vecteur TR-Ref est ensuite créé avec des incréments d'une seconde entre les temps de rétention de début et de fin.

- Création d'une matrice vide (zéros) avec les mêmes dimensions de MZ-Ref (nombre de lignes) et TR-Ref (nombre de colonnes) : (Empty-DataRef) (Figure 33).

		Tr ref						
		TR ₁	TR ₁ +1	TR ₁ +2	TR ₁ +3	Tr _{end}
MZ ref	800	0	0	0	0	0	0	0
	801	0	0	0	0	0	0	0
	..	0	0	0	0	0	0	0
	1403	0	0	0	0	0	0	0
	...	0	0	0	0	0	0	0
	...	0	0	0	0	0	0	0

Figure 33. Matrice de référence vide

- Ouverture et recalage des chromatogrammes à (Empty-DataRef) :

Les chromatogrammes sont ouverts individuellement et comparés aux valeurs MZ-Ref et Tr-Ref. Chaque chromatogramme est ainsi recréé en remplissant les éléments d'intersection dans la matrice Empty-DataRef (Figure 34).

Chromatogramme 1

		Tr ref					
		TR ₁	TR ₁ +1	TR ₁ +2	TR ₁ +3	...	Tr end
MZ ref	800		50		120		60
	801	85				89	
	..					852	
	1403		12				
	...						
	...						

Figure 34. Un exemple de chromatogramme restructuré

- Création d'une matrice de référence par incrémentation des intensités issues de l'ensemble des chromatogrammes :

A chaque ouverture et recalage d'un chromatogramme, ses valeurs d'intensité sont additionnées dans DataRef.

La matrice ainsi créée contient les intensités cumulées correspondant à tous les temps de rétention et m/z retenus (Figure 35).

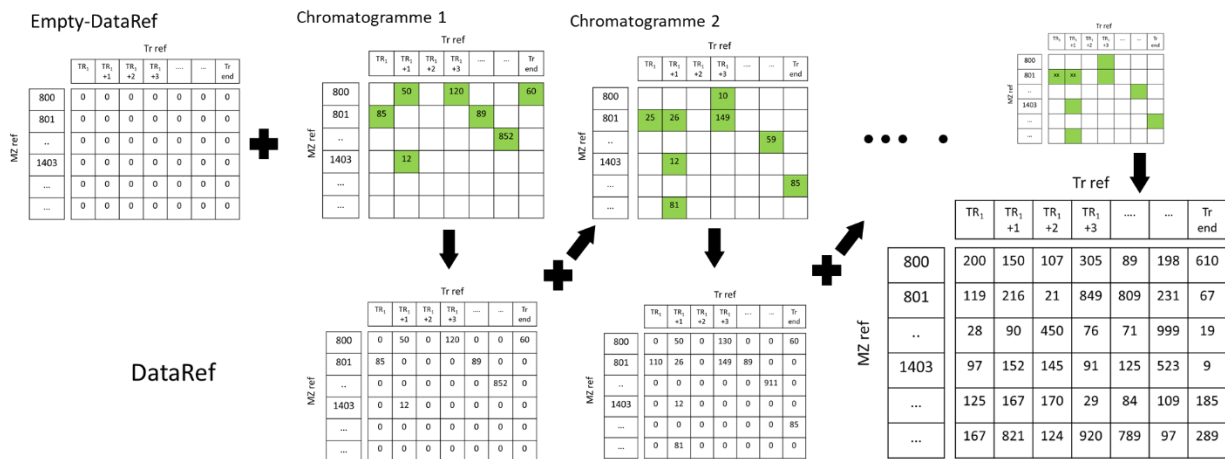


Figure 35. Incrémentation des intensités de l'ensemble des chromatogrammes pour créer la matrice de référence cumulée DataRef1

4. Correction des valeurs m/z de référence :

L'observation fine des valeurs des m/z issus des différentes mesures montre un décalage de 0.01 ou 0.02 entre certains pics. Ce décalage ne correspond pas à la présence de différents

fragments (dans nos configurations expérimentales) mais à un décalage lié à l'instrumentation.

Afin de corriger ces décalages nous avons procédé à :

- La création d'un super spectre de masse : il correspond, pour chaque m/z , à toutes les intensités issues de tous les temps de rétention de la matrice DataRef.
- En cas de décalage des valeurs de m/z , le choix de la valeur de référence se fait en utilisant la fonction findPeaks³³⁵. Le paramétrage de la fonction permet de limiter la sélection à des décalages de 0.02.

Les pics ainsi retenus constituent le nouveau vecteur de m/z de référence (MZ-Ref2)

5. Nouvelle restructuration des chromatogrammes en fonction de MZ-Ref2. Nouveau recalage et création d'une nouvelle matrice de référence (DataRef2)

- Une nouvelle matrice Empty-Data-Ref2 est créée et les chromatogrammes sont recalés à la nouvelle matrice.
- Ouverture séquentielle des chromatogrammes et recalage selon la démarche suivante :
 - En cas de décalage, chaque m/z est remplacé par la valeur de m/z de référence la plus proche.
 - En cas de présence de plusieurs m/z décalés de 0.01 ou 0.02 au même temps de rétention, leurs intensités sont additionnées au niveau de leur m/z de référence.
- Création de la nouvelle DataRef2 en additionnant les intensités de l'ensemble des chromatogrammes.

Cette étape permet un recalage des m/z et une réduction de la taille des matrices

6. Correction des décalages en temps de rétention (Tr) entre les différentes mesures.

- Détection des décalages en temps de rétention :
 - Ouverture de DataRef2

- Traçage séquentiel des profils chromatographiques pour chaque m/z de DataRef2
- En cas de décalage en temps de rétention correspondant à un m/z entre les différents chromatogrammes, le pic est plus large.
- Le temps de rétention retenu est celui correspondant au sommet du pic.
- Une nouvelle matrice de temps de rétention de référence (TR-Ref2) est créée.
- Au cas où un m/z apparaît à différents Tr : si l'écart entre les Tr est supérieur à 40 secondes, les deux valeurs de Tr sont retenues.
- Recalage des chromatogrammes au nouveau vecteur TR-Ref2.

Cette étape permet un recalage des tr et une réduction de la taille des matrices

7. Restructuration des chromatogrammes sous forme (m/z*Tr*intensité).

- Une matrice de temps de rétention (Tr) et de m/z est créée.
- Les chromatogrammes sont restructurés individuellement en associant les intensités correspondantes aux couples m/z*Tr.

8. Dernière réduction des matrices :

- Les couples m/z*Tr présents chez moins de 4 volontaires ne peuvent pas être intégrés dans les études statistiques et sont donc éliminés de l'ensemble des matrices.

A la fin de ces étapes de restructuration et de réduction, l'ensemble des chromatogrammes sont recalés et la réduction permet de diminuer la taille des matrices :

- ⇒ Taille de départ de l'ensemble des données : 209901 m/z * 4210 Tr * 60 chromatogrammes.
- ⇒ Taille de l'ensemble des données à la fin du prétraitement : 5823 couples m/z * Tr * 60 chromatogrammes.

9. Normalisation par l'étalon interne : chaque valeur d'intensité dans la matrice obtenue est normalisée par l'intensité de l'étalon interne.

A la suite de ce pré-traitement, une ANOVA (p-Value < 0.01) est ensuite réalisée afin de mettre en avant les m/z discriminants entre les différents groupes de sujets. Les spectres de masse correspondants nous permettront ensuite d'identifier les lipides associés.

4. Identification des lipides du SC, obtenus par NPLC/HR-MS

Après réalisation des analyses statistiques, les composés lipidiques significativement différents, plus particulièrement les sous classes céramidiques correspondantes ont été identifiés. Pour cela, nous nous sommes basés sur la masse moléculaire exacte (m/z) ainsi que sur la formule brute associée au composé. En raison de la grande complexité de notre mélange, comprenant des molécules ayant des structures très proches, nous n'obtenons pas une bonne séparation selon le temps de rétention (Tr). Plusieurs espèces moléculaires présentant la même formule brute mais appartenant à différentes sous-classes de céramides ont donc pu être observées à un temps de rétention identique au sein de nos échantillons. Dans ces cas précis, différentes hypothèses structurales ont été proposées pour chaque étude. En revanche, malgré la difficulté à déterminer la structure fine et la sous-classe exacte, les espèces moléculaires obtenues sont très proches (en nombre total de carbone, nombre d'insaturation et nombre d'estérification), ce qui nous a permis d'aboutir à une interprétation biologique cohérente.

5. Traitement des données obtenues en spectroscopie Raman

a. 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.

b. Détermination de l'épaisseur du *Stratum Corneum* à partir des profils Raman

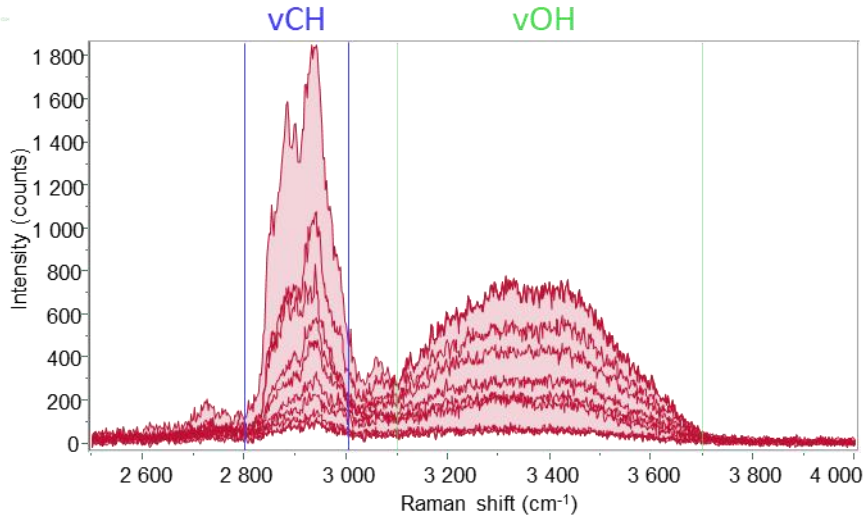


Figure 36. Profil en profondeur, région des hauts nombres d'ondes

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 (vOH) (Figure 36), comme décrit par Egawa *et al.*³¹³.

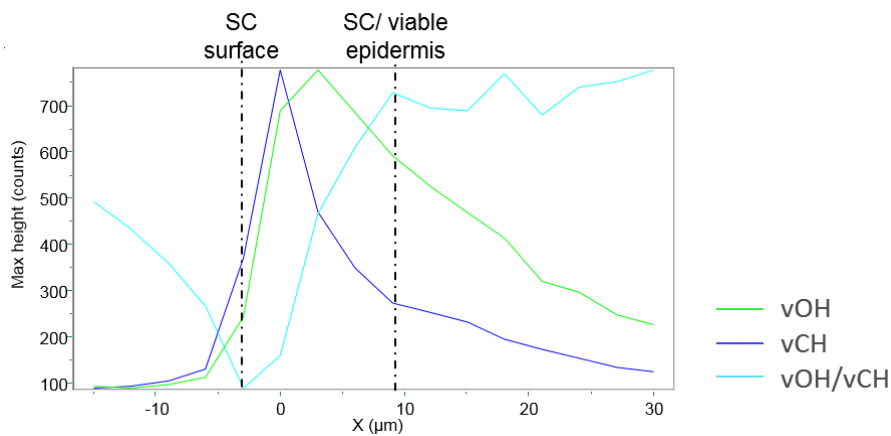


Figure 37. Evolution du rapport vOH/vCH en fonction de la profondeur

La limite supérieure du SC et l'interface entre le SC et l'épiderme viable peuvent être

déterminée en suivant l'évolution du rapport $\nu\text{OH}/\nu\text{CH}$, représenté en bleu clair sur la Figure 37. 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 », page 86.

Partie 3 : Travaux expérimentaux

Chapitre 1 : Impact du vieillissement sur la fonction barrière cutanée

Le vieillissement cutané, sujet d'intérêt majeur en raison de l'augmentation constante de l'espérance de vie de la population, est lié au vieillissement chronologique (intrinsèque) et au photo-vieillissement (extrinsèque). Les manifestations cliniques observées dans le vieillissement cutané sont liées à des phénomènes moléculaires complexes sous-jacents, intervenant dans les différentes couches de la peau. En effet, le vieillissement cutané provoque une altération des fonctions physiologiques cutanées au niveau épidermique et dermique et entraîne des changements pouvant être caractérisés aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire. Une étude multi-paramétrique intégrant différentes techniques innovantes et complémentaires a donc été mise en place, afin d'obtenir une évaluation des modifications liées à l'âge, notamment au niveau de la barrière cutanée. Cette étude réalisée *in vivo* comprend : i/ des mesures biométriques, ii/ des mesures de spectroscopie Raman *in vivo*, iii/ l'analyse des lipides cutanés de surface (LCS) après prélèvement *in vivo* du sébum et iv/ des analyses de la composition des lipides du SC après prélèvement *in vivo* également. Des traitements de données appliqués sur l'ensemble des résultats obtenus nous ont permis d'obtenir une caractérisation pertinente des adaptations de la fonction barrière cutanée chez les femmes âgées de plus de 70 ans.

D'autre part, cette étude, réalisée sur une population ayant la peau saine, nous a également permis de mettre en place et d'optimiser les différentes méthodes utilisées afin de les appliquer à l'étude d'une population ayant une peau pathologique (acné), dont les résultats seront détaillés dans la partie suivante.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications scientifiques, portant sur l'analyse des lipides cutanés de surface et sur les modifications de divers paramètres spectroscopiques obtenus en Raman, et sont présentés ci-dessous.

1. Article 1 : "Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age"

Contexte : L'importance du film hydrolipidique dans la fonction barrière cutanée a déjà été mise en évidence de nombreuses fois. Cependant, peu de données sont disponibles concernant la peau des personnes âgées de plus de 70 ans. L'objectif de notre étude était de caractériser l'évolution de la composition des lipides cutanés de surface (LCS) dans le cas du vieillissement cutané.

Matériels & Méthodes : Les données ont été recueillies sur le front de 40 femmes caucasiennes ayant la peau saine : 22 femmes âgées entre 18 et 24 ans, et 18 femmes âgées en 70 et 75 ans. La quantité de sébum présente à la surface de la peau a été obtenue par sébumétrie. Afin d'obtenir des informations pertinentes sur la composition moléculaire du mélange très complexe que représente les LCS, ils ont été analysés grâce à une méthode de chromatographie gazeuse à haute température, couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode nous a permis d'analyser la totalité des lipides contenus dans notre mélange, tout en gardant la totalité des structures lipidiques intactes.

Résultats : Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer une diminution de l'activité sébacée chez les personnes âgées, et de mettre en évidence une évolution importante et significative de la composition des LCS. En effet, une diminution significative de l'intensité des principaux composants des LCS a été observée. Cependant, nous avons montré, pour la première fois, une augmentation de l'intensité du 2,3-oxidosqualène (SqO) dans les LCS avec l'âge. Nous avons également remarqué une relation inverse entre les triglycérides et leurs produits d'hydrolyse, pouvant être le témoin d'une augmentation de l'hydrolyse des triglycérides chez les femmes de plus de 70 ans.

Conclusion : Des adaptations majeures de la peau des seniors ont été mises en évidence au niveau du film hydrolipidique et notamment de la composition de celui-ci. Les variations adaptatives concernant le 2,3-oxidosqualène ainsi que les triglycérides et leurs produits d'hydrolyse pourraient évoquer un lien avec des modifications de l'activité enzymatique et

un éventuel changement d'activité de la microflore cutanée. En revanche, contrairement aux effets provoqués par les squalène monohydroperoxydes (SqOOH), aucune information n'est actuellement disponible sur les éventuels effets du SqO sur la peau. Son étude pourrait présenter un intérêt majeur dans la compréhension des modifications cutanées observées chez les sujets âgés.

Aline RIGAL¹
Rime MICHAEL-JUBELI¹
Armelle BIGOURET²
Alex NKENGNE²
Dominique BERTRAND³
Arlette BAILLET-GUFFROY¹
Ali TFAYLI¹

¹ "Lipides: Systèmes Analytiques et Biologiques" Lip(Sys)² interdisciplinary unit, Faculty of Pharmacy, University of Paris-Sud, Châtenay-Malabry 92290,
² Clarins Laboratories, Pontoise 95300,
³ data_frame, Nantes 92290, France

Reprints: Rime Michael-Jubeli
<rime.michael-jubeli@u-psud.fr>

Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age

Background: The importance of the hydrolipidic film of skin has been well documented, however, few data are available in cases of very old age. **Objectives:** Our aim was to characterize the difference in skin surface lipid (SSL) composition between individuals of different age groups. **Materials and Methods:** Data were collected from the forehead of 22 young volunteers (18-24 years old) and 18 senior volunteers (70-75 years old). The amount of sebum was obtained by sebumetry. To acquire relevant information about the molecular composition of high complex mixtures, SSLs were analysed in a single run to ensure that the lipid structures remain intact, using high-temperature gas chromatography coupled with mass spectrometry. The major features associated with aged skin were documented. **Result:** In aged skin, a lower sebum content was observed, together with modification of the relative SSL composition involving a significant reduction in the intensity of many components of the hydrolipidic film. In contrast, the intensity of 2,3-oxidosqualene was shown to increase with an inverse relationship between triglycerides and their hydrolytic products. **Conclusion:** These adaptations could be related to modifications of enzymatic activity.

Key words: skin surface lipids, skin aging, 2,3-oxidosqualene, lipidomic, HTGC/MS, chemometric data treatment

Article accepted on 19/12/2019

Introduction

Covering the stratum corneum, the hydrolipidic film is the ultimate barrier with the external environment. It is composed of sweat and skin surface lipids (SSLs). Recently, several studies have focused on a better understanding of their barrier roles and they attributed to it a primordial role in the cutaneous barrier function, reinforcing the role of the stratum corneum¹⁻⁴.

SSLs contain a mixture of nonpolar lipids, with epidermal and sebaceous origin⁵: triglycerides (20-60%), wax esters (23-29%), squalene (10-14%), free fatty acids (5-40%), small amounts of cholesterol and cholesterol esters (1-5%) and diglycerides (1-2%)⁶⁻⁸. Various methods of sampling and analysis have been used to characterize SSLs composition. The use of different methods explains the significant variations in percentages obtained in the compositions that have been reported⁶⁻⁸. A method previously developed in our team allowed to characterize more than 200 compounds⁹ in one run, while keeping the structural integrity of the compounds. This method also allowed to obtain a qualitative characterization of the individual SSLs compounds and a quantitative evaluation of the lipid classes.

Among the essential lipids in SSLs, squalene (SQ) represents a very interesting compound, implicated in defensive mechanisms and skin disorders, like acne, observed only on human among all other mammals^{10, 11}. Because of its chemical structure with an elevated number of unsaturated sites, it represents a sensitive target of peroxidation reactions, wherein squalene monohydroperoxide (SQOOH) is the primary oxidation product¹².

Squalene, under ultraviolet radiation, is readily oxidized to form SQ hydroperoxides and SQ epoxides¹³. These mechanisms with photo-oxidizer have been well studied and confirmed that the amount of SQOOH was increased under ultraviolet exposure and leads to the production of six SQOOH isomers after squalene oxidation¹³⁻¹⁶. However, few studies have examined other squalene oxidation products like squalene hydroxides and squalene epoxides^{13, 15}. While the potential effects on the skin are documented for SQOOH on animals skin¹⁷⁻¹⁹, this is not the case for other oxidation products.

Although the role of squalene hydroxides and epoxides is currently unknown, squalene is known to have an important link in metabolic pathways. Generally, it is known for its antioxidant capability, to improve the immune system, to modulate the lipid profile in the human body, and it is also known for its ability to protect skin²⁰. For example, the preservation of physiological concentrations of squalene is presented as a strategy for the management and prevention of skin photo-damages¹⁰.

Skin lipids, including squalene, contribute to normal skin functions, too many diseases like acne²¹⁻²⁴, atopic dermatitis²⁵⁻²⁷ but also to aging²⁸⁻³², which have been studied at the level of the stratum corneum, but still little at the level of the SSLs composition. Several studies have previously shown that the rate and composition of SSLs vary according to age, especially for wax esters³³, and for free fatty acids³⁴. On the other hand, Shetage *et al.*³² did not show any significant differences in the quantity of SSLs based on age.

Our study aimed to characterize the entire composition of SSLs in the case of skin aging, using HT-GC/MS, combined with chemometric techniques, on Caucasian women over 70, compared to Caucasian women aged between 18 and 24.

Materials and methods

Volunteers

This study was performed in agreement with the Helsinki Declaration, and the written informed consent has been established from each volunteer. 2 groups of healthy Caucasian women were enrolled: 22 young volunteers aged between 18 and 24 years (mean $21,8 \pm 0.35$); 18 old volunteers aged between 70 and 75 years (mean $72,1 \pm 0.38$). All subjects were non-smokers, presented Fitzpatrick's skin types between I and III, and Body Mass Indexes lower than 27. No skincare product was applied to the face, and this site was not washed with soaps or surfactants for at least 24 h prior to the study. The volunteers did not expose their skin to sun or UV during 3 weeks before the study. No drug treatment (systemic or topical) that might be interfere in the study was used by volunteers.

Environmental conditions and sebum measurements

After an acclimation time of 20 min in an environmental controlled room ($22.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, $43 \pm 1\% \text{RH}$), the surface sebum content was measured on the forehead, using sebumeter SM815 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Köln, Germany). To minimize the intra-individual variation, the sebum content values represent the mean of 3 adjacent measurements.

Chemicals and lipids collection materials

Isooctane, palmitic acid, monostearin, dipalmitin, tripalmitin, cholesteryl palmitate, arachidic acid lauryl ester, squalene, 2,3-oxidosqualene, cholesterol, 1-eicosanol, pyridine and N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Diethyl ether was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Lipid-free absorbent papers (7cm x 3cm) were purchased from Rizla UK Ltd. (Rizla+ silver ultra-thin, Pontypridd, South Wales, UK). Elastic tubular nettings (size 6, Surgifix, URGO®), were purchased from Medisafe+ (Bassussary, France).

Lipids collection

SSLs were collected from the forehead. A lipid-free absorbent paper was maintained on the

forehead for 30 min, using an elastic tubular net around the head, and then removed with tweezers and introduced into a closed vial. This step was repeated four times, and then stored at -20°C until lipids extraction.

After adding 220µL of a solution containing the internal standard (1-Eicosanol in isooctane at 0.3mg/mL), lipids were extracted from the absorbent paper, three times with 10mL of diethyl ether. The extracted sample was concentrated by evaporation under a gentle stream of nitrogen, then transferred into a 2mL vial, and dried. The dry extract was stored at -20°C until derivatization and analysis.

Derivatization of SSLs

The trimethylsilylation reagent consisted of BSTFA/Pyridine, 50:50 (V/V). The dry extract was trimethylsilylated at room temperature, for 30 min, with 200µL of reagent. The excess reagent was then removed using rotary evaporation at 30°C, and the dried residue was dissolved in 400µL of isooctane. The solution was directly injected (1µL).

Gas chromatography-mass spectrometry

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 as described by Michael-Jubeli et al. ⁹, using a 30m x 0.32mm Optima-5HT capillary column (Macherey-Nagel) coated with 0.1µm of 5% phenyl / 95% methylpolysiloxane, connected to a 10m 0.32mm HT-deactivated tubing guard column. Helium was used as a carrier gas with a constant flow of 2mL/min. The injector and transfer line temperatures were set to 80°C and 250°C respectively. The oven temperature was programmed from 80°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. Chemical ionization (CI) mass spectra were recorded in the total ion current (TIC). The operating conditions for CI-MS were source temperature at 250°C, ionizing energy 120 eV, and scan range from m/z 230 to 1000 with a period of 1 s, and ammonia was used as a reagent gas at 1 mL/min constant flow. The order of samples analysis was random. The method reproducibility was checked throughout the study by analyzing a

test sample once every 3 days. For identification, EI-MS analyses were performed on standard mixture and test sample, collision energy was 70eV. The raw numerical results were given by the GC/MS software (Xcalibur®).

Data analysis

The analytical method used allows us to separate and identify SSLs in one run, keeping lipid structures intact. However, we observe a recovery for some lipid classes (Fig. 1). In order to avoid miss-assignment, data preprocessing and statistical analysis were performed by using Matlab® software (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts).

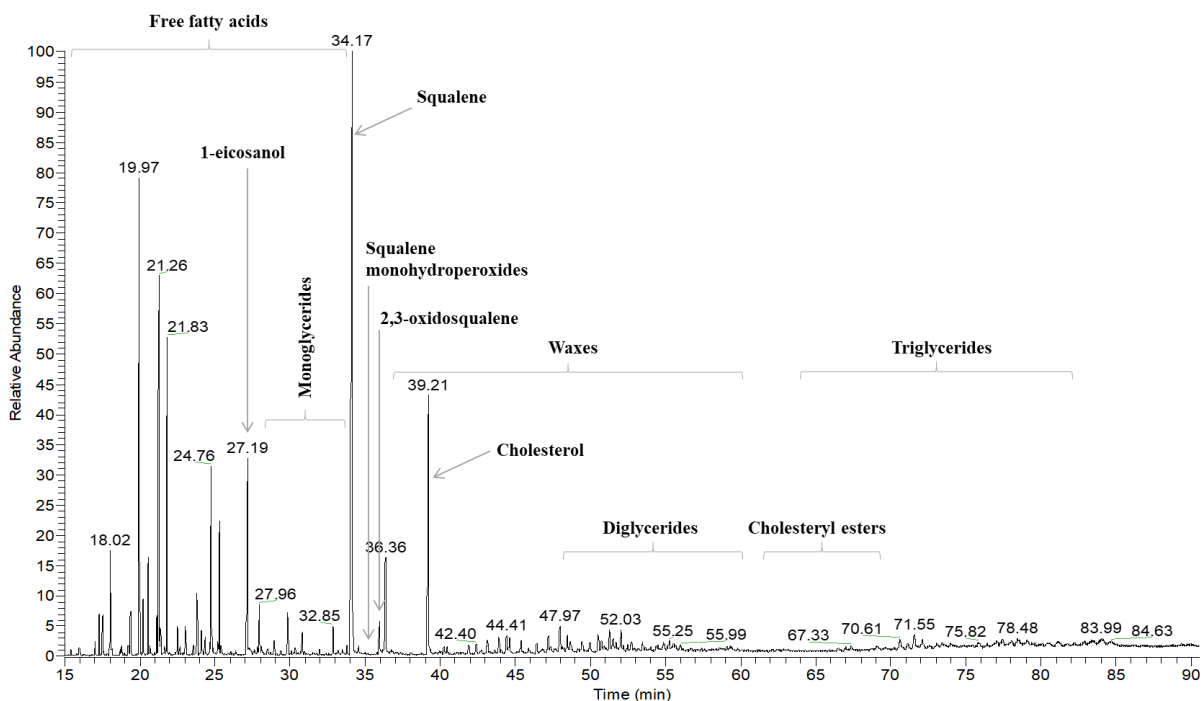


Figure 1. HT-GC-MS profile (CI-MS) of trimethylsilylated SSLs sample collected from the forehead of an elderly volunteer.

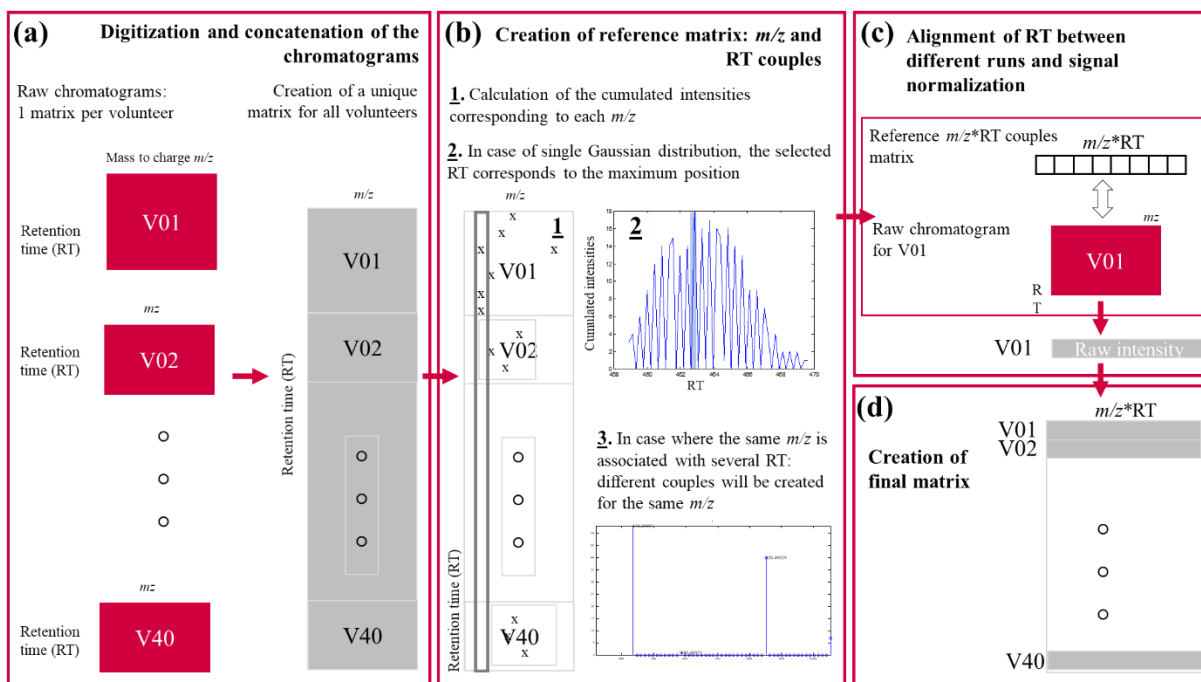


Figure 2. Pre-processing steps of data analysis.

In order to obtain a final matrix containing the data to be analyzed, the following preprocessing steps were performed (Fig. 2):

- **Digitization and concatenation of the chromatograms³⁵ (Fig. 2a):**

Chromatograms issued from measurements on samples from all 40 volunteers are converted into Matlab structure and concatenated into a unique global matrix.

- **Creation of reference matrix: determination of reference couples (mass-to-charge ratio (m/z) and retention time (RT) values) (Fig. 2b):**

Each m/z cumulated intensities are calculated (Fig. 2b.1). An intensity histogram is obtained for each value m/z . In the case of a single Gaussian (corresponding to a single zone of RT), the representative zone is identified by the RT corresponding to the maximum position in the Gaussian. The m/z *RT couple is thus identified (Fig. 2b.2). In the case where the same m/z is associated with several retention times, the time zones are identified separately, and several reference positions are assigned to the same value of m/z : different m/z *RT couples are created (Fig. 2b.3). A matrix of reference m/z *RT couples is thus created.

- **Alignment of retention time shifts between different runs (Fig. 2c):**

Non-preprocessed "Unreduced" chromatograms are reloaded individually and compared to the reference matrix. The comparison is done by scrolling the reference matrix according to m/z values. Each chromatogram contains a m/z *RT couple corresponding to 1-icosanol

($m/z = 372$), used as internal standard. The intensity of each compound (m/z *RT couple) is divided per the m/z *RT couple intensity corresponding to 1-icosanol, to obtain the raw intensity of each compound.

- **Final matrix creation (Fig. 2d):**

All aligned and reduced chromatograms are concatenated. Each chromatogram is represented as a line in the created matrix and the set of new chromatograms is represented in a single matrix.

In order to analyze the evolution of SSLs between young and elderly volunteers, each lipid was individually identified by its " m/z *RT" couple, then assigned to a lipid class. Mean intensities of all lipids individually identified and mean integrated intensities for lipid classes were calculated for each age group. Significant variations were highlighted by a single-factor ANOVA (p -Value < 0.05).

Proportion of lipid class in SSLs

Each lipid class proportions in the total amount of SSLs was estimated using the normalization with response coefficients³⁶. The sensitivities corresponding to analytes of different lipid classes are different in mass spectrometry analysis. This limitation can be removed by running one representative standard per class to obtain the corresponding response coefficient (K), using the equation $\mathbf{C} = \mathbf{K} \times \mathbf{I}$, where C is the injected concentration of class representative standard, K is the response coefficient of the studied class, I is the peak intensity of the representative standard.

One reference compound representative for each class was analyzed with the same experimental conditions as those for samples, and used to calculate K (mean \pm SEM) of the corresponding class. Results were obtained for three analyses on different days (Table 1).

Table 1. Response coefficients (K) associated with each lipid classes, obtained by HT-GC/MS analysis of analytical standards.

Lipid class	Standard	Chemical formula	K (mean \pm SEM)
Free Fatty Acid	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.660 \pm 0.097
Monoglyceride	1-Monostearin	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	0.865 \pm 0.019
Hydrocarbure	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	3.396 \pm 0.293
Hydrocarbure epoxide	2,3-oxidosqualene (squalene epoxide)	C ₃₀ H ₅₀ O	5.392 \pm 0.666
Sterol	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	0.641 \pm 0.049
Wax	Arachidic Acid Lauryl Ester	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	4.273 \pm 0.631
Diglyceride	Dipalmitin	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	2.485 \pm 0.092
Steryl ester	Cholesteryl Palmitate	C ₄₃ H ₇₆ O ₂	2.562 \pm 0.215
Triglyceride	Tripalmitin	C ₅₁ H ₉₈ O ₆	30.144 \pm 6.200

Results and discussion

Effect of age on sebum content

Sebum values obtained by sebumeter on the forehead of young and elderly volunteers were $83.36 \pm 12.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $40.55 \pm 7.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively (Fig. 3).

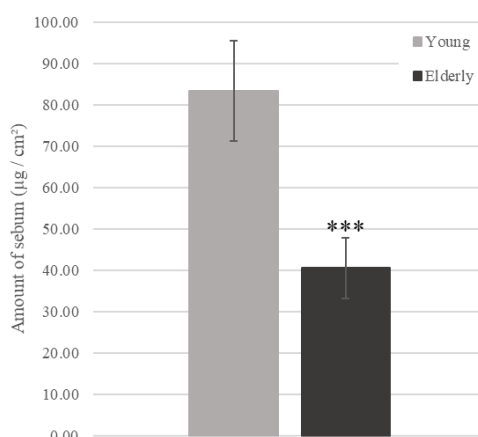


Figure 3. Evolution of sebum amount: components present in the hydrolipidic film at the skin surface of the forehead (mean \pm SEM) for young (n=22) and elderly (n=18) volunteers (ANOVA, ***p<0.01).

This decrease in sebum amount at the skin surface of the forehead for women aged over 70 is consistent with the results obtained on a Chinese and Caucasian women^{37, 38}. However,

the results obtained by other teams can be different and sometimes contradictory^{39, 40}. Marrakchi *et al.*³⁹ showed that the sebum content on the forehead was higher but non-significant for older people than for young people³⁹. These results could be explained by the heterogeneity of the studied populations and by the variation in the experimental conditions. Wilhelm *et al.*⁴⁰ showed a non-significant decrease in sebum content in an heterogeneous panel (men and women) of old subjects compared to young subjects. However, as explained by Abdallah *et al.*⁴¹, the sebum production is significantly higher among men in comparison to women, which could explain the difference between these work results and ours.

In addition, many studies have shown that sex hormones like testosterone, and some of these metabolites influence the sebum production^{7, 42, 43}. Ohta *et al.*⁴⁴ have shown that sebum content decreases significantly on the forehead of menopausal women, suggesting that the variation of the sebum amount observed with age is mainly related to a change in hormone levels.

Effect of age on 2,3-oxidosqualene and major SSL classes

The reduction of the global amount in sebum production was observed, in a specific manner, for SSLs analyzed by HT-GC/MS.

Fig. 4 represents the raw intensity averages of each lipid classes obtained for young and elderly volunteers.

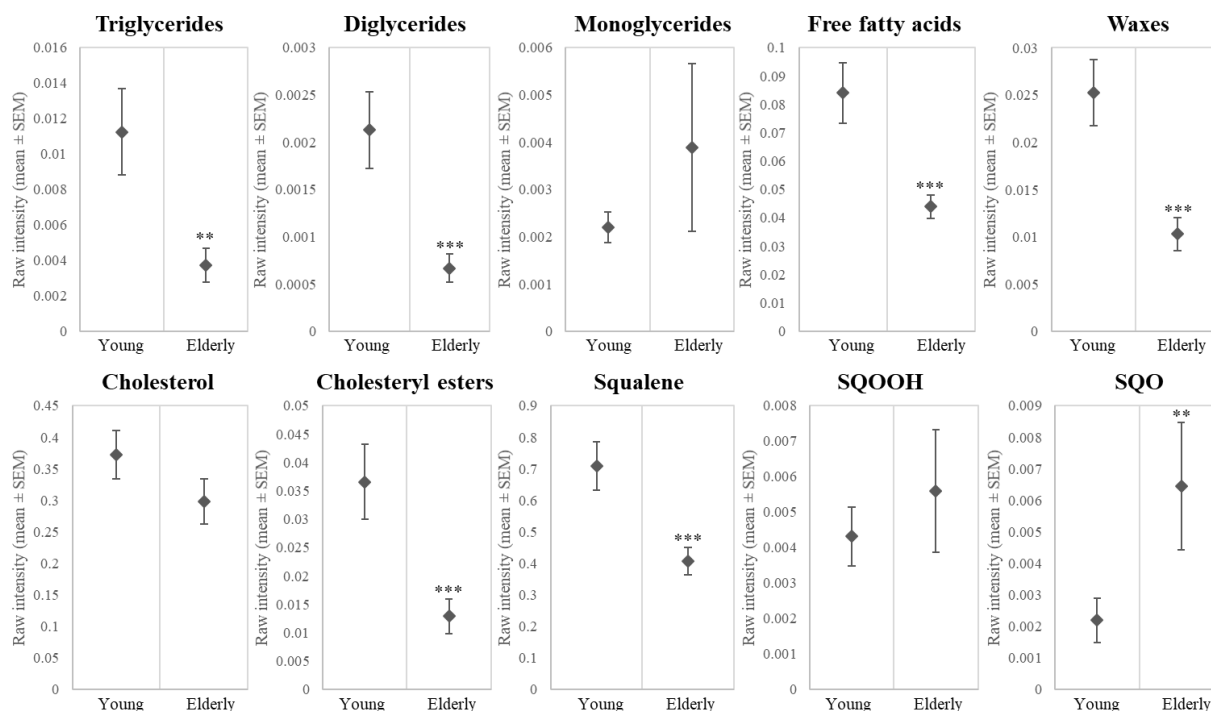


Figure 4. Evolution of the raw intensity (mean ± SEM) of each lipid class for SSLs collected from the forehead of young (n=22) and elderly (n=18) volunteers. SQO, 2,3-oxidosqualene; SQOOH, squalene monohydroperoxide (ANOVA, **p<0.05, ***p<0.01).

The 2,3-oxidosqualene, a product of squalene oxidation, was identified and compared to the analytical standard (Fig. 5). The obtained mass spectrum confirmed this identification with m/z 409, 427 and 444 corresponding to $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ respectively.

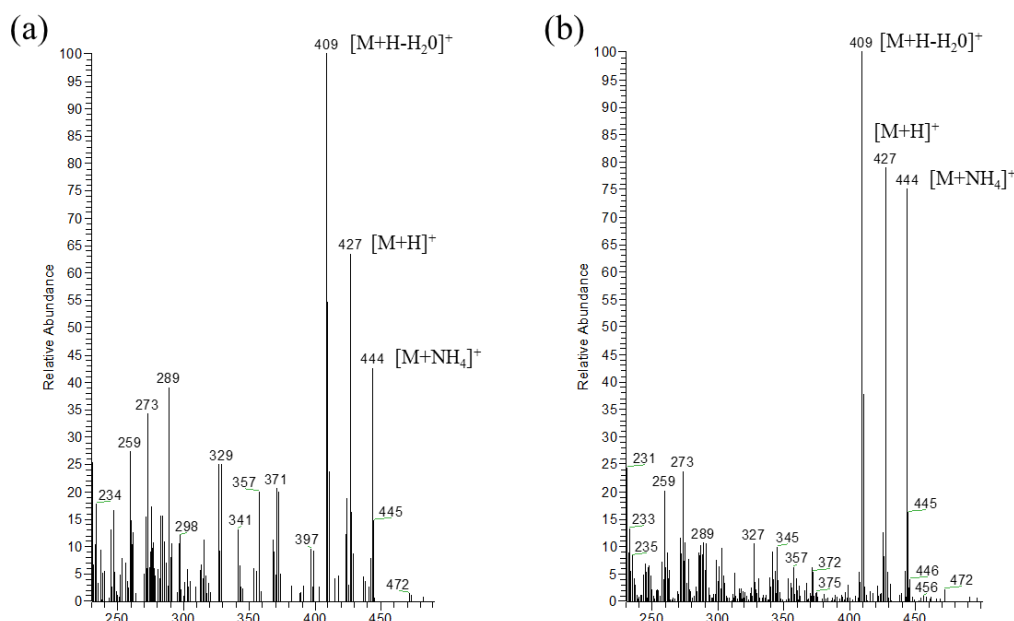


Figure 5. Mass spectra of 2,3-oxidosqualene, analyzed in HT-GC/MS with chemical ionization, in the mixture of analytical standards (a) and in elderly volunteer sebum sample (b).

The significant decrease of most of SSLs compounds is concordant with sebumeter measurements showing a significant decrease in the sebum level on skin surface (Fig. 3). We observed a significant decrease of triglycerides, diglycerides, free fatty acids, waxes and cholesteryl esters (Fig. 4). The squalene raw intensity, widely used as sebaceous activity marker¹⁰, also decreases significantly with age. Its raw intensity is respectively 1.3468 ± 0.1472 and 0.7772 ± 0.0781 for young and elderly (Fig. 4). The decrease in free fatty acids and squalene levels were also observed by Hayashi *et al.*¹⁴ on elderly (83.7 ± 9.4 years) compared with young volunteers (22.2 ± 3.9 years). Our results did not show any significant differences for cholesterol, monoglycerides and squalene monohydroperoxide (SQOOH). In contrast to squalene content decrease, we have observed a significant increase in the raw intensity of 2,3-oxidosqualene (SQO) of the elderly (Fig. 4). The 2,3-oxidosqualene raw intensities was respectively 0.0022 ± 0.0007 and 0.0064 ± 0.0020 for young and elderly. The explanation of this increase may be related to the exposure of sebum to the highly pro-oxidative environment. Applied to squalene, the different lipid oxidation mechanisms⁴⁵ can lead to different specific compounds. Squalene is a triterpene that comprises six non-conjugated double bonds, making this compound one of the most unsaturated lipids, highly prone to oxidization process⁴⁶.

The most known oxidation mechanisms are the singlet oxygen oxidation and the free radical chain oxidation. The singlet oxygen oxidation is carried out with the major type of ROS, produced on the skin surface: $^1\text{O}_2$ which is generated by a photosensitizing reaction with UVA and porphyrins from bacterial flora living in the skin¹⁷. UV radiations can also cause a free radical chain oxidation, mainly represented at the skin surface. These two types of oxidation yield a mixture of six squalene monohydroperoxide isomers (SQOOH) and other compounds^{15, 16}. Shimizu *et al.*¹⁵ have recently shown that these two oxidation routes led to different levels of isomers. Indeed, the singlet oxygen oxidation leads to a similar amount of the six SQOOH isomers and presumably squalene dihydroperoxide, while the free radical oxidation mainly forms two types of isomers (2-SQOOH and 3-SQOOH), other SQOOH isomers being in lesser amounts. This oxidation also produces 2,3-oxidosqualene or squalene hydroxide.

An additional route of oxidation, the enzymatic oxidation or the non-radical oxidation, can lead to the formation of 2,3-oxidosqualene (SQO)¹⁰. As mentioned by Camera *et al.*¹⁰ 2,3-oxidosqualene can be formed enzymatically by mammalian or fungal squalene monooxygenase. However, the partial activity of the squalene monooxygenase could explain the detection of low 2,3-oxidosqualene in sebum¹⁰.

Our results did not show any differences between the SQOOH rates by age (Fig. 4) as observed by Hayashi *et al.*¹⁴. In their study¹⁴, they did not show any differences in the levels of singlet oxygen-induced oxidation products between the younger and older groups without ultraviolet radiation. These results suggest that singlet oxygen and free radical chain oxidation are not predominant at the skin surface without ultraviolet radiation.

To the far to our knowledge, this is the first time that a significantly increase in the intensity and proportion of 2,3-oxidosqualene in the SSLs of women over 70 is shown (Fig. 4). Thus, this increase could be due to a higher activity of squalene monooxygenase¹⁰ and may be related to a change in the activity of the microbiota. Nevertheless, the role played by enzymes from the cutaneous microflora in the processing of human squalene oxidation has been little investigated, and very little information is currently available.

This increase of the squalene epoxidation may also be due to the decrease of lipophilic antioxidants. In addition to the decrease in squalene content, a significant reduction of tocopherol (vitamin E) and Coenzyme Q10, both antioxidants, was observed with aging, on the upper chest⁴⁷.

Effect of age on the proportions of lipid classes and hydrolysis of triglycerides.

Human SSLs mainly consisting of TG and their hydrolysis products (FFA, MG, and DG) and glycerol^{8, 47}, the study of these components could provide information on SSLs hydrolysis. Moreover, the hydrolysis of triglycerides being commonly related to lipases of the resident microflora^{8, 47}, the study of triglycerides and their hydrolysis products could provide additional information on microbiota activity. We therefore studied the proportions of triglycerides, diglycerides, monoglycerides and free fatty acids within the entire hydrolipidic film, compared in young and old skin.

The sensitivities corresponding to the different lipid classes being very different in mass

spectrometry analysis, each lipid class was corrected by its response coefficient for the internal standardization. This allowed us to study the proportions (%) represented by each lipid class within the entire hydrolipidic film and to evaluate possible modifications in these proportions.

Since the physiological evolutions for the other classes are not related to the physiological changes in hydrolysis and microbiota activity, only the results concerning TG, FFA, MG and DG are presented (Table 2).

Table 2. Mean (\pm SEM) percentages of TG and his hydrolysis products: FFA, MG, DG, in total hydrolipidic film for young and for elderly volunteers. TG, triglycerides; FFA, free fatty acids; MG, monoglycerides; DG, diglycerides.

	TG (%)	FFA (%)	MG (%)	DG (%)
Young	46.579 \pm 2.715	22.470 \pm 1.922	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001
Elderly	39.220 \pm 2.119	27.889 \pm 2.013	0.018 \pm 0.007	0.004 \pm 0.0003
<i>p-Value (ANOVA)</i>	<i>0.05</i>	<i>0.06</i>	<i>0.03</i>	<i>0.25</i>

Our results presented in Table 2 show the inverse relationship between triglycerides and their hydrolysis products (FFA, MG, and DG) percentages, with a decrease of the TG level, and an increase in FFA and MG levels in elderly women, compared to younger volunteers. In accordance with other studies^{8,47}, this could be due to an increase in TG hydrolysis with age, which could also reflect a modification of the microflora for older skin. Thus, in view of this conclusion, the increase of 2,3-oxidosqualene following a possible modification of the skin surface microbiota activity on elderly deserves to be explored.

Conclusion

This study confirms a decrease of the sebaceous activity for the elderly, with an important and significative evolution in the composition of SSLs. Interestingly, despite the global decrease in lipids amount, the 2,3-oxidosqualene content increased with age. Indeed, triglycerides hydrolysis appears to be increasing for women over 70 years old. These

adaptative variations could be related to modifications of the enzymatic activity, which may be linked to changes in the activity of the microflora. SQOOH are known to accumulate on human skin and can cause skin changes on animal skins, like hyperpigmentation¹⁷, the formation of wrinkles¹⁹ and comedogenic effect¹⁸. Up to date, no information is available on the effects of SQO.

Disclosure: *Conflicts of interest: none.*

References

1. Fluhr JW, Mao-Qiang M, Brown BE, Wertz PW, Crumrine D, Sundberg JP, et al. Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;120(5):728-37.
2. Mavon A, Zahouani H, Redoules D, Agache P, Gall Y, Humbert P. 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):147-55.
3. Pilgram G, Van der Meulen J, Gooris G, Koerten H, Bouwstra J. The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2001;1511(2):244-54.
4. Choi EH, Man MQ, Wang F, Zhang X, Brown BE, Feingold KR, et al. Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans? *Journal of General Internal Medicine*. 2005;20(5):288-93.
5. Greene RS, Downing DT, Pochi PE, Strauss JS. Anatomical Variation in the Amount and Composition of Human Skin Surface Lipid. *Journal of Investigative Dermatology*. 1970;54(3):240-7.
6. Downing DT, Strauss JS. Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1974;62(3):228-44.
7. Stewart ME, Downing DT, Cook JS, Hansen JR, Strauss JS. Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls. *Archives of dermatology*. 1992;128(10):1345-8.
8. Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermato-endocrinology*. 2009;1(2):72-6.
9. Michael-Jubeli R, Bleton J, Baillet-Guffroy A. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling. *Journal of lipid research*. 2011;52(1):143-51.
10. Camera E, Ottaviani M, Picardo M. Squalene chemistry and biology. *Lipids and Skin Health: Springer*; 2015. p. 185-98.
11. Pappas A, Johnsen S, Liu J-C, Eisinger M. Sebum analysis of individuals with and without acne. *Dermato-Endocrinology*. 2014;1(3):157-61.
12. Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S-i, Takahashi M, Mukai K. Kinetic study of

- quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1995;1256(1):52-6.
13. Mountfort KA, Bronstein H, Archer N, Jickells SM. Identification of oxidation products of squalene in solution and in latent fingerprints by ESI-MS and LC/APCI-MS. *Analytical Chemistry*. 2007;79(7):2650-7.
14. Hayashi N, Togawa K, Yanagisawa M, Hosogi J, Mimura D, Yamamoto Y. Effect of sunlight exposure and aging on skin surface lipids and urate. *Experimental dermatology*. 2003;12(s2):13-7.
15. Shimizu N, Ito J, Kato S, Otoki Y, Goto M, Eitsuka T, et al. Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers. *Scientific reports*. 2018;8(1):9116.
16. Ekanayake Mudiyansele S, Hamburger M, Elsner P, Thiele JJ. Ultraviolet a induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(6):915-22.
17. Ryu A, Arakane K, Koide C, Arai H, Nagano T. Squalene as a target molecule in skin hyperpigmentation caused by singlet oxygen. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(9):1504-9.
18. Chiba K, Yoshizawa K, Makino I, KAWAKAMI K, ONOUE M. Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *The Journal of toxicological sciences*. 2000;25(2):77-83.
19. Chiba K, Kawakami K, Sone T, Onoue M. Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin. *Skin pharmacology and applied skin physiology*. 2003;16(4):242-51.
20. Ronco AL, De Stéfani E. Squalene: a multi-task link in the crossroads of cancer and aging. *Functional Foods in Health and Disease*. 2013;3(12):462-76.
21. Camera E, Ludovici M, Tortorella S, Sinagra J-L, Capitanio B, Goracci L, et al. Use of lipidomics to investigate sebum dysfunction in juvenile acne. *Journal of lipid research*. 2016;57(6):1051-8.
22. Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS. Essential fatty acids and acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1986;14(2):221-5.
23. Li X, He C, Chen Z, Zhou C, Gan Y, Jia Y. A review of the role of sebum in the mechanism of acne pathogenesis. *Journal of cosmetic dermatology*. 2017;16(2):168-73.
24. Zouboulis CC, Jourdan E, Picardo M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2014;28(5):527-32.
25. Elias PM. Lipid abnormalities and lipid-based repair strategies in atopic dermatitis. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(3):323-30.
26. Imokawa G. Role of Ceramide in the Barrier Function of the Stratum Corneum, Implications for the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*. 2014;05(01).
27. Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;48(3):352-8.

28. Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*. 2008;17(12):1063-72.
29. Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatias G. Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin Research and Technology*. 2014;20(4):409-15.
30. Denda M, Koyama J, Hori J, Horii I, Takahashi M, Hara M, et al. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Archives of dermatological research*. 1993;285(7):415-7.
31. Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Archives of dermatological research*. 1996;288(12):765-70.
32. Shetage SS, Traynor MJ, Brown MB, Raji M, Graham-Kalio D, Chilcott RP. Effect of ethnicity, gender and age on the amount and composition of residual skin surface components derived from sebum, sweat and epidermal lipids. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin*. 2014;20(1):97-107.
33. Jacobsen E, Billings JK, Frantz RA, Kinney CK, Stewart ME, Downing DT. Age-Related Changes in Sebaceous Wax Ester Secretion Rates in Men and Women. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985;85(5):483-5.
34. Nazzaro-Porro M, Passi S, Boniforti L, Belsito F. Effects of Aging on Fatty Acids in Skin Surface Lipids. *Journal of Investigative Dermatology*. 1979;73(1):112-7.
35. Michael-Jubeli R, Tfayli A, Baudouin C, Bleton J, Bertrand D, Baillet-Guffroy A. Clustering-based preprocessing method for lipidomic data analysis: application for the evolution of newborn skin surface lipids from birth until 6 months. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(25):6517-28.
36. Miller JM. *Chromatography: concepts and contrasts*: John Wiley & Sons; 2005.
37. Man MQ, Xin SJ, Song SP, Cho SY, Zhang XJ, Tu CX, 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):190-9.
38. Wendling PA, Dell'Acqua G. Skin biophysical properties of a population living in Valais, Switzerland. *Skin Research and Technology*. 2003;9(4):331-8.
39. Marrakchi S, Maibach HI. Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact dermatitis*. 2007;57(1):28-34.
40. Wilhelm K-P, Cua AB, Maibach HI. Skin aging: effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Archives of dermatology*. 1991;127(12):1806-9.
41. Abdallah MA, Zuelfakkar NM, Elbana RH. Comparative Study of Male and Female Sebum Production. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2017;69(2).
42. Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;116(5):793-800.
43. Giltay E, Gooren L. Effects of sex steroid deprivation/administration on hair growth and skin sebum production in transsexual males and females. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(8):2913-21.
44. Ohta H, Makita K, Kawashima T, Kinoshita S, Takenouchi M, Nozawa S. Relationship between dermato-physiological changes and hormonal status in pre-, peri-, and postmenopausal women. *Maturitas*. 1998;30(1):55-62.

45. Niki E. Lipid oxidation in the skin. *Free Radic Res.* 2015;49(7):827-34.
46. Boussouira B, Pham DM. Squalene and Skin Barrier Function: From Molecular Target to Biomarker of Environmental Exposure. 2016:29-48.
47. Passi S, De Pità O, Puddu P, Littarru GP. Lipophilic Antioxidants in Human Sebum and Aging. *Free Radical Research.* 2009;36(4):471-7.

2. Article 2 : "Raman confocal microscopy and biophysics multiparametric characterization of the skin barrier evolution with age".

Contexte : Comme évoqué précédemment, le vieillissement cutané est un phénomène multifactoriel, un processus complexe, impliquant des altérations aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire. L'objectif de cette étude était de réaliser une caractérisation multiparamétrique de la barrière cutanée au niveau du front, entre individus de différentes tranches d'âge.

Matériels & Méthodes : L'étude a été réalisée sur un panel de 40 femmes caucasiennes, ayant la peau saine, réparties en deux groupes : 22 femmes âgées entre 18 et 24 ans, et 18 femmes âgées entre 70 et 75 ans. La quantité de sébum, la perte insensible en eau et les paramètres mécaniques ont été obtenus par des mesures biométriques (Sébumètre, Tewamètre et Cutomètre respectivement). Les paramètres colorimétriques et la teneur en porphyrine ont été obtenus par analyse d'images capturées avec le Visia-CR®. L'épaisseur de la couche cornée, les descripteurs lipidiques et protéiques, la teneur en eau ainsi que les différents paramètres de mobilité de l'eau ont été obtenus par spectroscopie Raman *in vivo*.

Résultats : A la surface de la peau, nos résultats ont montré une diminution significative de la quantité de sébum chez les personnes âgées par rapport aux sujets jeunes. Cette diminution correspond à la réduction significative de la plupart des composants lipidiques dans le film hydrolipidique observée par l'analyse des lipides cutanés de surface par HT-GC/MS dans l'étude présentée précédemment²⁸¹.


En parallèle, des profils Raman *in vivo* réalisés en profondeur ont mis en évidence une diminution significative du rapport lipides/protéines sur l'ensemble de l'épaisseur du *Stratum Corneum* (SC). Malgré la diminution des quantités de lipides, un tassement latéral plus important a été observé dans la partie externe du SC chez les personnes âgées. Ces modifications, associées à l'épaississement du SC, pourraient expliquer la diminution de la perte insensible en eau observée avec l'âge. Les deux groupes d'âge ont montré une teneur en eau similaire à la surface du SC tandis que les personnes âgées présentaient une teneur en eau plus élevée dans le SC profond et l'épiderme viable. Cette observation est liée à une

augmentation des quantités relatives d'eau liée et non liée avec l'âge. D'autre part, un pourcentage inférieur d'eau partiellement liée a été observé. Le point d'équilibre entre l'eau non liée et l'eau partiellement liée a été observé autour de 90% de l'épaisseur du SC pour les jeunes et autour de 50% de l'épaisseur du SC pour les personnes âgées.

Les mesures biométriques ont permis de montrer une diminution de l'élasticité et une augmentation de la fatigabilité de la peau avec l'âge. De fortes corrélations ont été obtenues entre les paramètres mécaniques et l'eau partiellement liée. Les valeurs de corrélation et d'anti-corrélation les plus élevées ont, quant à elles, été observées pour la partie la plus profonde du SC et de l'épiderme viable. Ces résultats indiquent que ces régions plus profondes jouent un rôle plus important dans les paramètres d'élasticité et de fatigabilité, par rapport à la surface de la peau.

Conclusion : Cette étude nous a permis de réaliser une caractérisation multiparamétrique du vieillissement cutané et des adaptations possibles au niveau de la peau, chez des femmes âgées de plus de 70 ans. Les résultats obtenus nous ont également permis de mettre en avant l'intérêt de l'utilisation de la spectroscopie Raman *in vivo* dans la caractérisation cutanée, associée à des mesures biométriques plus couramment utilisées. En effet, en plus des apports liés aux analyses de conformation et structure des lipides et protéines, ainsi que du contenu en eau, les corrélations obtenues entre les données Raman et les mesures biométriques, notamment d'élasticité et de fatigabilité, nous ont permis d'apporter un éclairage important sur la couche de la peau sollicitée lors des mesures.

Raman confocal microscopy and biophysics multiparametric characterization of the skin barrier evolution with age

Aline Rigal¹ | Rime Michael-Jubeli¹ | Alex Nkengne² |
Arlette Baillet-Guffroy¹ | Armelle Bigouret² | Ali Tfayli^{1*} 

¹Lipides: Systèmes Analytiques et Biologiques Lip(Sys)2 Interdisciplinary Unit, Faculty of Pharmacy, University Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

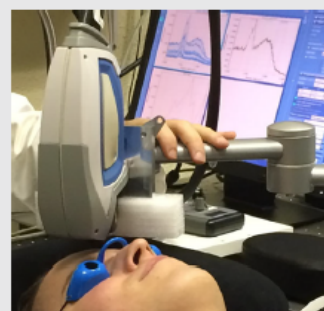
²Clarins Laboratories, LEC : Laboratoire d'Evaluation Clinique, Pontoise, France

*Correspondence

Ali Tfayli, Lipides: Systèmes Analytiques et Biologiques Lip(Sys)2 Interdisciplinary Unit, Faculty of Pharmacy, University Paris-Saclay, Châtenay-Malabry 92290, France.
Email: ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

Abstract

Skin aging is a multifactorial phenomenon that involves alterations at the molecular, cellular and tissue levels. Our aim was to carry out a multiparametric biophysical and Raman characterization of skin barrier between individuals of different age groups (<24 and >70 years old). Our results showed a significant decrease of lipids to proteins ratio overall the thickness of the stratum corneum and higher lateral packing in the outer part of the SC for elderly. This can explain the decrease in trans epidermal water loss measured values rather than only SC thickening. Both age groups showed similar water content at SC surface while elderly presented higher water content in deep SC and viable epidermis. Mechanical measurements showed a decrease in the elasticity and an increase in the fatigability with age and were correlated with partially bound water. Highest correlation and anti-correlation values were observed for the deepest part of the SC and the viable epidermis.



KEYWORDS

biophysics parameters, in vivo Raman spectroscopy, skin aging

Introduction

Skin aging is a multifactorial phenomenon, a complex process that involves alterations at the molecular, cellular, and tissue levels¹. There are two types of skin aging: intrinsic and extrinsic aging (photo-aging)².

Chronological (intrinsic) aging affects the skin in a manner similar to other organs³, it is related to natural biological aging processes in sun-protected skin. Intrinsically aged skin appears smooth, pale, and finely wrinkled². Extrinsic aging is related to environmental, mainly UV-induced damage of the epithelial (epidermis) and dermal connective tissues of the skin^{1a, 2-3}. Photo-aged facial skin is coarsely wrinkled and frequently characterized by

abnormal pigmentation and telangiectasias^{1a, 2-3}.

Both processes intrinsic and extrinsic have overlapping biological, biochemical, and molecular mechanisms²⁻³. In the dermis, aging involves: *i.* degradation of several extracellular matrix proteins, including collagen and elastic fibres^{1b, 2, 4}, and *ii.* changes in the hydration state^{1b, 4-5}. Chronological aging alters the collagen of the papillary dermis⁴, reduces the hydration and compactness of collagen fibres^{1b, 4}, while photoaging causes a decrease in collagen stability by reducing collagen type VII containing anchoring fibrils that contribute to the stabilization of the epidermal-dermal junction³ and altering proline and hydroxyproline residues in the reticular dermis⁴. Besides macroscopic signs of aging, the degradation of the collagen and elastic fibre network induces a loss of elasticity and an increase in the fatigability of the skin⁶.

Aging induces also epidermal changes, which involve thinning of stratum spinosum and flattening of the dermo-epidermal junction⁷. Senescent keratinocytes become resistant to apoptosis and may survive longer increasing the risk of DNA and protein damage. The numbers of melanocytes decrease and dysregulation of melanocyte density results in freckles, guttate hypo-melanosis, lentigines and nevi. The number of dendritic Langerhans cells also diminishes⁷.

As elegantly explained by Tagami⁸, despite the general decline of various bodily functions in advanced age, the barrier function of the SC does not deteriorate but rather improves with aging. He synthesized different studies reporting lower percutaneous absorption of topically applied substances in aged skin⁸. Although the relative amount of intercellular lipids decreased⁸⁻⁹, the trans epidermal water loss (TEWL) did not increase^{8, 9b, 9c}.

Using confocal Raman spectroscopy, Boireau et al^{9a, 9b, 10} and Choe et al^{9c} followed SC aging on the forearm. Age ranges were 18-70 years for the former and 23-62 for the latter. Both studies reported thickening of the SC with age⁹ reflecting the reduced epidermal proliferation associated with slower desquamation of the SC⁸. While both described a decrease in the lipid content, only Choe et al. observed higher ordered organization^{9c}.

SC hydration was also monitored but contradictory results were reported; Boireau et al^{9a} concluded in a decrease in water content on exposed arm sites with increased age and no

modifications in the normalized concentration profiles of the different water mobility states. In opposite to that, Choe et al.^{9c} observed more hydrogen bound water molecules at the depth 10–30% of the SC thickness correlated with the NMF profiles and lipid organizational order. The mismatch of these results was explained by Choe et al.^{9c} by different data processing on some observations and the difference in age ranges on others.

The present work is a part of a more global study interested in multiparametric characterization of aging of the skin barrier. The first part of this study was focused on the evolution of skin surface lipids (SSLs) content and composition with aging¹¹. It showed a lower sebum content, together with modification of the relative SSLs composition involving a significant reduction in the intensity of the majority of lipid components in the hydrolipidic film, namely: glycerides (tri- and di-), free fatty acids, waxes, cholesterol esters and squalene. Cholesterol content non significantly diminished while monoglycerides, hydroxy-oxidosqualene (non-significantly) and 2,3-oxidosqualene (significantly) increased with an inverse relationship between triglycerides and their hydrolytic products¹¹.

In this second part of the study, multiparametric biometric measurements together with *in vivo* confocal Raman microspectroscopy were used for the characterization of skin barrier aging on the forehead.

Materials and methods

Volunteers

This study was performed in agreement with the Helsinki Declaration. A written informed consent was established for each volunteer. 2 groups of healthy Caucasian women were enrolled: 22 young volunteers aged between 18 and 24 years (mean $21,8 \pm 0.35$); 18 old volunteers aged between 70 and 75 years (mean $72,1 \pm 0.38$). All subjects were non-smoking, presented Fitzpatrick's skin types between I and III, and a Body Mass Index (BMI) less than 27. No skin care products were applied to the measured sites and these sites were not

washed with soaps or surfactants for at least 24 h prior the study. After an acclimation time of 20 min in an environmental controlled room ($22.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, $43 \pm 1\% \text{RH}$), the different physiological parameters were measured on the forehead. For Raman analyses, measurements were performed on 18 selected volunteers, 10 young aged between 18 and 24 years and 8 aged between 70 and 75 years. All volunteers completed the study.

Biometric measurements

The measured values were Trans-Epidermal Water Loss (TEWL) using Tewameter TM300, the sebum content on the skin surface using Sebumeter SM815, and the elasticity parameters using Cutometer MPA580, all from (Courage+Khazaka electronic GmbH, Köln, Germany). The time/strain mode of the Cutometer was used with 3 consecutive cycles of a 5-s suction application followed by a 3-s relaxation period. We used a 2mm diameter measuring probe and we applied a constant suction of 450mbar. To minimize the intra-individual variation, the presented biometric values are the mean of 3 measurements.

To evaluate colorimetric parameters and porphyrin levels, full face 2D images were captured by Visia-CR® imaging system (Canfield Scientific, New Jersey, USA), with different light modalities (cross-polarized light, parallel polarized light, UVA). Colorimetric parameters were obtained with Colorskin® (Newtone Technologies, Lyon, France) software on the forehead and on the cheek: luminosity (L^*), red/green chromatic component (a^*), yellow/blue chromatic component (b^*), saturation (C^*), tint angle (h^*) and skin pigmentation (ITA). Porphyrin content was determined on the forehead and on the cheek, using home-made data processing using the red fluorescent channel. Two parameters were determined, *i.e.* area (obtained from the number of pixels) and volume (obtained from the integration of pixels intensities).

In vivo Raman spectroscopy

In vivo Raman investigations were performed using an *in vivo* confocal Raman optical

microprobe (Horiba Scientific, Villeneuve d'Ascq, France) attached to a home-made movable arm allowing to easily position the probe on skin surface (Fig. 1).

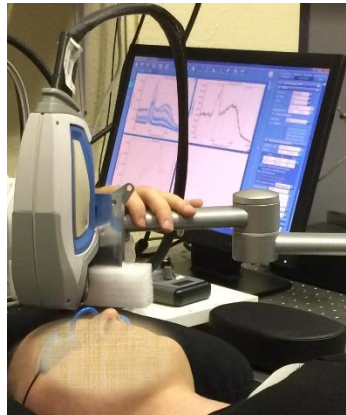


Figure 1. Photograph of the *in vivo* Raman set-up for direct measurements on the forehead.

The set-up consists of a 660nm laser diode as excitation source; a probe-head including interferential and edge band pass filters for filtering incident laser line and Rayleigh scattering respectively; a long focal microscope objective MPLAN FLN 100X/NA 0.75 (Olympus, Japan) for focusing the excitation beam and capturing the scattered light (3 μm for in-depth and 2 μm for lateral resolution).

The objective was coupled to a piezoelectric system, a 5 μm diameter fiber optic with coaxial two-fiber probe, one for excitation and the other for collection. Raman spectral in-depth profiles were collected from -6 μm of the skin surface to +30 μm with a 3 μm step.

Collected scattered light was analysed with a LabRAM HR Evolution (Horiba Scientific, Villeneuve d'Ascq, France) spectrograph by means of a high sensitivity CCD detector (Synapse) cooled to -70°C by Peltier effect and gratings of 300gr/mm permitting to achieve 4 cm^{-1} spectral resolution. Two spectral regions were investigated: the fingerprint region (400-1800 cm^{-1}) and the high wavenumbers (2600-3800 $^{-1}$). For each scan, a 2 seconds exposure time was used with 2 accumulations per spectrum. Each in-depth profile included 13 spectra for a total of 30 seconds acquisition time per profile.

Raman data analyses

The different data preprocessing and processing were performed using in house developed software under Matlab® environment (Mathworks, Natick, MA, USA). All spectra were corrected using Savitzsky-Golay function on 11 points and baseline corrected using an automatic polynomial algorithm.

Curve fitting was carried out using the Least Squares Fitting algorithm. The algorithm allows to identify, by using second derivative, the number of sub-bands within a spectral region. It then automatically adjusts the combination of bands to best fit the spectral profile. The maximum shift of the sub-band position was set to $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$, the bandwidth was fixed to 100 cm^{-1} , while intensity was left free to adapt to the fit. The quality of the fit was estimated by the standard error and the χ^2 values¹².

Stratum corneum (SC) thickness

The SC surface was automatically detected based on the integrated intensity of the CH stretching band. The starting point is located at half of the intensity maximum reached at the end of the first regime (air)¹³. In depth scales were shifted to set the zero position at the starting point.

The boundary between the SC and viable epidermis was determined from water profiles as described by Egawa *et al.* and Crowther *et al.*^{9c, 14}. The SC thickness is thus determined by calculating the difference between the SC-viable epidermis boundary and the zero position. For the comparison between young and elderly spectral profiles, the boundary between SC and viable epidermis was normalized to 100% and depths were expressed in percentage of SC thickness.

Lipids to Proteins evolution

To follow the relative evolution of the lipid related spectral signatures compared to keratin related features we have used the ratio of the CH₂ stretching bands ($\nu_{\text{asym}} \text{CH}_2$: 2850 cm^{-1} , $\nu_{\text{sym}} \text{CH}_2$: 2885 cm^{-1} , associated to lipids¹⁵) to the CH₃ stretching bands ($\nu_{\text{asym}} \text{CH}_3$: 2932 cm^{-1}

¹, associated with proteins¹²). This spectral parameter is described in the literature^{9b, 9c, 14e, 16}.

Lipids compactness

The lipids lateral packing was evaluated using the asymmetric to symmetric CH₂ stretching spectral features ($\nu_{\text{asym CH}_2} / \nu_{\text{sym CH}_2}$) (2850 cm⁻¹/2885 cm⁻¹). This ratio is generally used as an indicator of the conformational state and lateral packing. High values are associated with higher trans content and a compact organization while a decrease is indicative of a loosening^{12b, 15b, 17}.

Water content and mobility

To follow the water content within the SC, we used the bands ratio of OH stretching (3100-3800 cm⁻¹) to CH stretching (2800-3000 cm⁻¹)^{9c, 12a, 14e, 18}.

Spectral features associated with different types of water were assessed by band deconvolution. The sub-bands decomposition proposed by Vyumvuhore *et al.*¹² was applied in the present work, *i.e.* tightly bound water centred at 3210 cm⁻¹, partially bound water at 3280 cm⁻¹ and 3345 cm⁻¹ and unbound water at 3470 cm⁻¹¹².

The first sub-band is related to primary bound water which is tightly bound to the SC polar sites of proteins and polar heads of lipids, constituting a first monolayer of water. Partially bound water is bound to the first monolayer and to other SC molecular components. This means that water molecules interact partially with neighbouring molecules using only 2 or 3 of the 4 possible hydrogen bonds. The evolution of the global partially bound water content was observed by plotting the sum of both sub-bands. Unbound water is considered as water that is not directly linked to the SC components, thus presenting no hydrogen bonds with SC lipids or proteins^{12, 17d}.

The OH stretching band deconvolution was also described by Sun *et al.*¹⁹ and adapted by Choe *et al.*^{9c, 14e} for SC water mobility. Deconvoluted bands from both methods lead to similar evolution (see results section).

Proteins folding

The maximum position of $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_3$ at $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$, is related to the folding/unfolding process of proteins. Folding of the proteins can be highlighted by a shift towards lower wavenumbers^{9c, 12, 17a, 17d, 20}.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Matlab® environment (Mathworks, Natick, MA, USA). To compare the spectral and biometric parameters within each group, a Shapiro-Wilk test for normality was applied followed by the ANOVA test was used. Two-way analysis of variance for variation inter-, and intra-groups for all the skin parameters has been presented as mean \pm Standard Deviation. Variables that failed the Shapiro-Wilk normality test were compared with the non-parametric Kruskal-Wallis test (*KW*).

Significance limits were set to P-values at 1% and 5%. P-values lower than 10% were used as tendency indicators.

Pearson's correlation coefficient (*r*) calculation was employed to evaluate the linear relation between Raman spectral markers and the measured physiological and biometric parameters, where the value $r = 1$ means a perfect correlation while values higher than 0.5 are considered to describe correlate.

Results and discussion

Evolution of colorimetric parameters with age

Table 1 details the spectrometric parameters obtained with Visia-CR. No significant differences were obtained between both groups for forehead while highly significant discrimination can be observed for the cheek.

Colorimetric measurements: forehead				
Parameters	Young	Elderly	pValue	Age related modifications
L*	63.20 (±0.77)	61.95 (±1.07)	0.22	NS (KW)
a*	10.27 (±0.44)	10.18 (±0.64)	0.98	NS (KW)
b*	17.29 (±0.83)	17.83 (±0.78)	0.64	NS (KW)
C*	20.22 (±0.83)	20.63 (±0.89)	0.68	NS (KW)
h*	58.83 (±1.30)	60.35 (±1.42)	0.62	NS (KW)
ITA	37.763 (±2.73)	33.63 (±0.86)	0.18	NS (KW)

Colorimetric measurements: cheek				
Parameters	Young	Elderly	pValue	Age related modifications
L*	66.00 (±0.59)	61.49 (±1.03)	< 0.001	↘ (KW)
a*	11.94 (±0.71)	14.76 (±0.95)	0.02	↗ (anova)
b*	15.29 (±0.62)	19.15 (±0.75)	<0.001	↗ (KW)
C*	19.62 (±0.70)	24.32 (±1.04)	<0.001	↗ (KW)
h*	52.19 (±1.82)	52.78 (±1.48)	0.96	NS (KW)
ITA	46.30 (±1.92)	30.94 (±3.03)	<0.001	↘ (KW)

Table 1. Colorimetric parameters collected on the forehead and the cheek of young and elderly volunteers.

The opposite observations from both forehead and cheek may be related to a long-term protective role of the skin surface lipids present on the forehead as well to a difference in the sunlight exposure. A similar observation on the role of Sebum lipids as protective barrier was described by Tagami⁸. In his review, he reported that sebum excretion and non-apparent sweating participate to the protection of the facial skin⁸.

Variations of porphyrin related values with age

		Young	Elderly	pValue	Age related modifications
Cheek	Area	0.05 (±0.007)	0.02 (±0.003)	<0.001	↘
	Volume	3.95 (±0.76)	1.01 (±0.25)	<0.001	↘
Forehead	Area	0.044 (±0.01)	0.013 (±0.005)	0.007	↘
	Volume	3.52 (±1.06)	0.89 (±0.41)	0.03	↘

Table 2. Porphyrins values obtained with Visia-CR.

Secreted by bacteria in the pilosebaceous follicles, porphyrins are endogenous fluorophores which may participate to the absorbing and reflecting process of the light²¹. In addition, a correlation between sebaceous gland activity and presence of porphyrins in the frontal region has been demonstrated²². The decrease of porphyrin may be related to the decrease in the sebum content on the skin surface observed with skin aging (Fig. 03.A, Table 2).

Evolution of mechanical parameters

Parameters	Young	Elderly	pValue	Age related modifications
R1	0.11 (± 0.004)	0.15 (± 0.01)	0.002 (anova)	↗
R2	0.60 (± 0.02)	0.51 (± 0.02)	0.003 (KW)	↘
R4	0.16 (± 0.007)	0.21 (± 0.01)	<0.001 (anova)	↗
R5	0.61 (± 0.03)	0.44 (± 0.03)	<0.001 (KW)	↘
R7	0.33 (± 0.01)	0.22 (± 0.01)	<0.001 (KW)	↘
Q1	0.47 (± 0.02)	0.36 (± 0.02)	<0.001 (KW)	↘

Table 3. Mechanical parameters obtained with Cutometer on volunteers forehead.

Table 3 shows the mean values of elasticity and fatigability parameters²³ for young and elderly. Fatigability parameters (R1 and R4) increased with age while elasticity parameters (R2, R5, R7) and visco-elastic recovery (Q1) decreased.

In addition to Anova, Pearson's correlation coefficient (r) was calculated to evaluate the linear relation between mechanical markers and age (data not shown). Similar tendency was obtained with moderate correlation values ($\sim |0.55|$). R7 showed the higher anti-correlation coefficient (r^2 : -0.74). This is in concordance with results obtained by Eklouh-Molinier *et al.*^{6a} who observed an increase in fatigability and a decrease of elasticity.

In addition to chemical protective barrier, skin provides mechanical protection against physical stressors. With aging, the degradation of the collagen and elastic fibre network induces a loss of elasticity and an increase in the fatigability of the skin⁶.

Eklouh-Molinier *et al.*^{6a} applied partially least squares regression to highlight Raman spectral features that fits the best with mechanical properties associated with aging. CH₃ stretching as well as ν C=O were identified as markers for mechanical stress. Meanwhile, the correlation coefficients obtained were around 0.2 and not enough to statically consider these spectral

features for directly conduct conclusions on the mechanical behaviour in a such complex system as the skin associated to a complex phenomenon as the skin aging.

Even if the mechanical behaviour relies mainly on elastin and collagen fibres in the dermis, it has been demonstrated that the SC presents a significant contribution in the overall mechanical properties of the skin^{6a, 6c}. In their study, Sano et al.²⁴ reported significant reduction of the elasticity of the stratum corneum after repetitive UV_B exposure. The exposure concomitantly induced the formation of wrinkles. This relationship suggests that reductions in elasticity of the stratum corneum are probably one of the major factors in wrinkle formation. In a previous study, we have investigated the molecular modifications due to the extension of SC by using Raman spectroscopy²⁰. When SC was stretched, alpha helix form of proteins unravelled and were converted into beta-sheet forms. In parallel, lipids in *gauche* conformational order, which corresponds to less ordered lipid matrix, increases with strain.

Despite the high values of the correlation coefficient obtained in this study, it does not take into account the complexity of the *in vivo* system.

At this stage of knowledge, correlation between vibrational features and mechanical parameters should be considered as complementary information for the understanding of a complex phenomenon and not to substitute one by another by trying to predict elasticity or fatigability from Raman spectra.

Increase of SC thickness with age

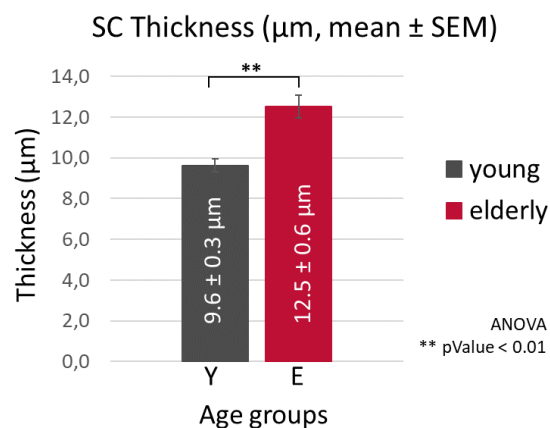


Figure 2. Average thickness of SC (forehead) for both age groups.

The average of the Stratum Corneum thickness of forehead skin was determined to be $9.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ for young volunteers and $12.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ for elderly (Fig. 2). The SC of elderly is significantly thicker than the SC of younger ($p < 0.01$, ANOVA).

These results are in concordance with results reported by Egawa *et al*^{14a}, Boireau-Adamezyk *et al.*^{9b} and Choe *et al.*^{9c}

Despite the fact that overall skin becomes thinner with age⁸, the thickness of the SC increased. This can be explained by reduced epidermal proliferation associated with slower desquamation of the SC, higher intercorneal cohesiveness⁸ and increased corneocytes size in aged SC compared to young^{8, 25}.

Decrease of surface lipids and SC lipids content with age

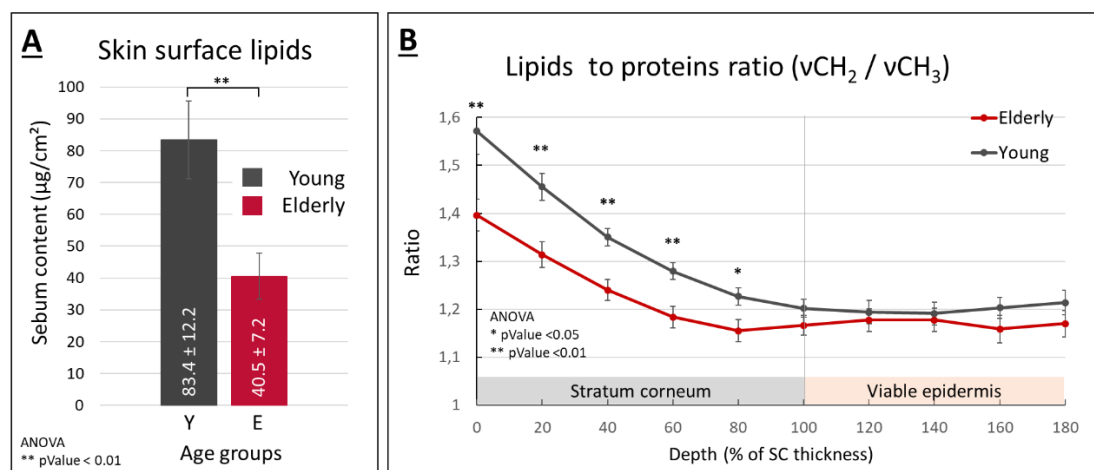


Figure 3. A. Sebum content on skin surface (measured with Sebumeter), B. Raman descriptors of SC Lipids to keratin ratio from SC surface to the viable epidermis.

At skin surface, Sebumeter measurements showed a significant decrease of the amount of sebum for elderly ($40.5 \pm 7.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) compared to young volunteers ($83.4 \pm 12.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Fig. 3.A). This corresponds to the significant reduction of the majority of lipid components in the hydrolipidic film observed with HT-GC/MS in the first part of this study¹¹.

In parallel, in-depth *in vivo* Raman profiles highlighted a significant decrease of lipids to proteins ratio overall the thickness of the SC (Fig 3.B). Similar significant reduction was reported by Boireau-Adamezyk *et al.*^{9b, 10} while Choe *et al*^{9c} indicated a non-significant

decrease in lipids against NMF. An explanation may be the age range of the volunteers enrolled in their study.

It is worthy to notice that the differences in the relative amounts between young and aged groups increased gradually from depth (SC/viable epidermis interface) to the SC surface.

The lower ratio values and the in-depth gradient may be explained, on one hand, by reduced intercellular lipid production in the SC⁸ and in skin surface lipids (SSLs)¹¹ and on the other hand, by the presence of a lower number but larger corneocytes covering the aged skin⁸. This was also used to explain the higher relative amount of amino acids with age measured by Takahashi et al.²⁶.

The increase of keratin content was also reported by Kambayashi, et al.²⁷ on effects of chronic low-dose UV irradiation. They postulated that this increase may be involved in the alteration of the physical properties of the skin and wrinkles formation.

Decrease of trans epidermal water loss and increase of lipids compactness at SC surface with age

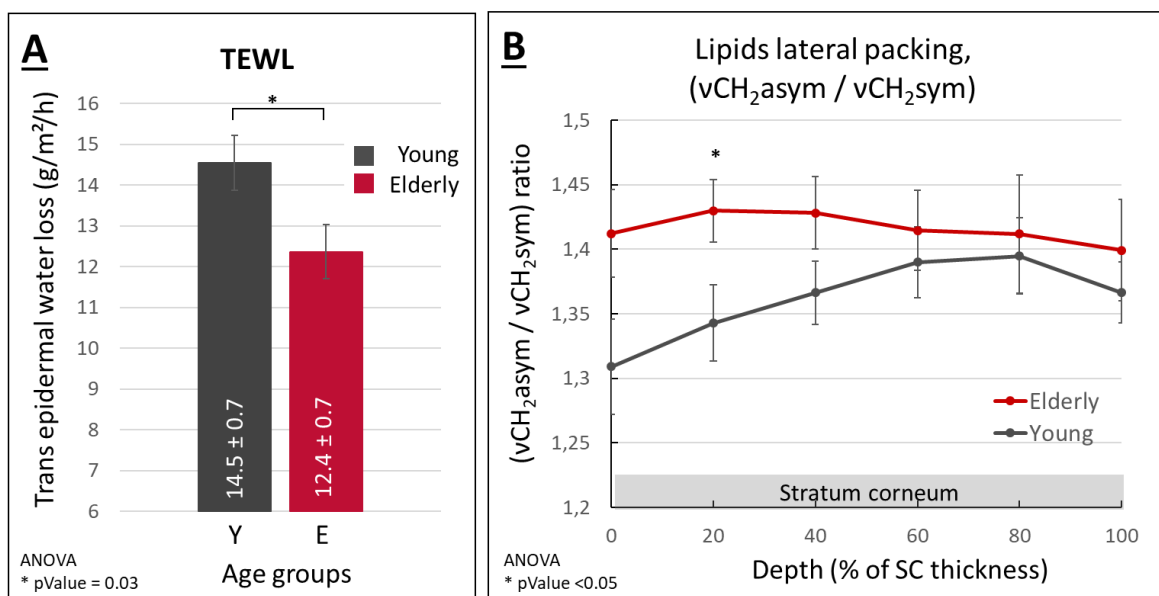


Figure 4. A. Trans epidermal water loss (TEWL), B. Lateral packing of lipids in the SC.

Trans Epidermal Water Loss diminished significantly for elderly (Fig. 4.A). This reduction in the water loss is largely reported in the literature^{9b, 28}.

As the water loss is directly related to the barrier function of the SC, lipids lateral packing was followed based on CH₂ asymmetric to CH₂ symmetric stretching.

Two observations can be made from the profiles in figure 4.B. Firstly, for young volunteers, we observed a gradual decrease in the lateral packing moving from depth to the surface. Elderly SC showed no in-depth related gradual decrease leading to the second observation, *i.e.*, a higher lateral packing in the outer part of the SC with significant difference at around 20 % depth.

The first observation is in concordance with observations of Boireau-Adamezyk et al.^{9b}. A possible explanation may be the relation between the organizational order of lipids and the desquamation process. This latter is complex molecular and enzymatic phenomenon that impacts keratin, corneodesmosomes, lipids and the other components in the SC⁸.

The second observation is contradictory with a previous study of our group^{17b} which reported a loosening in the lipid matrix. In this previous study, the instrumental set-up did not include microspectroscopic measurements and data were collected with a fibre probe giving around 100 µm in depth collection for each spectrum. The low spatial resolution didn't allow to directly observe spectral features related to lipids. In order to reach this information, lipids were extracted from SC and their *in vivo* signature was obtained from difference spectra obtained on skin surface before and after lipids extraction.

Boireau et al.^{9b} reported no significant difference in lipid compactness between both age groups while Choe et al.^{9c} results mentioned an increase in the lateral packing and conformational order with age. Results are in total agreement with the in-depth profiles plotted in figure 4.B. In addition to that, the significant differences were observed by Choe et al.^{9c} between 10 and 30 % of the SC thickness which is concordant with the significant increase observed at 20% in our results.

The enhancement of the barrier function in aged skin was also described by Tagami⁸. As mentioned by Choe et al.^{9c, 29}, this can explain the decrease in TEWL measured values rather than only SC thickening.

Meanwhile, it is important to keep in mind the complexity of the skin aging and to consider the observations as inter-correlated and not as separate observations; e.g. the observed

absence of gradual decrease in lipids organisation towards surface in elderly SC cannot be dissociated from the SC thickening without being able at this stage to describe a cause to effect relationship.

Evolution of water gradients with age

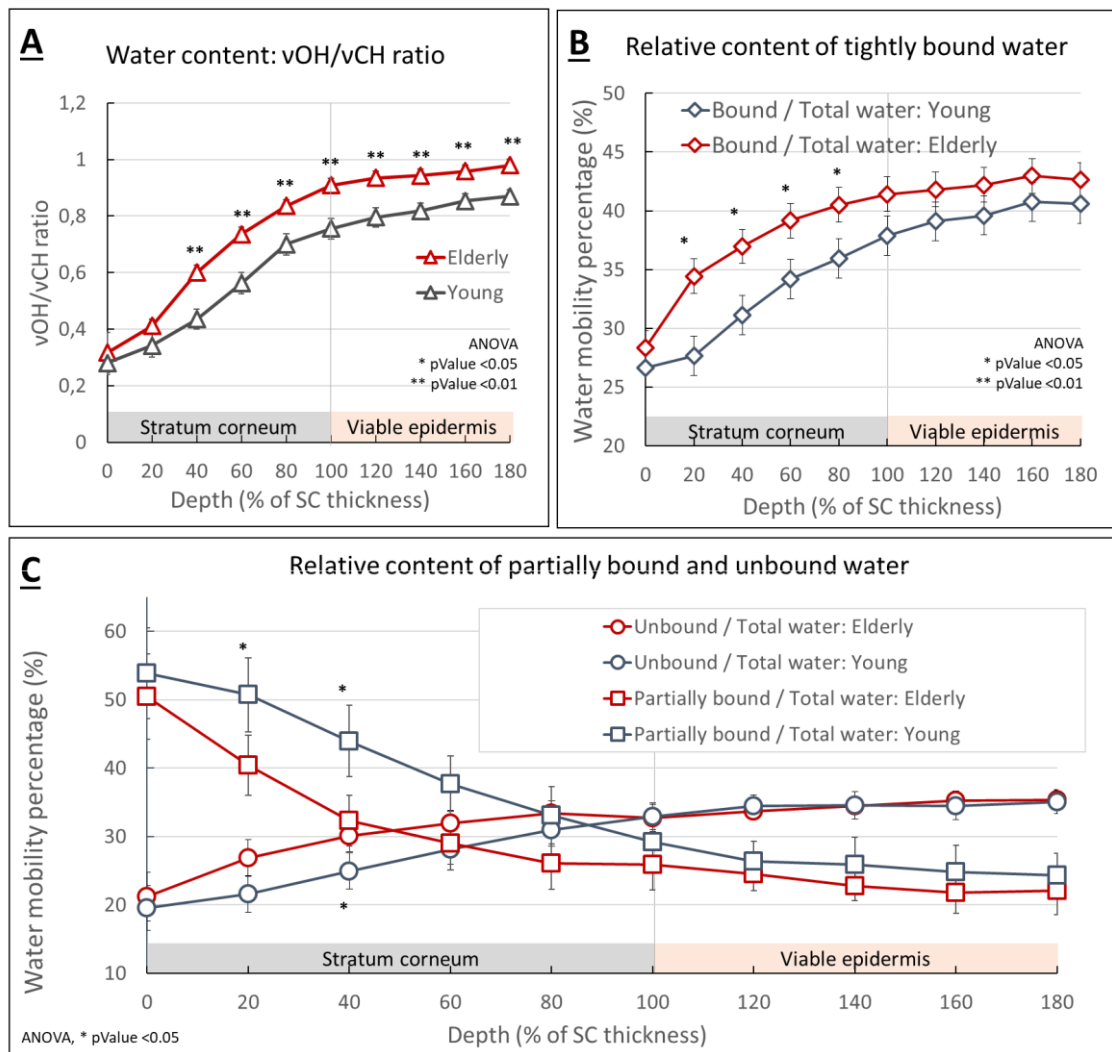


Figure 5. A. water content in SC and viable epidermis (vOH / vCH ratio). B. percentage of tightly bound water. C. percentages of partially bound and unbound water.

Similar water content at SC surface for both age groups and higher water content for elderly in deep SC and viable epidermis:

The analysis of the vOH/vCH ratio (Fig. 5.A) presented the classical evolution with an increase from surface to reach a plateau after the SC/viable epidermis interface. Comparison between

both age groups showed no difference at the surface of the SC, non-significant increase between 0 and 20% depth followed by significantly higher water content down to SC/viable epidermis interface and in the viable epidermis.

Using ATR-FTIR; Machado et al.^{25a} found no evident difference in water content at the skin surface (in contact with ATR crystal) between age groups. This is in perfect agreement with the plot in figure 5.A at the surface of the SC.

The higher amount of water in the loose skin tissue and deeper parts of the SC was already pointed by Kligman^{28a} and Tagami⁸.

Increase in the tightly bound water relative amounts with age:

In figure 5.B, we plotted the normalised tightly bound to total water content. While the observed gradual increase for both young and elderly was in agreement with Boireau et al. observations^{9b}, the comparison between age groups are not concordant. In fact, results presented in figure 5.B show a significant increase of the tightly bound water with age. Similar observations were reported by Choe et al.^{9c}. For their study, they have used a different method for bands selection. In their classification, the DDAA-OH water related band was around 3226 cm^{-1} , very close to our tightly bound water band at 3210 cm^{-1} .

The lower significance reported in their study can be explained by the reduced age range enrolled in their study and the lower number of volunteers for the statistical validation. The observation of higher amounts of NMF was given as an explanation for the increase of this type of water^{9c}.

Lower percentage of partially bound water and higher percentage of unbound water within elderly SC:

Finally, in figure 5.C, the plotted profiles represent the percentage of partially bound and unbound water in the SC and the viable epidermis. As for figure 5.B, the type-related water gradient from depth to surface is in agreement with Boireau-Adamezyk et al.^{9b, 10}, but not the comparison between age groups^{9a}.

The relative amounts of partially bound water decrease when moving from surface to reach a steady level for the viable epidermis. Lower values in the percentage of partially bound water are observed in the SC (20% down to 100%) while the percentage is not significantly different for viable epidermis. In Choe et al. study^{9c}, the DA-OH related band at 3342 cm^{-1} is close to one of our two defined partially bound water bands (3280 cm^{-1} and 3345 cm^{-1}). The separate observation of each of these two bands followed the same tendency with lower significance. The sum is thus used.

In contrast to the evolution of partially bound water, the unbound water fractions increase going from the surface of the SC to reach a plateau for the viable epidermis. The relative amounts of unbound water present non-significantly higher levels for elderly in the SC (significant at 40% of SC thickness). The levels are equivalent for viable epidermis. A possible explanation of the higher amounts was advanced by Choe et al. in their work on the forearm^{9c} and related this increase to the enhancement to the lipids organisational order near to the SC surface. This is concordant with the dynamic of the unbound water through the SC.

From the observations in figure 5.B and figure 5.C, tightly bound and unbound water increased with age as well as the total water content. Meanwhile, it was widely advanced that with aging, skin becomes thinner, dry and rough^{8, 30}. The sensation of dry skin is frequently related to tightening and mechanical stress. This may be associated to a reduction of the partially bound water within the SC.

Balance between partially bound and unbound water: shallower position of equilibrium depth for elderly

In addition to the up-mentioned observations, it is worthy to notice that the position of the intersection between both partially bound and unbound lines is different for aged and young epidermis. The intersection marks the balance between both types of water. In young SC, the balance was observed around 90% of SC thickness (figure 5.C). This means that partially bound water (bound to other molecular components within the SC) was higher in almost all the SC. For elderly, the balance point was around 50 % of SC thickness. To the far to our

knowledge, this work is the first to highlight the depth of the balance point and its variation along age.

Effect of age on keratin folding

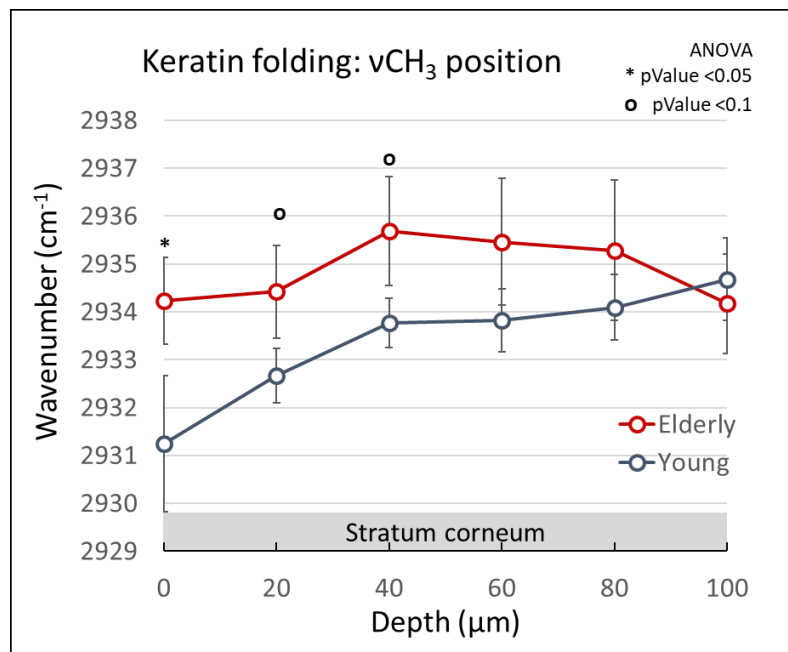


Figure 6. Keratin folding observed by following the vCH₃ maximum position.

The folding status of the keratin, *i.e.* tertiary structure, was also monitored by following the position of the maximum of the v_{asym}CH₃ band around 2932 cm⁻¹ (Fig. 6). A shift of towards lower wavenumbers reveals folding of keratin thus favouring the intramolecular interactions^{12, 20}.

The maximum position of this band is higher in aged SC revealing an unfolding of keratin (significant only at the surface) in concordance with Choe et al.^{9c} who reported no significant tendency.

The observed line of aged SC in figure 6 may be explained by connecting with other observations related to the lack of desquamation and the enhancement of the lipid barrier as well as the complex equilibrium between the three types of water.

Indeed, in our *in vitro* investigations^{12, 20} on SC samples, the variation of relative humidity led to variations in the unbound and partially bound water. The experimental set-up did not

allow modifications in the tightly bound water. Thus, the evolution in the partially bound water were the only ones to correlate with the folding/unfolding of keratin and to the lateral packing of lipids.

In the present study, the water mobility showed modifications in the three types of water with age, particularly in tightly bound water. This leads to a more complex observation and does not mean that keratin fibres are not affected by water content as suggested by Choe et al.^{9c}.

In addition to that, with age, the slower desquamation of the SC is also related to a deregulation in the enzymatic degradation of corneodesmosomes. Corneodesmosomes are the most important adhering junctions, providing strength for the SC structure made of corneocytes³¹. This maintains higher intercorneal cohesiveness⁸ and directly impacts the tertiary structure of keratin favouring the unfolding.

Correlation between mechanical parameters and in depth collected Raman descriptors.

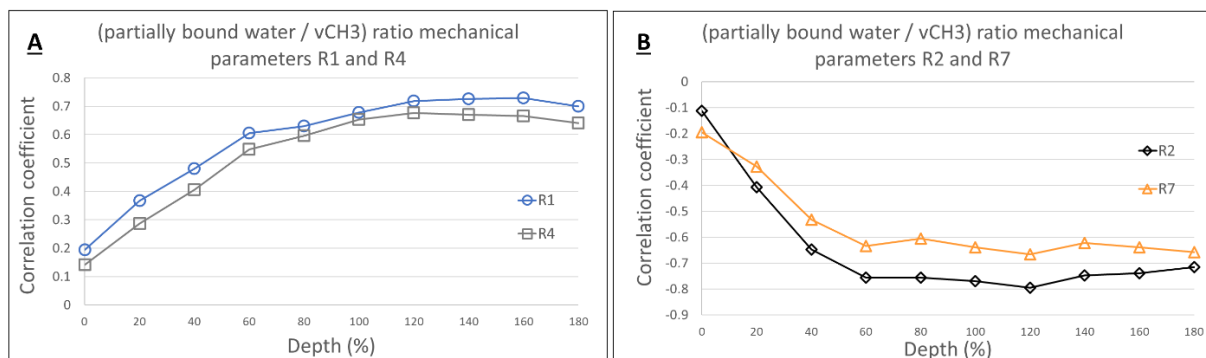


Figure 7. A, B. Correlation between partially bound water to CH₃ stretching ratio and mechanical parameters (A: R1 and R4, B: R2 and R7).

Pearson's correlation coefficients were calculated between the mechanical parameters obtained with the cutometer and the different Raman descriptors in function of depth. Highest correlation values were obtained with the ratio of partially bound water to CH₃ stretching (proteins) (Fig. 7.A and 7.B).

The correlations of fatigability parameters (R1 and R4) and the partially bound water to CH₃

stretching ratio is shown in figure 7.A. Very low correlation values can be observed at the surface of the SC and increased gradually when moving deeper to reach plateau between 80% and 100% of SC thickness. The correlations with elasticity parameters (R2 and R7) (Fig. 7.B) showed an anti-correlation that reached a plateau around 60% of SC thickness. Highest correlation and anti-correlation values are thus obtained for the deepest part of the SC and the viable epidermis.

These observations confirmed, on the one hand, the relation between partially bound water and mechanical stress. On the other hand, they related the fatigability and the elasticity parameters measured by the cutometer to the deepest parts of SC and viable epidermis.

Conclusion

The present work gathered multiparametric measurements for the characterization of cutaneous aging and the possible adaptations in the skin of people over 70 years.

At skin surface, our results showed a significant decrease of the amount of sebum for elderly compared to young volunteers. This corresponds to the significant reduction of most lipid components in the hydrolipidic film observed with HT-GC/MS in the first part of this study¹¹. In parallel, in-depth in vivo Raman profiles highlighted a significant decrease of lipids to proteins ratio overall the thickness of the SC.

In opposition to younger volunteers, where a gradual decrease in the lateral packing and a gradual folding of keratin fibers moving from depth to the surface were observed; Elderly SC didn't show an in-depth related gradual variation in lipids packing or keratin folding. These observations, as well as the thickening of the SC may be related to the slower desquamation process in aged skin.

Despite the decrease in the lipids amounts, higher lateral packing in the outer part of the SC was observed for elderly. This can explain the decrease in TEWL measured values rather than only SC thickening.

Both age groups showed similar water content at SC surface while elderly presented higher water content in deep SC and viable epidermis. This is related to an increase in the tightly

bound and unbound water relative amounts with age. Meanwhile, lower percentage of partially bound water were observed.

The intersection between unbound and partially bound water lines marks the balance between both types of water. The balance point was observed around 90% of SC thickness for young volunteers and around 50 % of SC thickness for elderly.

The sensation of dry skin with age is frequently related to tightening and mechanical stress. This may be associated to a reduction of the partially bound water within the SC. This is concordant with the decrease in the elasticity and the increase in the fatigability with age and the high correlations obtained between mechanical parameters and partially bound water.

Finally, it is important to notice that the highest correlation and anti-correlation values were obtained for the deepest part of the SC and the viable epidermis. This indicates that these regions play a more important role in the elasticity and fatigability compared to the surface.

References

1. (a) Peysselon, F.; Ricard-Blum, S., Understanding the biology of aging with interaction networks. *Maturitas* 2011, 69 (2), 126-130; (b) Nguyen, T. T.; Happillon, T.; Feru, J.; Brassart-Passco, S.; Angiboust, J.-F.; Manfait, M.; Piot, O., Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration. *Journal of Raman Spectroscopy* 2013, 44 (9), 1230-1237.
2. Gonzaga, E. R., Role of UV Light in Photodamage, Skin Aging, and Skin Cancer. *American Journal of Clinical Dermatology* 2009, 10 (Supplement 1), 19-24.
3. Scharffetter-Kochanek, K.; Brenneisen, P.; Wenk, J.; Herrmann, G.; Ma, W.; Kuhr, L.; Meewes, C.; Wlaschek, M., Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology* 2000, 35 (3), 307-316.
4. Villaret, A.; Ipinazar, C.; Satar, T.; Gravier, E.; Mias, C.; Questel, E.; Schmitt, A. M.; Samouillan, V.; Nadal, F.; Josse, G., Raman characterization of human skin aging. *Skin Research and Technology* 2018, 25 (3), 270-276.
5. Kourbaj, G.; Bielfeldt, S.; Seise, M.; Wilhelm, K. P., Measurement of dermal water content by confocal RAMAN spectroscopy to investigate intrinsic aging and photoaging of human skin in vivo. *Skin Research and Technology* 2020.
6. (a) Eklouh-Molinier, C.; Gaydou, V.; Froigneux, E.; Barlier, P.; Couturaud, V.; Manfait, M.; Piot, O., In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements. *Anal Bioanal Chem* 2015, 407 (27), 8363-72; (b) Naylor, E. C.; Watson, R. E. B.; Sherratt, M. J., Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*

- 2011, 69 (3), 249-256; (c) Biniek, K.; Levi, K.; Dauskardt, R. H., Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109 (42), 17111-6.
7. Wulf, H. C.; Sandby-Møller, J.; Kobayasi, T.; Gniadecki, R., Skin aging and natural photoprotection. *Micron* 2004, 35 (3), 185-191.
8. Tagami, H., Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Archives of Dermatological Research* 2007, 300 (S1), 1-6.
9. (a) Boireau-Adamezyk, E.; Baillet-Guffroy, A.; Stamatias, G. N., Mobility of Water Molecules in the Stratum Corneum: Effects of Age and Chronic Exposure to the Environment. *Journal of Investigative Dermatology* 2014, 134 (7), 2046-2049; (b) Boireau-Adamezyk, E.; Baillet-Guffroy, A.; Stamatias, G. N., Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* 2014, 20 (4), 409-15; (c) Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M. E., Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. *Mechanisms of ageing and development* 2017.
10. Boireau-Adamezyk, E.; Baillet-Guffroy, A.; Stamatias, G. N., The stratum corneum water content and natural moisturization factor composition evolve with age and depend on body site. *International Journal of Dermatology* 2021.
11. Rigal, A.; Michael-Jubeli, R.; Bigouret, A.; Nkengne, A.; Bertrand, D.; Baillet-Guffroy, A.; Tfayli, A., Skin surface lipid composition in women: increased 2,3-oxidosqualene correlates with older age. *Eur J Dermatol* 2020.
12. (a) Vyumvuhore, R.; Tfayli, A.; Biniek, K.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Dauskardt, R.; Baillet-Guffroy, A., The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo. *Journal of biophotonics* 2015, 8 (3), 217-25; (b) 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. *The Analyst* 2013, 138 (14), 4103-11.
13. (a) Tfayli, A.; Piot, O.; Manfait, M., Confocal Raman microspectroscopy on excised human skin: uncertainties in depth profiling and mathematical correction applied to dermatological drug permeation. *J Biophotonics* 2008, 1 (2), 140-53; (b) Tfayli, A.; Piot, O.; Pitre, F.; Manfait, M., Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. *Eur Biophys J* 2007; (c) Caspers, P. J.; Lucassen, G. W.; Carter, E. A.; Bruining, H. A.; Puppels, G. J., In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *The Journal of investigative dermatology* 2001, 116 (3), 434-42.
14. (a) Egawa, M.; Hirao, T.; Takahashi, M., In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta dermato-venereologica* 2007, 87 (1), 4-8; (b) Bielfeldt, S.; Schoder, V.; Ely, U.; van der Pol, A.; de Sterke, J.; Wilhelm, K.-P., Assessment of human stratum corneum thickness and its barrier properties by in-vivo confocal Raman spectroscopy. *International Journal of Cosmetic Science* 2009, 31 (6), 479-480; (c) Crowther, J. M.; Sieg, A.; Blenkiron, P.; Marcott, C.; Matts, P. J.; Kaczvinsky, J. R.; Rawlings, A. V., Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. *The British*

- journal of dermatology* 2008, 159 (3), 567-77; (d) Hancewicz, T. M.; Xiao, C.; Weissman, J.; Foy, V.; Zhang, S.; Misra, M., A Consensus Modeling Approach for the Determination of Stratum Corneum Thickness Using In-Vivo Confocal Raman Spectroscopy. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 2012, 02 (04), 241-251; (e) Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M. E., Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo. *The Analyst* 2016, 141 (22), 6329-6337.
15. (a) 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), 1201-1213; (b) Tfayli, A.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A., Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010, 397 (3), 1281-96.
16. (a) Gniadecka, M.; Nielsen, O. F.; Christensen, D. H.; Wulf, H. C., Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *J Invest Dermatol* 1998, 110, 393-398; (b) Gniadecka, M.; Nielsen, O. F.; Wessel, S.; Heidenheim, M.; Christensen, D. H.; Wulf, H. C., Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J Invest Dermatol* 1998, 111 (6), 1129-33; (c) Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M. E., Lipid organization and stratum corneum thickness determined in vivo in human skin analyzing lipid-keratin peak (2820-3030 cm^{-1}) using confocal Raman microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 2016, 47 (11), 1327-1331.
17. (a) 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; (b) Tfayli, A.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A., Raman spectroscopy: feasibility of in vivo survey of stratum corneum lipids, effect of natural aging. *European Journal of Dermatology* 2012, 22 (1), 36-41; (c) Guillard, E.; Tfayli, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A., Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. *Anal Bioanal Chem Accepted*; (d) Quatela, A.; Miloudi, L.; Tfayli, A.; Baillet-Guffroy, A., In vivo Raman Microspectroscopy: Intra- and Intersubject Variability of Stratum Corneum Spectral Markers. *Skin Pharmacol Physiol* 2016, 29 (2), 102-9.
18. Biniek, K.; Tfayli, A.; Vyumvuhore, R.; Quatela, A.; Galliano, M. F.; Delalleau, A.; Baillet-Guffroy, A.; Dauskardt, R.; Duplan, H., 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), 901-908.
19. (a) Sun, Q., The Raman OH stretching bands of liquid water. *Vibrational Spectroscopy* 2009, 51 (2), 213-217; (b) Sun, Q., Local statistical interpretation for water structure. *Chemical Physics Letters* 2013, 568-569, 90-94.
20. 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- 1083.
21. Sinichkin, Y. P., In Vivo Fluorescence Spectroscopy of the Human Skin: Experiments and Models. *Journal of Biomedical Optics* 1998, 3 (2), 201.
22. Gabarra Almeida Leite, M.; Maia Campos, P. M. B. G., Correlations between

- sebaceous glands activity and porphyrins in the oily skin and hair and immediate effects of dermocosmetic formulations. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2020, 19 (11), 3100-3106.
23. Ohshima, H.; Kinoshita, S.; Oyobikawa, M.; Futagawa, M.; Takiwaki, H.; Ishiko, A.; Kanto, H., Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek. *Skin Research and Technology* 2013, 19 (1), e238-e242.
24. Sano, T.; Kume, T.; Fujimura, T.; Kawada, H.; Moriwaki, S.; Takema, Y., The formation of wrinkles caused by transition of keratin intermediate filaments after repetitive UVB exposure. *Archives of Dermatological Research* 2004, 296 (8), 359-365.
25. (a) Machado, M.; Hadgraft, J.; Lane, M. E., Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *International Journal of Cosmetic Science* 2010, 32 (6), 397-409; (b) Plewig, G., Regional Differences of Cell Sizes in the Human Stratum Corneum Part II. Effects of Sex and Age. *Journal of Investigative Dermatology* 1970, 54 (1), 19-23.
26. Takahashi, M.; Tezuka, T., The content of free amino acids in the stratum corneum is increased in senile xerosis. *Archives of Dermatological Research* 2004, 295 (10), 448-452.
27. Kambayashi, H.; Odake, Y.; Takada, K.; Funasaka, Y.; Ichihashi, M., Involvement of changes in stratum corneum keratin in wrinkle formation by chronic ultraviolet irradiation in hairless mice. *Experimental Dermatology* 2003, 12, 22-27.
28. (a) Kligman, A. M., Perspectives and Problems in Cutaneous Gerontology. *Journal of Investigative Dermatology* 1979, 73 (1), 39-46; (b) Leveque, J. L.; Corcuff, P.; Rigal, J. d.; Agache, P., In Vivo Studies of the Evolution of Physical Properties of the Human Skin with Age. *International Journal of Dermatology* 1984, 23 (5), 322-329; (c) Conti, A.; Schiavi, M. E.; Seidenari, S., Capacitance, transepidermal water loss and causal level of sebum in healthy subjects in relation to site, sex and age. *International Journal of Cosmetic Science* 1995, 17 (2), 77-85; (d) Wilhelm, K. P., Skin aging. Effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Archives of Dermatology* 1991, 127 (12), 1806-1809.
29. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M. E., Gaussian-function-based deconvolution method to determine the penetration ability of petrolatum oil into in vivo human skin using confocal Raman microscopy. *Laser Physics* 2014, 24 (10).
30. El-Domyati, M.; Attia, S.; Saleh, F.; Brown, D.; Birk, D. E.; Gasparro, F.; Ahmad, H.; Uitto, J., Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology* 2002, 11 (5), 398-405.
31. (a) Levi, K.; Baxter, J.; Meldrum, H.; Misra, M.; Pashkovski, E.; Dauskardt, R. H., Effect of Corneodesmosome Degradation on the Intercellular Delamination of Human Stratum Corneum. *Journal of Investigative Dermatology* 2008, 128 (9), 2345-2347; (b) Kitajima, Y., Implications of normal and disordered remodeling dynamics of corneodesmosomes in stratum corneum. *Dermatologica Sinica* 2015, 33 (2), 58-63.

3. Evolution de la composition des lipides du Stratum Corneum avec l'âge

Afin de compléter les résultats discutés précédemment, et d'obtenir une caractérisation de l'ensemble des structures intervenant dans la fonction barrière cutanée, des prélèvements de *Stratum Corneum* ont été effectués. Après extraction, l'analyse des lipides réalisée par NP-LC/HRMS, nous a permis d'étudier la composition lipidique du SC, notamment les céramides, afin de mettre en évidence des modifications de la fonction barrière cutanée. Le Tableau 7 présentent les hypothèses d'identification liées aux différents céramides augmentant significativement ($n=12$, $pV<0,01$), dans le cas du vieillissement cutané. Nous avons pu observer que cette augmentation impacte uniquement des sous-classes de céramides estérifiés, et concerne principalement le nombre d'hydroxylations ainsi que la longueur de la chaîne des céramides. En effet, cette augmentation impacte les sous-classes de céramides ayant les bases sphingoïdes les plus hydroxylées telles que H, P ou T. Ces résultats sont concordants avec ceux présents dans la littérature à ce jour, montrant également une augmentation des sous-classes H et P, comparé aux composés ayant une base sphingoïde S ou dS¹⁴⁶. Dans le cas de nos résultats, cette augmentation peut également concerner les sous-classes S et dS qui possèdent ici des hydroxylations supplémentaires en position α , ω , ou sur les deux positions. D'autre part, les céramides augmentant avec l'âge possèdent une longueur totale de la chaîne carbonée allant de C68 à C95. Nous avons également observé une tendance à l'augmentation des céramides saturés et mono-insaturés.

Tableau 7. Sous-classes de céramides **augmentant** significativement ($pV < 0.01$) chez les volontaires âgées, comparativement aux volontaires jeunes. Tr : Temps de rétention.

pValue	Tr (min)	m/z [M+Cl] ⁻	Formule brute	Hypothèses structurales
0.001	6.33	1473.4	C ₉₅ H ₁₈₇ O ₆ NCl	1-O-ENdS+α(OH)+ω(O) 95:1
				1-O-EAdS+ω(O) 95:1
				1-O-ENP+ω(O) 95:1
0.007	6.47	1445.37	C ₉₃ H ₁₈₃ O ₆ NCl	1-O-EAP 93:1
				1-O-ENdS+α(OH)+ω(O) 93:1
				1-O-EAdS+α(OH) ou ω(O) 93:1
0.004	7.35	1473.4	C ₉₅ H ₁₈₇ O ₆ NCl	1-O-ENP+α(OH) ou ω(O) 93:1
				1-O-EAP 95:1
				1-O-EAdS+α(OH) 95:1
0.009	7.92	1461.37	C ₉₃ H ₁₈₃ O ₇ NCl	1-O-ENP+α(OH) 95:1
				1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 93:1
				1-O-ENP+α(OH)+ω(O) 93:1
0.009	8.00	1429.34	C ₉₂ H ₁₇₉ O ₆ NCl	1-O-EAP+α(OH) ou ω(O) 93:1
				1-O-EOP 92:0
				1-O-EAP 92:2
0.009	8.28	1363.26	C ₈₆ H ₁₆₉ O ₇ NCl	1-O-ENdS+α(OH)+ω(O) 92:2
				1-O-EAdS+α(OH) ou ω(O) 92:2
				1-O-ENP+α(OH) ou ω(O) 92:2
0.009	8.28	1363.26	C ₈₆ H ₁₆₉ O ₇ NCl	1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 86:1
				1-O-ENP+α(OH)+ω(O) 86:1
				1-O-EAP+α(OH) ou ω(O) 86:1
0.003	8.38	1321.21	C ₈₃ H ₁₆₃ O ₇ NCl	1-O-EAT 83:1
				1-O-EAS+α(OH)+ω(O) 83:0
				1-O-ENH+α(OH)+ω(O) 83:0
				1-O-EAH+α(OH) ou ω(O) 83:0
0.009	10.40	1415.29	C ₉₀ H ₁₇₃ O ₇ NCl	1-O-ENT+α(OH) ou ω(O) 83:1
				1-O-E(EO)dS+α(OH) 90:0
				1-O-E(EO)P 90:0
0.003	10.87	1097	C ₆₈ H ₁₃₅ O ₆ NCl	1-O-EAP 68:0
				OT 68:1
				1-O-ENT 68:0
0.009	11.55	1415.29	C ₉₀ H ₁₇₃ O ₇ NCl	1-O-EAdS+α(OH) 68:0
				1-O-ENP+α(OH) 68:0
				1-O-E(EO)dS+α(OH) 90:0
0.003	11.67	1413.27	C ₉₀ H ₁₇₁ O ₇ NCl	1-O-E(EO)P 90:0
				1-O-E(EO)dS+α(OH) 90:1
				1-O-E(EO)S+α(OH) 90:0
				1-O-E(EO)P 90:1
				1-O-E(EO)H 90:0

Le Tableau 8 présente, quant à lui, les hypothèses d'identification liées aux céramides diminuant significativement ($pV < 0,01$, $n=14$) avec l'âge. De la même manière que les résultats présents dans la littérature¹⁴⁶, nous avons observé une diminution des céramides majoritairement peu hydroxylés avec une diminution des sous-classes **S** et **dS**, ou encore de céramides ne possédant pas d'hydroxylation supplémentaire en position α ou ω . D'autre part, contrairement à la longueur de la chaîne des céramides augmentant significativement, nous avons ici observé une diminution des céramides possédant une chaîne carbonée plus courte, allant de C34 à C87. Nous avons également observé une tendance à la diminution des céramides possédant une double insaturation.

Tableau 8. Sous-classes de céramides **diminuant** significativement ($pV < 0,01$) dans les volontaires âgées, comparativement aux volontaires jeunes. Tr : Temps de rétention.

pValue	Tr (min)	m/z [M+Cl] ⁻	Formule brute	Hypothèses structurales
0.004	3.22	1231.11	C ₇₈ H ₁₄₉ O ₆ NCl	1-O-EAS+ ω (O) 78:2
				1-O-ENH+ ω (O) 78:2
0.008	6.68	1199.03	C ₇₆ H ₁₄₁ O ₆ NCl	1-O-E(EO)dS 76:2
0.002	7.55	862.74	C ₅₄ H ₁₀₁ O ₄ NCl	1-O-ENS 54:2
				EoS 52:0
				1-O-EAdS 52:2
0.001	7.60	852.72	C ₅₂ H ₉₉ O ₅ NCl	1-O-ENP 52:2
				1-O-ENdS+ α (OH) 52:2
0.005	7.68	808.7	C ₅₀ H ₉₅ O ₄ NCl	1-O-ENdS 50:2
0.007	7.73	780.66	C ₄₈ H ₉₁ O ₄ NCl	OS 48:2
				1-O-ENS 48:1
0.002	7.82	794.68	C ₄₉ H ₉₃ O ₄ NCl	OS 49:2
				1-O-ENS 49:1
0.006	7.82	834.71	C ₅₂ H ₉₇ O ₄ NCl	1-O-ENS 52:2
0.001	7.87	806.68	C ₅₀ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 50:2
0.002	8.22	1369.21	C ₈₇ H ₁₆₃ O ₇ NCl	1-O-E(EO)dS+ α (OH) 87:2
				1-O-E(EO)P 87:2
				1-O-EAP 49:0
0.004	11.65	830.7	C ₄₉ H ₉₇ O ₆ NCl	OT 49:1
				1-O-EAdS+ α (OH) 49:0
				1-O-ENP+ α (OH) 49:0
0.006	13.05	824.69	C ₅₀ H ₉₅ O ₅ NCl	OH 50:2
0.001	13.07	752.63	C ₄₆ H ₈₇ O ₄ NCl	AS 46:2
				OS 46:2
				NH 46:2
				AdS 34:2
0.003	19.00	586.46	C ₃₄ H ₆₅ O ₄ NCl	AS 34:1
				NP 34:2
				NH 34:1

Plusieurs études ont auparavant montré l'importance des lipides et notamment des céramides dans le maintien d'une fonction barrière cutanée optimale^{67,91}. Les principales modifications observées au cours de cette étude dans la composition de ces céramides fait notamment intervenir des caractéristiques importantes dans cette fonction barrière : une augmentation des céramides estérifiés, possédant un rôle important dans le maintien de cette fonction barrière^{67,68} ; ainsi qu'une augmentation des céramides possédant une longue chaîne, dont le rôle est également primordial dans le maintien de cette fonction^{211,212}.

4. Conclusion : Principales adaptations ayant lieu au niveau de la barrière cutanée avec l'âge

Cette étude nous a permis de mettre en évidence de nombreuses et importantes adaptations ayant lieu au niveau de la barrière cutanée, notamment au niveau du film hydrolipidique et du *Stratum Corneum* dans la peau des femmes âgées de plus de 70 ans. Les résultats obtenus montrent des évolutions à différents niveaux. Concernant la surface cutanée, nous avons pu observer une diminution du taux de sébum, ainsi qu'une diminution de la majorité des composants des LCS à la surface de la peau. Des modifications au niveau de la composition des LCS ont également été mises en évidence avec notamment une augmentation du taux de 2,3-oxidosqualène ainsi qu'une augmentation de l'hydrolyse des triglycérides. Ces 2 évolutions pourraient mettre en avant des modifications au niveau enzymatique et par conséquent des modifications au niveau du microbiote cutané. Avec l'âge, le *Stratum Corneum* semble également subir des modifications importantes afin de maintenir une fonction barrière optimale. Malgré une diminution de la quantité de lipides observée grâce à la spectroscopie Raman, cohérente avec celle observée à la surface de la peau au niveau du sébum et des LCS, les lipides présents à la surface du SC possèdent une organisation plus compacte chez les sujets âgés. L'augmentation de l'épaisseur du SC, pouvant être liée à une diminution de la desquamation montre également une adaptation majeure. D'autre part, les céramides, composants essentiels du ciment intercornéocytaire, possèdent des longueurs de chaînes carbonées plus importantes et possèdent une estérification plus élevée, impactant tous deux la fonction barrière cutanée. Ces différentes modifications confèrent une fonction barrière optimale, observée également à travers la

diminution de la perte en eau trans-épidermique (PIE), ainsi que l'augmentation de la quantité d'eau totale au sein du SC chez les sujets âgés.

En parallèle, une augmentation de l'hydroxylation des céramides du SC a été observée. Cette augmentation d'hydroxylation pourrait offrir davantage de sites disponibles pour des liaisons hydrogènes, entraînant ainsi une augmentation de l'apport en eau liée observée avec la spectroscopie Raman. De plus, les νOH correspondant aux groupements hydroxyles possèdent un nombre d'onde apparaissant dans la même gamme que l'eau fortement liée ($3100 - 3350 \text{ cm}^{-1}$). L'augmentation observée de l'eau liée dans le cas du vieillissement cutané pourraient alors correspondre également à la contribution de l'augmentation des hydroxylations observée au niveau de céramides. En revanche, nous n'avons pas, à ce stade, la possibilité *in vivo* d'attribuer les OH mesurés grâce à la spectroscopie Raman aux céramides hydroxylés, à l'eau liée ou aux deux.

L'ensemble de ces résultats concernant la composition, l'organisation et la structure des céramides au sein du SC mettent clairement en évidence une adaptation cutanée allant dans le sens d'un renforcement de la fonction barrière cutanée primordiale, chez les femmes de plus de 70 ans.

De plus, outre la mise en place et l'optimisation de l'étude suivante portant sur une population ayant une peau pathologique, cette étude a permis d'apporter des informations complémentaires essentielles concernant l'évolution de la fonction barrière cutanée dans le cas du vieillissement. Les résultats nous ont également montré l'importance d'une approche multiparamétrique, impliquant l'association d'informations issues de différentes techniques afin d'aboutir à une caractérisation et une compréhension complète de la biologie cutanée.

Chapitre 2 : Impact de l'hyperséborrhée et de l'acné sur la fonction barrière cutanée

L'acné est une maladie inflammatoire cutanée représentant une préoccupation majeure chez les adolescents mais également chez les adultes où elle possède une grande prévalence avec environ 40% de femmes concernées. Cette pathologie pouvant être associée à un réel mal-être, son étude ainsi que sa compréhension représentent un intérêt majeur afin de proposer des solutions dermo-cosmétiques accessibles aux personnes concernées par des problématiques de peau grasse ou de peau à tendance acnéique (faibles grades d'acné). Dans cet objectif, une étude multiparamétrique a été mise en place au cours de cette thèse afin d'obtenir une caractérisation la plus complète possible des modifications ayant lieu dans le cas de l'hyperséborrhée et de l'acné, plus particulièrement au niveau des lipides cutanés de surface et des lipides du *Stratum Corneum*.

1. Matériel & Méthodes

L'étude portant sur une population pathologique, une demande d'autorisation à un Comité de Protection des Personnes (CPP) a été réalisée en amont. Afin de répondre aux exigences légales demandées, notamment en termes d'autorisation de lieu et de présence d'un médecin dermatologue pour le recrutement des volontaires et la réalisation des mesures, cette étude a été réalisée au sein d'une entreprise spécialisée dans les études cliniques (Intertek).

a. Panel de volontaires

Le recrutement des volontaires a été effectué par la société Intertek, sous contrôle dermatologique. Les différents critères d'inclusion et d'exclusion utilisés pour le recrutement ont été précédemment détaillés dans la partie « I. Mise en place des études *in vivo* ; 4. Critères d'inclusion et d'exclusion », page 96.

L'étude a été réalisée sur 60 sujets féminins, caucasiens³³¹ (phototype II à IV), âgées de 18 à 30 ans :

- **Groupe 1** : 20 femmes ayant la peau normale
- **Groupe 2** : 20 femmes ayant la peau grasse (au toucher et visuellement) pouvant

correspondre au grade 0 ou 1 de la classification GEA²⁴⁶,

- **Groupe 3** : 20 femmes présentant une acné légère à modérée : grade 2 ou 3 de la classification GEA²⁴⁶.

b. Conditions environnementales

Les séances de mesure ont été réalisées dans une salle d'étude ayant des conditions environnementales contrôlées avec une température de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ et un taux d'humidité relative de $50 \pm 10\%$.

c. Déroulement des mesures

Afin d'obtenir une caractérisation la plus complète possible, différentes mesures et analyses ont été réalisées sur la zone du front. Des analyses d'image ont également été réalisées sur la zone de la joue, afin de comparer les résultats obtenus sur les deux zones. Les principes et paramètres des différentes techniques évoquées dans ce chapitre ont été détaillés précédemment dans la partie « Méthodes d'analyse et de caractérisation de la peau », page 64.

L'ordre de réalisation des mesures a été choisi afin d'optimiser la durée de l'étude, tout en prenant en compte les différentes caractéristiques et exigences de chaque technique utilisée :

- 1. Réalisation de 4 photographies du visage entier avec le VISIA-CR, dans différentes conditions de lumière : standard, polarisée croisée (CP), polarisée parallèle (PP) et lumière UVA.
- 2. Délimitation des zones de mesures à l'aide d'un masque puis réalisation du prélèvement de sébum et des mesures biométriques (Figure 38).

L'ensemble des mesures suivantes a été réalisé sur la zone du front, la ligne médiane permettant de séparer 2 zones de mesures :

- o Un côté dédié aux prélèvements du sébum (Annexe 1)
- o Un côté dédié aux mesures biométriques (toutes les sondes proviennent de Courage & Khazaka, Cologne, Allemagne) : Tewamètre TM300 (2 mesures

adjacentes), Sébumètre SM815 (2 mesures adjacentes), Cornéomètre CM825 (3 mesures adjacentes), pH-mètre PH905 (2 mesures adjacentes).

Le côté de prélèvement de sébum a été alternativement à droite puis à gauche en suivant l'ordre d'inclusion des sujets dans chacun des 3 groupes.

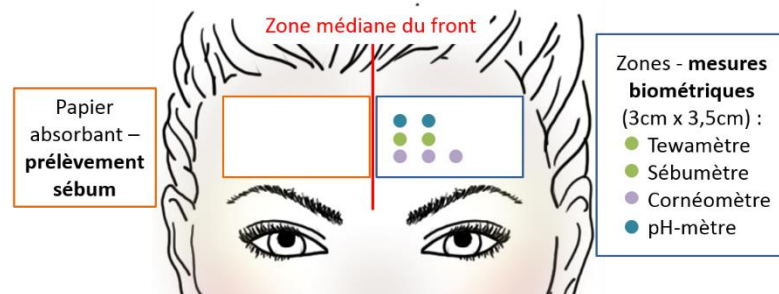


Figure 38. Zones de réalisation du prélèvement de sébum et des mesures biométriques

- Délimitation de la zone (7 x 3,5cm, Figure 39) puis prélèvement du *Stratum Corneum* par écouvillonnage (Annexe 2).



Figure 39. Zone de prélèvement du Stratum Corneum

d. Analyse des échantillons

Après avoir été prélevés, les lipides contenus dans les échantillons de sébum et de *Stratum Corneum* ont été extraits et analysés selon les protocoles détaillés respectivement dans les parties « Mise en place des analyses des LCS par HT-GC/MS » (page 101) et « Mise en place des analyses des lipides du SC par NPLC/HR-MS » (page 104).

Proportion des classes lipidiques au sein de la totalité des LCS

Comme évoqué dans la partie méthodologie, le taux relatif de chaque classe lipidique a été estimé en utilisant la normalisation par le coefficient de réponse (K)³³⁴.

Le Tableau 9 présente les coefficients de réponse (K) obtenus pour chaque classe lipidique

dans le cas des analyses réalisées en HT-GC/MS pour l'étude portant sur l'acné.

Tableau 9. Coefficients de réponse (K) associé à chaque classe lipidique, obtenus par analyses en HT-GC/MS dans le cas de l'étude sur l'acné.

Classe lipidique	Standard	Formule chimique	K (moyenne ± SEM)
Acides Gras Libres	Acide Palmitique	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.864 ± 0.061
Monoglycérides	1-Monostéarine	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	0.291 ± 0.023
Hydrocarbures	Squalène	C ₃₀ H ₅₀	5.335 ± 0.704
Epoxydes d'hydrocarbures	2,3-oxidosqualène	C ₃₀ H ₅₀ O	1.968 ± 0.155
Stérols	Cholestérol	C ₂₇ H ₄₆ O	0.860 ± 0.088
Cires	Acide Arachidique – Lauryl Ester	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	1.358 ± 0.203
Diglycérides	Dipalmitine	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	0.648 ± 0.097
Esters de cholestérol	Cholesteryl palmitate	C ₄₃ H ₇₆ O ₂	2.549 ± 0.308
Triglycérides	Tripalmitine	C ₅₁ H ₉₈ O ₆	2.806 ± 0.583

2. Résultats : Impact de l'hyperséborrhée et de l'acné sur les paramètres de surface cutanée

a. Evolution du taux de porphyrine

L'évaluation du taux de porphyrine totale à la surface de la peau grâce à une analyse des images obtenus en lumière UVA, nous a permis de mettre en évidence une **augmentation significative** du taux de porphyrine totale sur le front, entre les sujets ayant la peau normale (groupe 1) et les sujets ayant la peau acnéique (groupe 3) (Figure 40). Une augmentation significative du taux de porphyrine totale a également été observée sur la zone du front entre les sujets ayant la peau normale (groupe 1) et la peau grasse (groupe 2). Les sujets ayant une peau grasse et une peau acnéique ne présentent pas de différences significatives au niveau du taux de porphyrine totale sur le front.

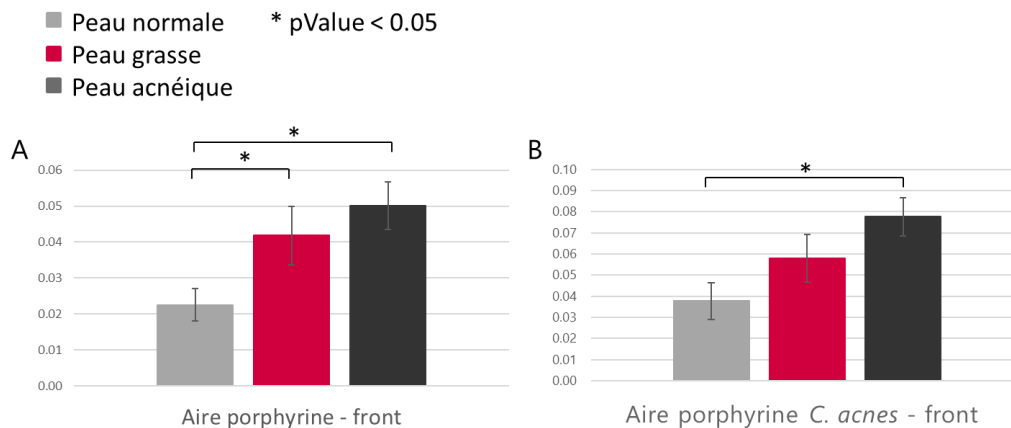


Figure 40. Evolution du taux de porphyrine totale (A) et du taux de porphyrine liée à *C. acnes* (B) dans le cas de la peau normale, de la peau grasse et de la peau acnéique, sur la zone du front. Moyenne \pm SEM.

Des analyses complémentaires ont permis d'analyser le taux de porphyrine associé plus particulièrement à la présence de *C. acnes* (Figure 40). Nous avons pu observer une augmentation significative du taux de porphyrine associée à *C. acnes* sur le front entre les groupes de sujets ayant la peau saine et ceux ayant la peau acnéique. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les sujets ayant la peau normale comparés aux sujets ayant la peau grasse.

Ces résultats nous ont permis d'observer que l'augmentation significative du taux de porphyrine totale impacte les sujets ayant la peau grasse ainsi que les sujets ayant la peau acnéique alors que l'augmentation de la porphyrine liée à *C. acnes* semble plus spécifique des peaux acnéiques. Cela confirme l'implication de *C. acnes* dans la physiopathologie de l'acné³³⁶.

b. Evolution de la brillance spéculaire

L'analyse de la brillance spéculaire, couramment associée à l'effet « gras » de la peau, a permis de mettre en avant une augmentation significative au niveau du front chez les sujets ayant la peau grasse, comparativement aux sujets ayant la peau normale (Figure 41).

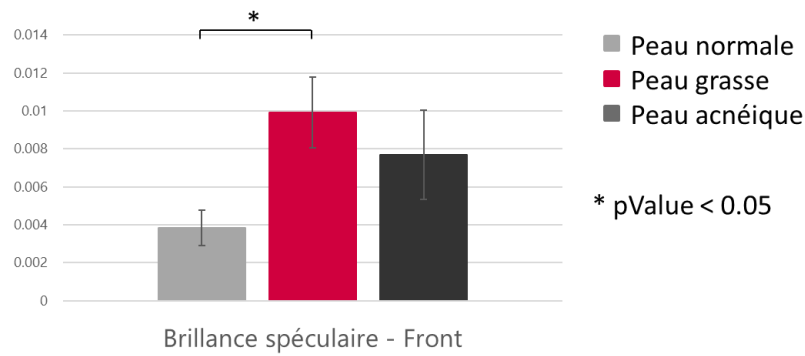


Figure 41. Evolution de la brillance spéculaire dans le cas de la peau normale, de la peau grasse et de la peau acnéique

En revanche, nous n’avons pas observé de différence significative du taux de cette brillance spéculaire chez les sujets ayant la peau acnéique, que ce soit comparé aux sujets ayant la peau normale ou à ceux ayant la peau grasse.

Ces résultats suggèrent que l’effet brillant de la peau serait plutôt associé aux modifications ayant lieu dans le cas de la peau grasse que dans les problématiques de peau acnéique.

c. Evolution des paramètres biométriques

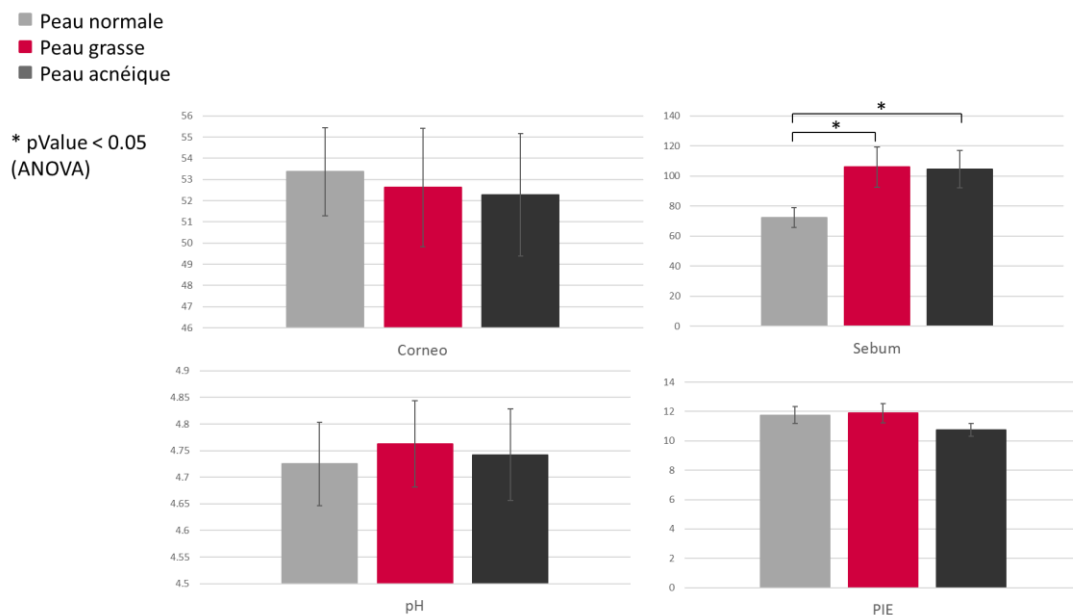


Figure 42. Evolution des paramètres biométriques sur le front de sujets ayant la peau normale, la peau grasse et la peau acnéique.

Les mesures biométriques nous ont permis d'observer qu'il n'y avait pas de différences de taux d'hydratation, de pH ou encore de PIE entre les trois groupes étudiés. En revanche, nous avons observé une augmentation significative du taux de sébum à la surface de la peau entre les groupes de sujets ayant la peau normale et ceux ayant la peau grasse, et entre les groupes de sujets ayant la peau normale et ceux ayant la peau acnéique (Figure 42). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans la littérature^{48,176}. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les sujets ayant la peau grasse et ceux ayant la peau acnéique.

3. Evolution quantitative et qualitative des Lipides Cutanés de Surface (sébum)

Afin de compléter la caractérisation des différents types de peaux : normales, grasses et acnéiques, la totalité des lipides cutanés de surface (LCS) détectés ont été identifiés individuellement, selon les fragmentations présentées dans le Tableau 6 pour chaque classe lipidique. Cette identification de la totalité de nos composés obtenus (n = 269) nous a permis d'observer la répartition de chaque classe lipidique au sein des LCS, pour chaque groupe, après normalisation par le coefficient de réponse. Dans un second temps, les variations de chaque composé pris individuellement ont été étudiées afin de mettre en avant les LCS caractéristiques des différents types de peau.

a. Evolution de la composition des LCS entre la peau normale et la peau grasse

Afin d'étudier les modifications ayant lieu au niveau de la composition des LCS dans le cas de la peau grasse, les intensités de chaque classe lipidique des LCS, ainsi que leur pourcentage ont été analysés. L'évolution de l'intensité absolue de chaque lipide considéré individuellement a également été obtenue suite à la normalisation par l'étalon interne. La Figure 43 représente l'évolution de l'intensité **absolue** de chaque classe lipidique dans le cas de la peau grasse, comparée à la peau normale. Ces résultats nous ont permis d'observer une augmentation significative de l'intensité absolue des diglycérides, des acides gras libres, des cires, des esters de cholestérol ainsi que du 2,3-oxidosqualène (SqO) et du squalène

monohydroperoxyde (SqOOH).

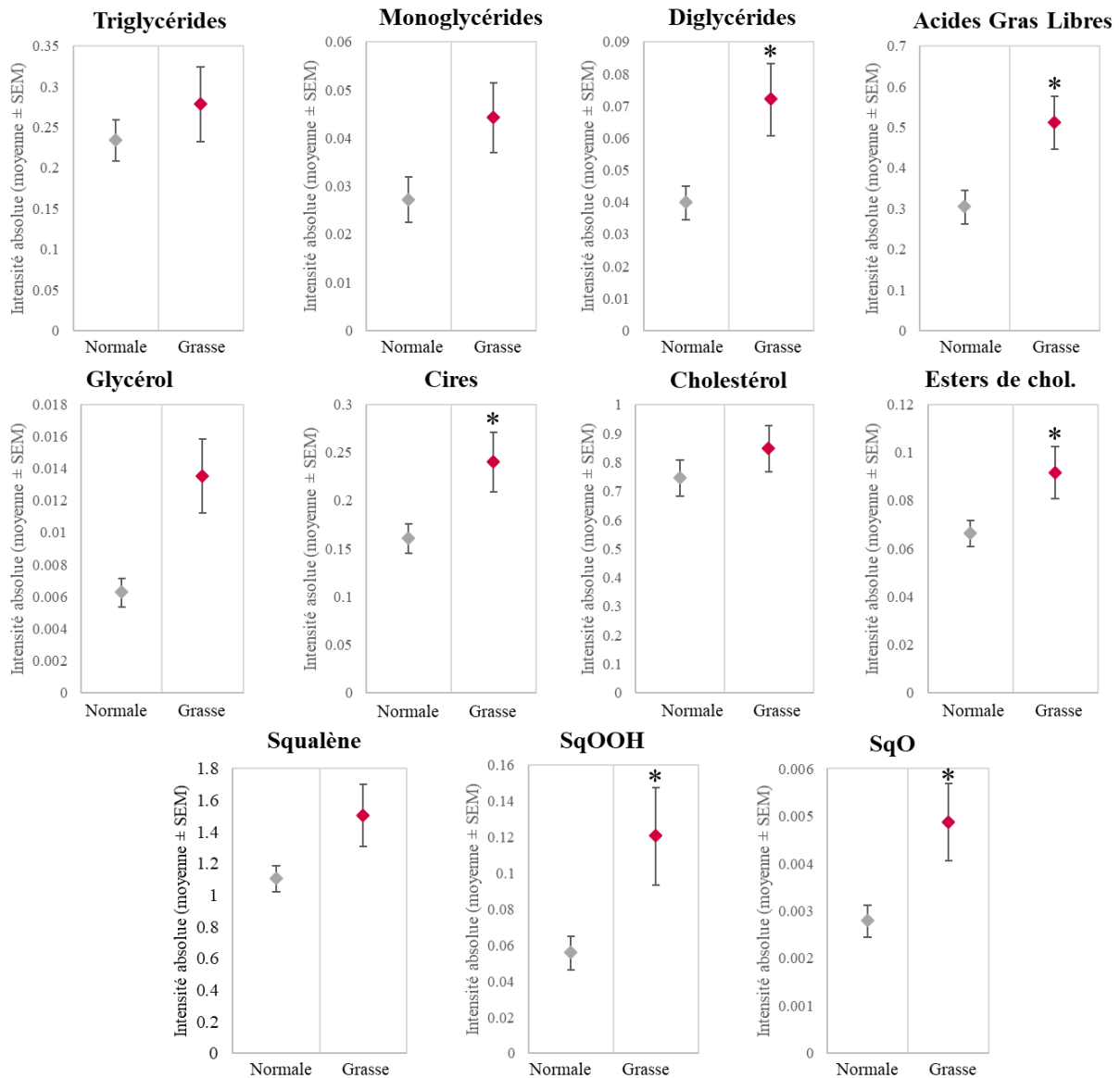


Figure 43. Evolution de l'intensité absolue (moyenne \pm SEM) de chaque classe lipidique présente au sein des LCS, entre la peau normale et la peau grasse. SqO : 2,3-oxidosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde. * $pV < 0.05$ (ANOVA).

La Figure 44 montre elle, le **pourcentage** (\pm SEM) que représente chaque classe lipidique au sein de la totalité des LCS. Une diminution significative de la proportion des TG ainsi qu'une augmentation significative de la proportion des cires ont été observées. Une tendance à l'augmentation ($pV < 0,1$) du taux des AGL ainsi que celui du glycérol ont également été observées. Cette diminution du taux de TG malgré le maintien de leur quantité absolue, ainsi que l'augmentation du taux de leurs produits d'hydrolyse : glycérol et AGL, tendent à

montrer une augmentation de l'hydrolyse des TG par les microorganismes^{28,48,209}.

A

	Peau normale (moyenne ± SEM)	Peau grasse (moyenne + SEM)	pValue (Anova)
Triglycérides	45.59 ± 1.88	40.12 ± 1.93	0.05
Acides Gras Libres	11.38 ± 1.35	14.73 ± 1.38	0.09
Monoglycérides	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.30
Diglycérides	0.74 ± 0.07	1.01 ± 0.17	0.13
Glycérol	0.011 ± 0.002	0.018 ± 0.004	0.10
Cires	20.83 ± 0.64	23.14 ± 0.82	0.03
Esters de cholestérol	1.78 ± 0.08	1.81 ± 0.11	0.79
Cholestérol	1.02 ± 0.09	0.87 ± 0.06	0.20
Squalène	18.22 ± 1.07	17.69 ± 0.81	0.70
SqO	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.16
SqOOH	0.32 ± 0.06	0.45 ± 0.09	0.22

B

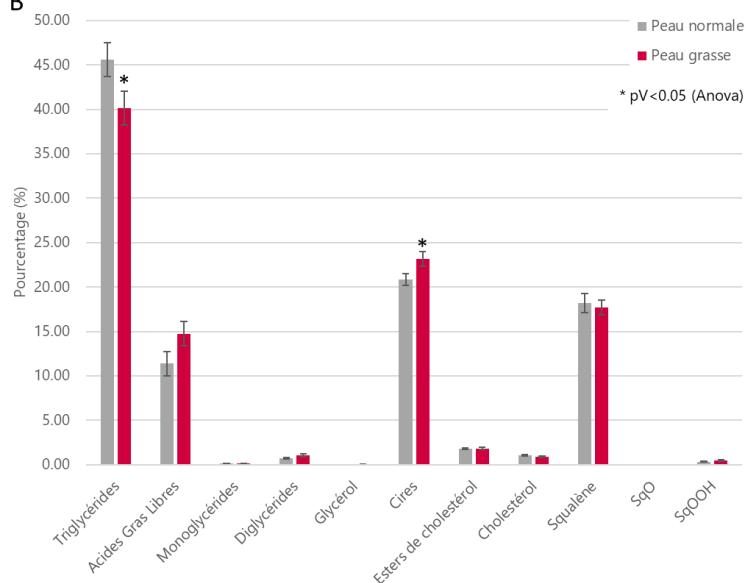


Figure 44. Tableau (A) et histogramme (B) présentant les proportions représentées par chaque classe lipidique au sein de la totalité du film hydrolipidique (FHL), chez les sujets ayant la peau normale et la peau grasse. Barre d'erreur : SEM associé à la classe correspondante. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde

L'évolution de chaque composé considéré individuellement a également été étudiée entre les groupes d'intérêt. La réalisation d'une ANOVA ($pV < 0.05$) sur la totalité des LCS détectés et identifiés nous a permis de mettre en évidence 90 composés augmentant significativement au sein des LCS des sujets ayant la peau grasse, comparés à ceux ayant la peau normale, dont l'identification est présentée dans le Tableau 10.

Tableau 10. Composés lipidiques identifiés comme augmentant significativement ($pV < 0,05$) chez les sujets ayant la peau grasse, comparés aux sujets ayant la peau normale, après analyses par HT-GC/MS.

Tr (min)	m/z	Identification	Tr (min)	m/z	Identification
5.25	309	Glycérol	Cires (suite)		
Acides Gras Libres			50.90	538	C ₃₅ H ₆₈ O ₂
12.95	274	C12:0 – Ac. laurique	51.20	549	C ₃₇ H ₇₂ O ₂
13.70	288	C13:0 – Ac. tridécanoïque	52.12	568	C ₃₇ H ₇₄ O ₂
14.27	288	C13:0 – Ac. tridécanoïque	53.30	561	C ₃₈ H ₇₂ O ₂
14.50	285	C13:1 – Ac. tridécenoïque	53.72	563	C ₃₈ H ₇₄ O ₂
14.97	288	C13:0 – Ac. tridécanoïque	54.08	582	C ₃₈ H ₇₆ O ₂
15.08	302	C14:0 – Ac. myristique	54.57	575	C ₃₉ H ₇₄ O ₂
16.45	299	C14:1 – Ac. tétradécenoïque	54.67	563	C ₃₈ H ₇₄ O ₂
16.97	302	C14:0 – Ac. myristique	55.08	577	C ₃₉ H ₇₆ O ₂
18.18	316	C15:0 – Ac. pentadécanoïque	55.93	596	C ₃₉ H ₇₈ O ₂
18.32	313	C15:1 – Ac. pentadécenoïque	55.98	591	C ₄₀ H ₇₈ O ₂
18.85	316	C15:0 – Ac. pentadécanoïque	56.13	575	C ₃₉ H ₇₄ O ₂
19.58	330	C16:0 – Ac. palmitique	56.22	585	C ₄₀ H ₇₂ O ₂
20.15	327	C16:1 – Ac. sapiénique	56.23	589	C ₄₀ H ₇₆ O ₂
20.73	330	C16:0 – Ac. palmitique	56.53	587	C ₄₀ H ₇₄ O ₂
21.35	344	C17:0 – Ac. heptadécanoïque	56.73	591	C ₄₀ H ₇₈ O ₂
21.90	341	C17:1 – Ac. heptadécenoïque	57.07	589	C ₄₀ H ₇₆ O ₂
22.45	344	C17:0 – Ac. heptadécanoïque	57.47	591	C ₄₀ H ₇₈ O ₂
23.18	353	C18:2 – Ac. linoléique	57.78	610	C ₄₀ H ₈₀ O ₂
23.62	355	C18:1 – Ac. oléique	58.27	603	C ₄₁ H ₇₈ O ₂
24.78	353	C18:2 – Ac. linoléique	58.42	601	C ₄₁ H ₇₆ O ₂
25.23	369	C19:1 – Ac. nonadécenoïque	58.72	605	C ₄₁ H ₈₀ O ₂
26.48	381	C20:2 – Ac. eicosadiénoïque	59.03	603	C ₄₁ H ₇₈ O ₂
Monoglycérides			59.35	605	C ₄₁ H ₈₀ O ₂
26.65	357	C14:0	59.62	624	C ₄₁ H ₈₂ O ₂
28.15	371	C15:0	59.70	603	C ₄₁ H ₇₈ O ₂
30.08	399	C17:0	59.87	613	C ₄₂ H ₇₆ O ₂
30.58	397	C17:1	60.13	615	C ₄₂ H ₇₈ O ₂
Hydrocarbures			60.33	619	C ₄₂ H ₈₂ O ₂
33.25	442	Squalène monohydroperoxyde (SqOOH)	60.70	617	C ₄₂ H ₈₄ O ₂
33.63	427	2,3-oxydosqualène (SqO)	61.12	619	C ₄₂ H ₈₂ O ₂
Cires			62.02	631	C ₄₃ H ₈₂ O ₂
35.08	442	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	62.55	631	C ₄₃ H ₈₂ O ₂
36.75	456	C ₂₉ H ₅₈ O ₂	63.72	643	C ₄₄ H ₈₆ O ₂
38.53	470	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	64.02	647	C ₄₄ H ₉₀ O ₂
39.33	465	C ₃₁ H ₆₀ O ₂	64.25	645	C ₄₄ H ₈₄ O ₂
39.67	484	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	64.87	666	C ₄₄ H ₉₂ O ₂
40.38	484	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	Diglycérides		
42.35	498	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	50.77	385	/
43.27	493	C ₃₃ H ₆₄ O ₂	51.08	535	/
44.25	512	C ₃₃ H ₆₆ O ₂	52.45	557	/
46.23	526	C ₃₄ H ₆₈ O ₂	56.38	413	/
47.18	521	C ₃₅ H ₆₈ O ₂	60.15	605	/
47.48	540	C ₃₅ H ₇₀ O ₂	Esters de cholestérol		
48.20	540	C ₃₅ H ₇₀ O ₂	61.52	369	/
49.47	554	C ₃₆ H ₇₂ O ₂	66.17	369	/
50.23	554	C ₃₆ H ₇₂ O ₂	73.40	369	/
50.70	547	C ₃₇ H ₇₀ O ₂			

Afin de faciliter la représentation des variations obtenues, la Figure 45 met en avant les composés dont l'intensité **absolue** augmente significativement ($p\text{Value} < 0.05$) chez les peaux grasses, comparées aux peaux normales, en prenant en compte leur abondance au sein des LCS (intensité moyenne de chaque composé) ainsi que leur taux de variation entre les deux groupes étudiés. Ainsi, plus les barres obtenues sont élevées, plus les molécules présentent une abondance et un taux de variation important entre peau normale et peau grasse. En jaune sont représentés les composés « spécifiques » de la peau grasse. Ces composés ne varient pas significativement entre les groupes de sujets ayant la peau normale et ceux ayant la peau acnéique (résultats présentés dans la partie suivante).

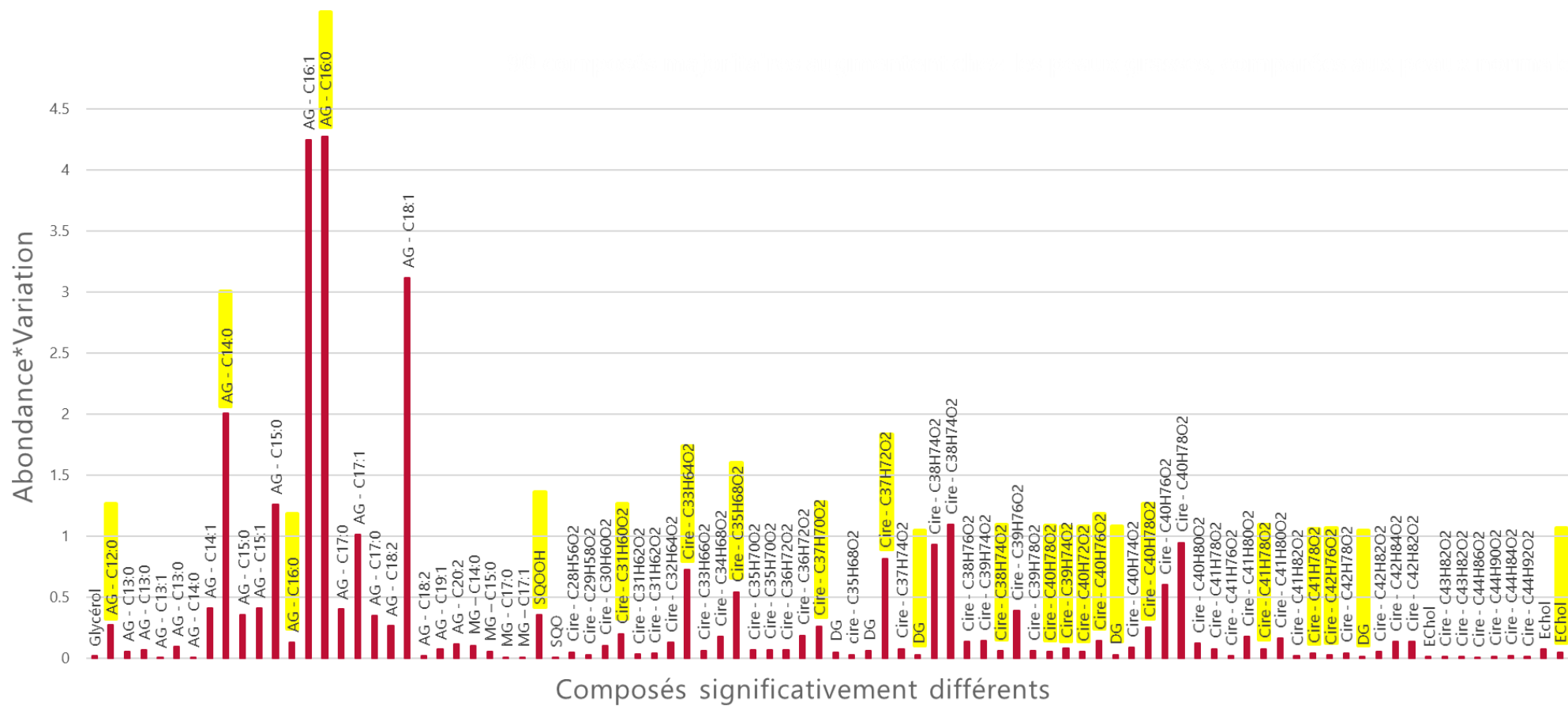


Figure 45. Histogramme représentant les composés des LCS dont l'intensité augmente significativement chez les sujets ayant la peau grasse, comparé aux sujets ayant la peau saine. L'intensité considérée prend en compte l'abondance et la variation de chaque composé. AG : acide gras ; SqO : 2,3-oxydosqualène ; DG : diglycéride ; EChol : ester de cholestérol.

Ces résultats nous ont permis d'observer que tous les composés variant significativement chez les peaux grasses augmentent. D'autre part, cette augmentation concerne majoritairement les acides gras parmi lesquels l'acide palmitique (C16:0), l'acide sapiénique (C16:1), l'acide myristique (C14:0) représentent une variation majeure. Cependant, cette augmentation touche l'ensemble des AGL qui peuvent être saturés, monoinsaturés ou doublement insaturés, compris entre l'acide laurique (C12:0) et l'acide eicosadiénoïque (C20:2), ainsi que de nombreuses cires. L'augmentation significative de l'intensité absolue du glycérol ainsi que celle de la majorité des AGL permet de confirmer l'augmentation de l'hydrolyse des TG chez les sujets ayant la peau grasse.

En revanche, l'augmentation de certains lipides tels que l'acide palmitique (C16:0), l'acide myristique (C14:0), l'acide laurique (C12:0), le monopalmitine (MG-C16:0) ou encore le squalène monohydroperoxyde (SqOOH) semble être spécifique des peaux grasses. En effet, la quantité absolue de ces composés au sein des LCS n'est pas modifiée significativement dans la peau acnéique.

Dans le cas de la peau grasse, nous avons observé une augmentation de la brillance spéculaire, que nous n'avons pas observée au sein de la peau acnéique, malgré l'augmentation du taux de sébum pour chacune de ces deux populations. Afin de comprendre ce résultat, nous avons analysé plus finement la composition des LCS. Nous avons ainsi pu observer une augmentation significative ($pV < 0,05$) des cires possédant trois insaturations dans les peaux grasses comparées aux peaux normales (Figure 46.A). De plus, nous avons observé, au sein du groupe de sujet ayant la peau grasse, une corrélation importante (0,718) entre la brillance spéculaire et la quantité de cires possédant 3 insaturations (Figure 46.B). Ces résultats nous ont permis d'associer l'augmentation de la brillance spéculaire observée chez les sujets ayant la peau grasse à une modification de la composition des LCS, avec notamment une augmentation de la quantité des cires possédant trois insaturations.

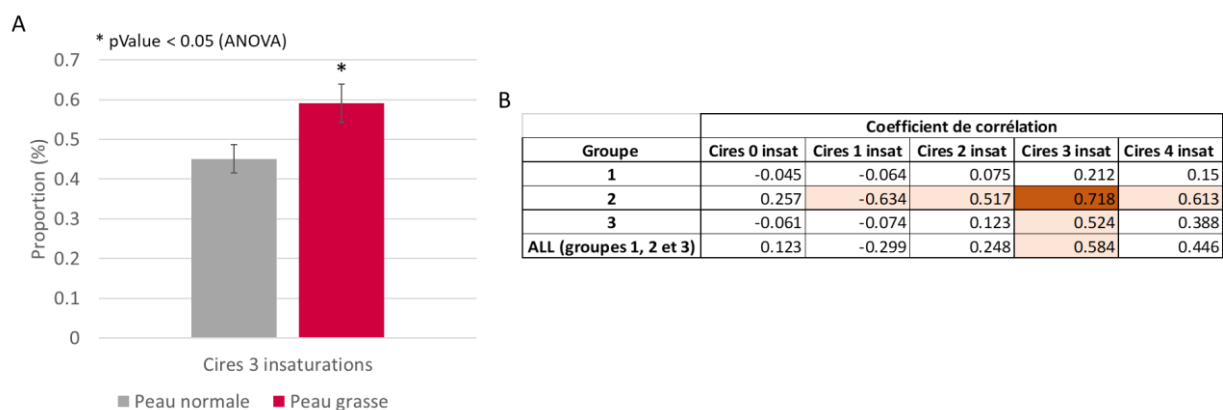


Figure 46. Evolution du nombre d'insaturations dans la classe lipidique des cires, selon les 3 groupes de volontaires. Groupe 1 : peau normale, groupe 2 : peau grasse (grade 0 et 1)²⁴⁶, groupe 3 : peau acnéique (grade 2 et 3)²⁴⁶

b. Evolution de la composition des LCS entre la peau normale et la peau acnéique

De la même manière que ce qui a été réalisé pour caractériser les LCS de la peau grasse, l'évolution des intensités de chaque classe lipidique des LCS, ainsi que de leurs pourcentages ont été analysés entre les peaux acnéiques et les peaux normales. L'évolution de l'intensité absolue de chaque lipide considéré individuellement a également été analysée dans le cas de l'acné. La Figure 47 représente l'évolution de l'intensité **absolue** de chaque classe lipidique dans le cas de la peau acnéique, comparée à la peau normale. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'intensité absolue des monoglycérides, des acides gras libres, du glycérol, des cires, des esters de cholestérol ainsi que du squalène et du 2,3-oxydosqualène (SqO).

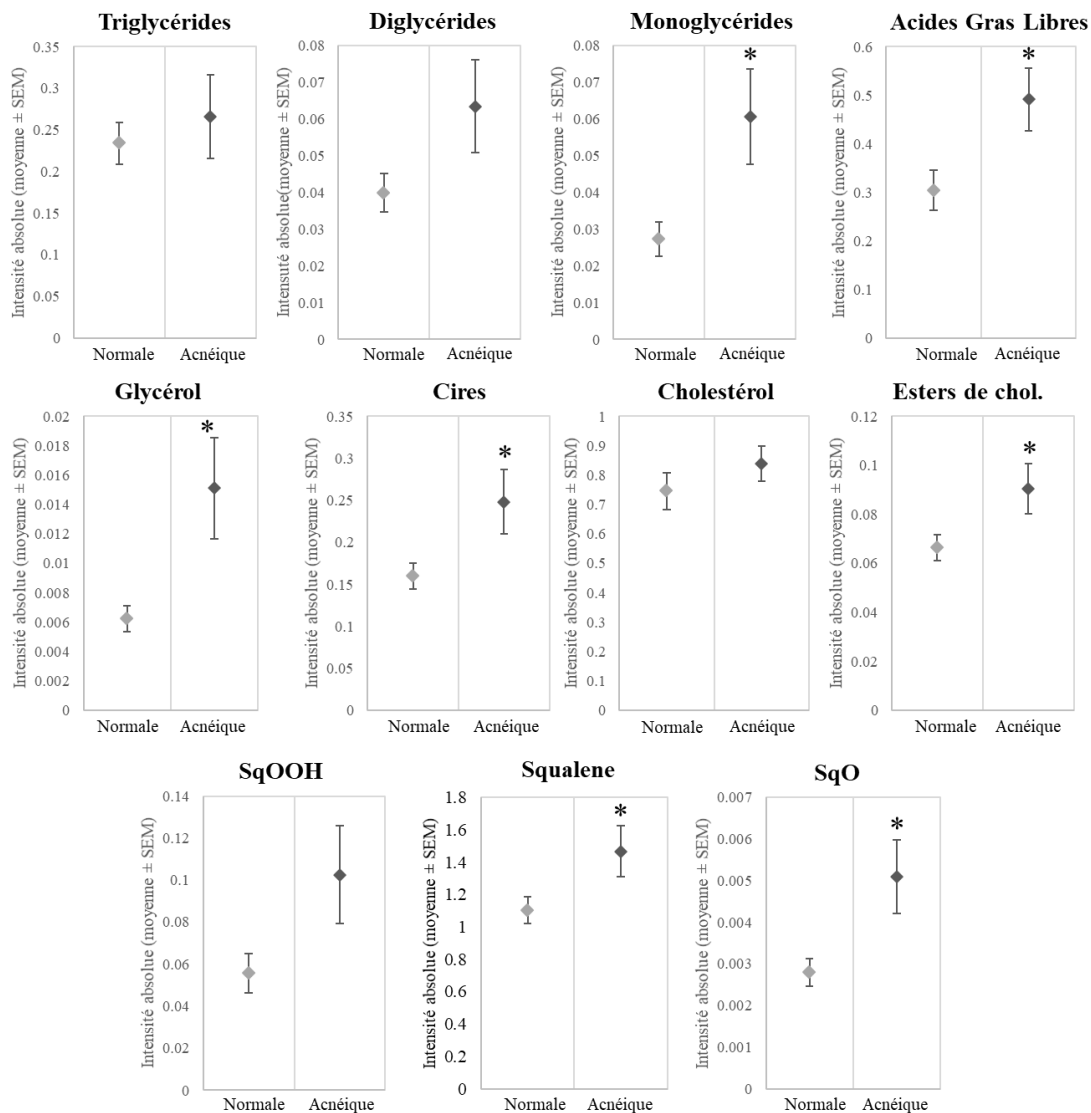


Figure 47. Evolution de l'intensité absolue (moyenne ± SEM) de chaque classe lipidique présente au sein des LCS, entre la peau normale et la peau grasse. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde. * $pV < 0.05$ (ANOVA).

Le **pourcentage** (moyenne ± SEM) de chaque classe lipidique au sein de la totalité des LCS est représenté dans la Figure 48. Les résultats obtenus dans le cas de la peau acnéique, comparée à la peau normale montrent une diminution significative de la proportion des TG ainsi qu'une augmentation significative de la proportion des cires. Une tendance à l'augmentation ($pV < 0,1$) a également été observée pour les AGL. Cette diminution du taux de TG, ainsi que l'augmentation des AGL peut être le témoin d'une augmentation de l'hydrolyse des TG par les micro-organismes, également évoquée dans la littérature^{28,48,209}. Ces résultats sont concordants avec d'autres études ayant également mis en avant une

augmentation de la quantité d'AGL au sein des peaux acnéiques^{28,201}. En revanche, ces études ont montré une modification du ratio acides gras insaturés / acides gras saturés^{193,202} que nous n'avons pas observée. En effet, nous n'avons pas obtenu de différence significative entre les proportions d'acides gras saturés et insaturés au sein des peaux acnéiques, comparées aux peaux normales. Dans ces études, l'augmentation notée des AGL insaturés a été associée à la gravité des manifestations cliniques de l'acné^{189,203}. Notre étude portant sur des faibles grades d'acné (grades 2 et 3 de la classification GEA²⁴⁶), cela pourrait expliquer les différences obtenues. Une augmentation significative du taux de 2,3-oxydosqualène (SqO), produit de peroxydation du squalène, a également été observée chez les sujets ayant la peau acnéique.

L'augmentation de la proportion des cires ainsi que l'augmentation de l'intensité relative de nombreuses d'entre elles (Tableau 11), pourrait être liée à l'augmentation des AGL¹⁹³. En effet, ils peuvent être facilement convertis en cires après catalyse par certaines enzymes²¹⁰.

A

	Peau normale (moyenne ± SEM)	Peau acnéique (moyenne ± SEM)	pValue (Anova)
Triglycérides	45.59 ± 1.88	38.46 ± 2.70	0.04
Acides Gras Libres	11.38 ± 1.35	15.09 ± 1.98	0.13
Monoglycérides	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.04	0.08
Diglycérides	0.74 ± 0.07	0.83 ± 0.08	0.36
Glycérol	0.011 ± 0.002	0.018 ± 0.004	0.12
Cires	20.83 ± 0.64	23.84 ± 0.99	0.01
Esters de cholestérol	1.78 ± 0.08	1.85 ± 0.09	0.52
Cholestérol	1.02 ± 0.09	0.92 ± 0.06	0.36
Squalène	18.22 ± 1.07	18.33 ± 0.89	0.94
SqO	0.008 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.03
SqOOH	0.32 ± 0.06	0.47 ± 0.10	0.23

B

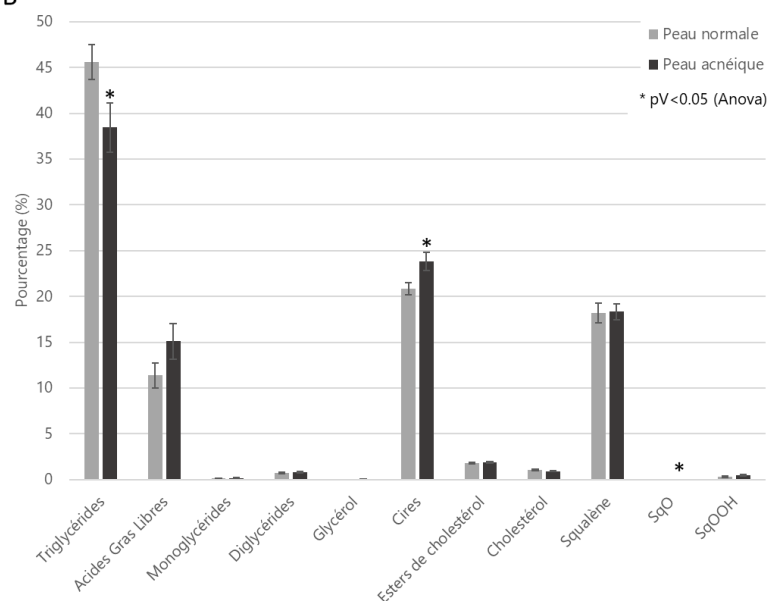


Figure 48. Tableau (A) et histogramme (B) présentant les proportions représentées par chaque classe lipidique au sein de la totalité du film hydrolipidique (FHL), chez les sujets ayant la peau normale et la peau acnéique. Barre d'erreur : SEM associé à la classe correspondante. SqO : 2,3-oxydosqualène, SqOOH : squalène monohydroperoxyde.

Le Tableau 11 regroupe les 76 composés lipidiques augmentant significativement (ANOVA, PV<0,05) au sein des LCS des sujets ayant la peau acnéique, comparés aux sujets ayant la peau normale.

Tableau 11. Composés lipidiques identifiés comme **augmentant** significativement ($pV < 0,05$) chez les sujets ayant la peau acnéique, comparés aux sujets ayant la peau normale, après analyses par HT-GC/MS.

<i>Tr (min)</i>	<i>m/z</i>	<i>Identification</i>	<i>Tr (min)</i>	<i>m/z</i>	<i>Identification</i>
5.25	309	Glycérol	Cires (suite)		
Acides Gras Libres			48.20	540	C ₃₅ H ₇₀ O ₂
13.70	288	C13:0 – Ac. tridécanoïque	49.47	554	C ₃₆ H ₇₂ O ₂
14.27	288	C13:0 – Ac. tridécanoïque	50.23	554	C ₃₆ H ₇₂ O ₂
14.50	285	C13:1 – Ac. tridécenoïque	50.90	538	C ₃₅ H ₆₈ O ₂
14.97	288	C13:0 – Ac. tridécanoïque	52.12	568	C ₃₇ H ₇₄ O ₂
15.08	302	C14:0 – Ac. myristique	53.30	561	C ₃₈ H ₇₄ O ₂
16.45	299	C14:1 – Ac. tétradécenoïque	53.72	563	C ₃₈ H ₇₃ O ₂
18.18	316	C15:0 – Ac. pentadécanoïque	54.08	582	C ₃₈ H ₇₆ O ₂
18.32	313	C15:1 – Ac. pentadécenoïque	54.57	575	C ₃₉ H ₇₄ O ₂
18.85	316	C15:0 – Ac. pentadécanoïque	55.08	577	C ₃₉ H ₇₆ O ₂
20.15	327	C16:1 – Ac. sapiénique	55.32	575	C ₃₉ H ₇₄ O ₂
21.35	344	C17:0 – Ac. heptadécanoïque	55.65	577	C ₃₉ H ₇₆ O ₂
21.90	341	C17:1 – Ac. heptadécenoïque	55.93	596	C ₃₉ H ₇₈ O ₂
22.45	344	C17:0 – Ac. heptadécanoïque	56.53	587	C ₄₀ H ₇₄ O ₂
23.12	358	C18:0 – As. Stéarique	57.07	589	C ₄₀ H ₇₆ O ₂
23.18	353	C18:2 – Ac. linoléique	57.47	591	C ₄₀ H ₇₈ O ₂
23.62	355	C18:1 – Ac. oléique	57.78	610	C ₄₀ H ₈₀ O ₂
24.78	353	C18:2 – Ac. linoléique	58.27	603	C ₄₁ H ₇₈ O ₂
25.23	369	C19:1 – Ac. nonadécenoïque	58.42	601	C ₄₁ H ₇₆ O ₂
26.48	381	C20:2 – Ac. eicosadienoïque	58.72	605	C ₄₁ H ₈₀ O ₂
26.82	383	C20:1 – Ac. eicosenoïque	59.03	603	C ₄₁ H ₇₈ O ₂
Monoglycérides			59.35	605	C ₄₁ H ₈₀ O ₂
26.65	357	C14:0	59.62	624	C ₄₁ H ₈₂ O ₂
28.15	371	C15:0	60.13	615	C ₄₂ H ₇₈ O ₂
29.60	385	C16:0	60.33	619	C ₄₂ H ₈₂ O ₂
30.08	399	C17:0	60.70	617	C ₄₂ H ₈₄ O ₂
30.58	397	C17:1	61.12	619	C ₄₂ H ₈₂ O ₂
Hydrocarbures			62.02	631	C ₄₃ H ₈₂ O ₂
32.75	428	Squalène	62.55	631	C ₄₃ H ₈₂ O ₂
32.80	411	Squalène	63.72	643	C ₄₄ H ₈₆ O ₂
33.63	427	2,3-oxydosqualène (SqO)	64.02	647	C ₄₄ H ₉₀ O ₂
Cires			64.25	645	C ₄₄ H ₈₄ O ₂
35.08	442	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	64.87	666	C ₄₄ H ₉₂ O ₂
36.75	456	C ₂₉ H ₅₈ O ₂	Diglycérides		
38.53	470	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	50.77	385	/
39.67	484	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	Esters de cholestérol		
40.38	484	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	61.52	369	/
42.35	498	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	65.55	369	/
44.25	512	C ₃₃ H ₆₆ O ₂	66.17	369	/
46.23	526	C ₃₄ H ₆₈ O ₂	68.45	369	/
47.48	540	C ₃₅ H ₇₀ O ₂			

La Figure 49 met en avant les composés dont l'intensité **absolue** augmente significativement ($p\text{Value} < 0.05$) chez les peaux acnéiques, comparées aux peaux normales, en prenant en compte leur abondance au sein des LCS ainsi que leur taux de variation entre les deux groupes étudiés. En jaune sont représentés les composés « spécifiques » de la peau acnéique. Ces composés ne varient pas significativement entre les groupes de sujets ayant la peau normale et ceux ayant la peau grasse (résultats présentés ci-dessus).

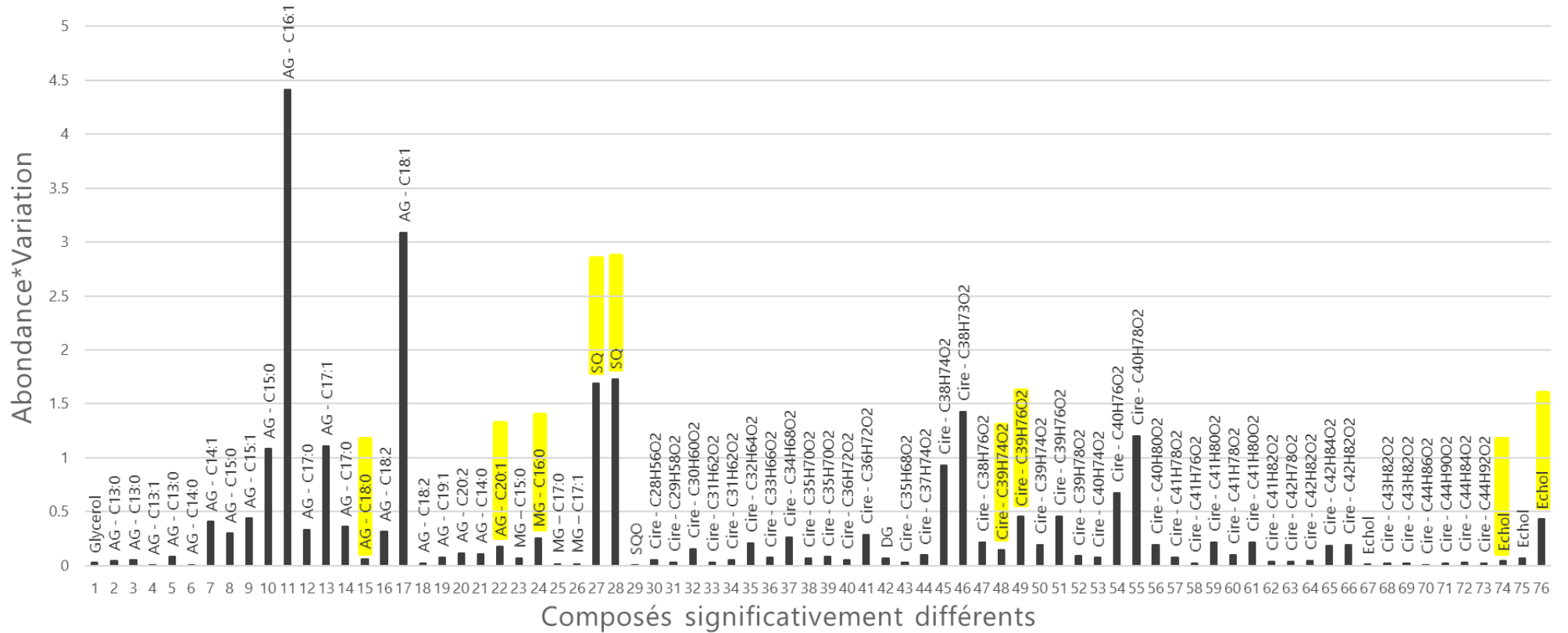


Figure 49. Histogramme représentant les composés des LCS dont l'intensité augmente significativement chez les sujets ayant la peau acnéique, comparé aux sujets ayant la peau saine. L'intensité considérée prend en compte l'abondance et la variation de chaque composé. AG : acide gras ; SqO : 2,3-oxidosqualène ; DG : diglycérade ; Echol : ester de cholestérol.

Nous avons pu observer que, comme dans le cas de la peau grasse, tous les composés variants significativement sont augmentés dans la peau acnéique. Cette augmentation concerne les acides gras, dont l'acide sapiénique (C16:1), l'acide oléique (C18:1), ou encore l'acide heptadecenoïque (C17:1), ainsi que de nombreuses cires. L'augmentation significative du glycérol ainsi que des nombreux acides gras confirme l'augmentation de l'hydrolyse des TG dans le cas de l'acné, observée avec l'évolution des taux des classes lipidiques (Figure 48)^{28,48,209}. L'augmentation de l'intensité absolue du squalène (Sq), de l'acide stéarique (C18:0), de l'acide eicosénoïque (C20:1), ou encore du monopalmitine (monoglycéride C16:0) semble être spécifique des peaux acnéiques.

L'augmentation du squalène peut être associée à l'augmentation observée du taux de sébum à la surface de la peau. En effet, cette augmentation représente un marqueur lipidique majeur dans le cas de l'acné^{176,193}. De plus, l'augmentation de la peroxydation du squalène serait associée à une activité comédogène sur modèle animal¹⁹⁵. La formation de ces peroxydes de squalène amplifierait également le développement de l'inflammation cutanée^{198,200}.

L'acide sapiénique constitue le principal AGL retrouvé au sein des LCS. Son augmentation importante observée chez les sujets ayant la peau acnéique, confirme son implication dans la pathogenèse de l'acné²⁰⁴. En revanche, contrairement à ce qui a été observé dans la littérature^{189,193,201}, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'acide linoléique (C18:2). La diminution de l'acide linoléique a précédemment été associée à une altération de la fonction barrière cutanée en ayant un impact sur les lipides du SC, en affectant notamment la synthèse des sphingolipides²⁰⁵, et entraînant une kératose excessive au niveau des follicules pileux dans l'acné. Cette différence pourrait provenir de la population choisie dans cette étude, possédant un faible grade d'acné, et donc un faible nombre de lésions acnéiques.

c. Evolution de la composition des LCS entre la peau grasse et la peau acnéique

Des analyses identiques ont été effectuées afin de comparer les peaux grasses et les peaux acnéiques. Cependant, aucune différence significative n'a été observée, ni dans les intensités

absolues de chaque classes lipidiques, ni dans les taux représentés par chaque classe lipidique, ni dans les intensités absolues représentés par chaque lipide présents individuellement au sein de la totalité des LCS.

4. Evolution de la composition des lipides du SC, analysés par NPLC/HR-MS

Après avoir déterminé les céramides variants significativement ($pV < 0,01$) en fonction de la problématique physiologique étudiée, nous avons procédé à la caractérisation structurale des espèces moléculaires. Cette caractérisation a été effectuée à partir de la masse moléculaire exacte et de la formule brute afin de déterminer la sous-classe céramidique correspondante. Il s'est avéré que plusieurs espèces moléculaires présentant la même formule brute mais appartenant à différentes sous-classes céramidiques sont présentes dans l'échantillon analysé à des temps de rétention extrêmement proches, et à des intensités relatives comparables. En raison de ces observations, différentes hypothèses structurales restent possibles et sont présentées ci-dessous. Malgré la difficulté à déterminer la structure fine et la sous-classe exacte, nous obtenons des hypothèses concernant des espèces moléculaires très proches (en nombre total de carbone, nombre d'insaturation, nombre d'estérification), permettant ainsi de mener à une interprétation biologique cohérente, concernant le rôle de ces sous-classes ainsi que leurs voies de biosynthèse.

a. Evolution de la composition des lipides du SC entre la peau normale et la peau grasse

Une augmentation significative de l'ensemble des céramides discriminants ($n=68$) entre la peau normale et la peau grasse a été observée (Tableau 12).

Cette augmentation concerne les différentes voix de biosynthèse de céramides et ainsi l'ensemble des sous-classes de céramides. En effet, le nombre total de carbone de ces lipides varie entre C33 et C88. De plus, l'ensemble des bases sphingoïdes subit cette augmentation (S, dS, P, H, T). Au niveau de la partie acide gras nous observons que les acides gras saturés mais aussi les acides gras insaturés (mono- et di-) sont concernés par cette augmentation. Les différents degrés d'hydroxylation ont également été observées (de 2 jusqu'au 5

groupement d'hydroxyle). Par ailleurs, des céramides sans estérification mais aussi des céramides estérifiés avec un acide gras (à la position ω de la partie acide gras -avec l'acide linoléique- ou sur à la position α -hydroxyle sur la tête polaire des céramides) ou ayant deux acides gras (aux deux positions α et ω) ont été détectés.

Ces résultats nous permettent d'observer que toutes les sous-classes de céramides et donc toutes les voies de biosynthèse sont impactées dans les modifications observées dans le cas de la peau grasse.

Tableau 12. Sous-classes de céramides **augmentant** significativement ($pV < 0.01$) dans la peau grasse (groupe 2), comparativement à la peau normale (groupe 1). Tr : Temps de rétention.

pValue	Tr (min)	m/z [M+Cl] ⁻	Formule brute	Hypothèses structurales
0,008	5,57	936,86	C ₅₉ H ₁₁₅ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:1
0,005	5,58	1481,38	C ₉₆ H ₁₈₃ O ₆ NCl	1-O-E(EO)S 96:0
0,006	5,75	1008,9	C ₆₃ H ₁₂₃ O ₅ NCl	1-O-EAdS 63:1
				1-O-EAS 63:0
				1-O-ENP 63:1
				1-O-ENH 63:0
0,008	5,78	1329,1	C ₈₃ H ₁₅₅ O ₈ NCl	1-O-E(EO)P+α(OH) 83:2
				1-O-E(EO)H+α(OH) 83:1
				1-O-E(EO)T 83:2
0,003	5,90	794,68	C ₄₉ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 49:1
0,001	5,95	806,68	C ₅₀ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 50:2
0,007	6,88	1221,1	C ₇₆ H ₁₄₇ O ₇ NCl	1-O-EAS+α(OH)+ω(O) 76:1
				1-O-ENH+α(OH)+ω(O) 76:1
				1-O-EAH+ω(O) 76:1
				1-O-ENT+ω(O) 76:2
0,008	7,08	1205	C ₇₄ H ₁₃₉ O ₈ NCl	1-O-E(EO)P+α(OH) 74:1
				1-O-E(EO)H+α(OH) 74:0
				1-O-E(EO)T 74:1
0,006	7,18	1293,2	C ₈₁ H ₁₅₉ O ₇ NCl	1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 81:1
				1-O-ENP+α(OH)+ω(O) 81:1
				1-O-EAP+ω(O) 81:1
0,009	7,43	1221,1	C ₇₆ H ₁₄₇ O ₇ NCl	1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 76:2
				1-O-ENP+α(OH)+ω(O) 76:2
				1-O-EAP+ω(O) 76:2
0,010	7,83	1319,2	C ₈₃ H ₁₆₁ O ₇ NCl	1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 83:2
				NP+α(OH)+ω(O) 83:2
				1-O-EAP+ω(O) 83:2
0,004	7,85	1219,1	C ₇₆ H ₁₄₅ O ₇ NCl	1-O-EAS+α(OH)+ω(O) 76:2
				1-O-ENH+α(OH)+ω(O) 76:2
				1-O-EAH+ω(O) 76:2
0,008	7,85	1289,2	C ₈₁ H ₁₅₅ O ₇ NCl	1-O-E(EO)dS+α(OH) 81:0
				1-O-E(EO)P 81:0
0,004	8,18	868,75	C ₅₃ H ₁₀₃ O ₅ NCl	1-O-EAS 53:0
				1-O-ENH 53:0
0,005	8,28	1261,1	C ₇₉ H ₁₅₁ O ₇ NCl	1-O-E(EO)dS+α(OH) 79:0
				1-O-E(EO)P 79:0
0,009	8,32	852,72	C ₅₂ H ₉₉ O ₅ NCl	1-O-EAdS 52:2
				1-O-EAS 52:1
				1-O-ENP 52:2
				1-O-ENH 52:1
				1-O-ENdS+α(OH) 52:2
				1-O-ENS+α(OH) 52:1
0,006	8,40	1321,2	C ₈₂ H ₁₅₉ O ₈ NCl	1-O-EAH+α(OH)+ω(O) 82:1
				1-O-ENT+α(OH)+ω(O) 82:2
				1-O-EAT+ω(O) 82:2

Partie 3 : Travaux expérimentaux

pValue <i>(suite)</i>	Tr (min) <i>(suite)</i>	m/z [M+Cl]⁻ <i>(suite)</i>	Formule brute <i>(suite)</i>	Hypothèses structurales <i>(suite)</i>
0,004	8,42	966,86	C ₆₀ H ₁₁₇ O ₅ NCl	1-O-EAS 60:0 1-O-ENH 60:0
0,004	8,47	938,83	C ₅₈ H ₁₁₃ O ₅ NCl	1-O-EAS 58:0 1-O-ENH 58:0
0,003	8,52	910,8	C ₅₆ H ₁₀₉ O ₅ NCl	1-O-EAS 56:0 1-O-ENH 56:0
0,007	8,60	840,72	C ₅₁ H ₉₉ O ₅ NCl	1-O-EAS 51:0 1-O-ENH 51:0
0,008	8,70	882,77	C ₅₄ H ₁₀₅ O ₅ NCl	1-O-EAS 54:0 1-O-ENH 54:0
0,008	9,15	1217,13	C ₇₈ H ₁₅₁ O ₅ NCl	EoS 78:0
0,008	9,63	922,8	C ₅₇ H ₁₀₉ O ₅ NCl	EoS 57:0
0,004	9,77	1207,11	C ₇₆ H ₁₄₉ O ₆ NCl	1-O-EAP 76:1
0,010	9,87	1291,1	C ₈₀ H ₁₅₃ O ₈ NCl	1-O-E(EO)T 80:0 1-O-EAH+α(OH)+ω(O) 80:2
0,001	9,95	996,87	C ₆₁ H ₁₁₉ O ₆ NCl	1-O-EAH 61:0 1-O-ENT 61:1
0,008	10,25	952,81	C ₅₈ H ₁₁₁ O ₆ NCl	1-O-EAP 58:2
0,002	10,38	944,83	C ₅₇ H ₁₁₅ O ₆ NCl	OT 57:0
0,003	10,38	968,84	C ₅₉ H ₁₁₅ O ₆ NCl	1-O-EAP 59:1
0,001	10,42	982,86	C ₆₀ H ₁₁₇ O ₆ NCl	1-O-EAH 60:0 OT 60:2 1-O-ENT 60:1
0,001	10,47	954,83	C ₅₈ H ₁₁₃ O ₆ NCl	1-O-EAH 58:0 OT 58:2 1-O-ENT 58:1
0,006	10,55	916,8	C ₅₅ H ₁₁₁ O ₆ NCl	OT 55:0
0,007	10,55	926,8	C ₅₆ H ₁₀₉ O ₆ NCl	1-O-EAP 56:1 1-O-EAH 56:0 OT 56:2 1-O-ENT 56:1
0,005	10,55	940,81	C ₅₇ H ₁₁₁ O ₆ NCl	1-O-EAP 57:1 1-O-EAH 57:0 OT 57:2 1-O-ENT 57:1
0,001	10,60	888,74	C ₅₂ H ₁₀₃ O ₇ NCl	1-O-EAT 52:0
0,005	10,60	898,8	C ₅₅ H ₁₀₉ O ₅ NCl	OH 55:0
0,005	11,13	788,66	C ₄₆ H ₉₁ O ₆ NCl	OT 46:1
0,006	11,65	842,7	C ₅₀ H ₉₇ O ₆ NCl	OT 50:2
0,006	11,75	950,83	C ₅₉ H ₁₁₃ O ₅ NCl	OH 59:2
0,004	11,93	922,8	C ₅₇ H ₁₀₉ O ₅ NCl	OH 57:2
0,000	12,13	710,62	C ₄₄ H ₈₅ O ₃ NCl	NS 44:1
0,003	12,23	1060,9	C ₆₆ H ₁₂₃ O ₆ NCl	EOH 66:1
0,005	12,33	600,51	C ₃₆ H ₇₁ O ₃ NCl	NS 36:0
0,007	12,38	796,66	C ₄₈ H ₉₁ O ₅ NCl	OH 48:2

Partie 3 : Travaux expérimentaux

pValue <i>(suite)</i>	Tr (min) <i>(suite)</i>	m/z [M+Cl]⁻ <i>(suite)</i>	Formule brute <i>(suite)</i>	Hypothèses structurales <i>(suite)</i>
0,008	12,47	572,48	C ₃₄ H ₆₇ O ₃ NCl	NdS 34:1 NS 34:0
0,001	12,73	980,84	C ₆₀ H ₁₁₅ O ₆ NCl	1-O-EAH 60:1 1-O-ENT 60:2
0,001	12,92	1008,9	C ₆₂ H ₁₁₉ O ₆ NCl	1-O-EAH 62:1 1-O-ENT 62:2
0,006	12,95	924,78	C ₅₆ H ₁₀₇ O ₅ NCl	1-O-EAS 56:0 OH 56:1 1-O-ENH 56:0
0,000	13,00	916,74	C ₅₇ H ₁₀₃ O ₅ NCl	EOS 57:2
0,010	13,10	1000,87	C ₆₀ H ₁₁₉ O ₇ NCl	1-O-EAT 60:0
0,001	13,13	952,81	C ₅₈ H ₁₁₁ O ₆ NCl	1-O-EAH 58:1 1-O-ENT 58:2
0,000	13,42	870,73	C ₅₃ H ₁₀₁ O ₆ NCl	1-O-EAH 53:0 OT 53:2 1-O-ENT 53:1
0,003	13,58	916,74	C ₅₇ H ₁₀₃ O ₅ NCl	EOS 57:2
0,007	14,17	844,72	C ₅₀ H ₉₉ O ₆ NCl	OT 50:1 1-O-ENT 50:0
0,005	14,42	870,73	C ₅₂ H ₁₀₁ O ₆ NCl	1-O-EAP 52:1 1-O-EAH 52:0 OT 52:2 1-O-ENT 52:1
0,006	15,12	942,79	C ₅₆ H ₁₀₉ O ₇ NCl	1-O-EAT 56:1
0,002	15,38	914,76	C ₅₄ H ₁₀₅ O ₇ NCl	1-O-EAT 54:1
0,007	15,93	728,63	C ₄₄ H ₈₇ O ₄ NCl	AS 44:0 NH 44:0
0,000	16,13	712,6	C ₄₃ H ₈₃ O ₄ NCl	AS 43:1 NH 43:1
0,010	16,43	700,6	C ₄₂ H ₈₃ O ₄ NCl	AS 42:0 NH 42:0
0,002	17,98	942,79	C ₅₆ H ₁₀₉ O ₇ NCl	1-O-EAT 56:1
0,009	18,78	844,68	C ₄₉ H ₉₅ O ₇ NCl	1-O-EAT 49:1
0,002	18,97	574,46	C ₃₃ H ₆₅ O ₄ NCl	AS 33:0 NH 33:0
0,007	21,13	742,61	C ₄₄ H ₈₅ O ₅ NCl	AH 44:1 NT 44:2
0,004	21,32	702,58	C ₄₁ H ₈₁ O ₅ NCl	AH 41:0 NT 41:1
0,006	21,32	1209,05	C ₇₄ H ₁₄₃ O ₈ NCl	1-O-EAT+α(OH) 74:2
0,007	23,58	1185,02	C ₇₅ H ₁₃₉ O ₆ NCl	EOH 75:2

b. Evolution de la composition des lipides du SC entre la peau normale et la peau acnéique

Les analyses réalisées afin de comparer les lipides du SC obtenus au sein de la peau normale et ceux obtenus au sein de la peau acnéique nous ont permis de mettre en évidence des augmentations significatives (n=36) ainsi que des diminutions significatives (n=16) de certaines sous classes de céramides, présentées respectivement dans les Tableau 13 et Tableau 14.

Tableau 13. Sous-classes de céramides **augmentant** significativement ($pV < 0,01$) dans la peau à tendance acnéique (groupe 3), comparativement à la peau normale (groupe 1). Tr : Temps de rétention.

pValue	Tr (min)	m/z [M+Cl]-	Formule brute	Hypothèses structurales
0,006	18,97	574,46	C ₃₃ H ₆₅ O ₄ NCl	AS 33:0 NH 33:0
0,003	18,50	586,46	C ₃₄ H ₆₅ O ₄ NCl	AS 34:1 NH 34:1
0,009	18,27	614,49	C ₃₆ H ₆₉ O ₄ NCl	AS 36:1 NH 36:1
0,007	16,13	712,6	C ₄₃ H ₈₃ O ₄ NCl	AS 43:1 NH 43:1
0,005	5,90	794,68	C ₄₉ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 49:1
0,000	5,95	806,68	C ₅₀ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 50:2
0,005	12,25	824,69	C ₅₀ H ₉₅ O ₅ NCl	OH 50:2
0,003	5,65	892,79	C ₅₆ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENS 56:1
0,007	5,67	920,82	C ₅₈ H ₁₁₁ O ₄ NCl	1-O-ENS 58:1
0,010	10,47	922,8	C ₅₇ H ₁₀₉ O ₅ NCl	1-O-ENdS+α(OH) 57:2
0,001	11,93	922,8	C ₅₇ H ₁₀₉ O ₅ NCl	OH 57:2
0,001	11,75	950,83	C ₅₉ H ₁₁₃ O ₅ NCl	OH 59:2
0,003	10,25	952,81	C ₅₈ H ₁₁₁ O ₆ NCl	1-O-EAP 58:2
0,003	8,60	962,87	C ₆₁ H ₁₁₇ O ₄ NCl	OS 61:2
0,009	9,95	996,87	C ₆₁ H ₁₁₉ O ₆ NCl	1-O-EAH 61:0 1-O-ENT 61:1
0,009	14,80	1026,89	C ₆₂ H ₁₂₁ O ₇ NCl	1-O-EAT 62:1
0,007	9,82	1279,13	C ₇₉ H ₁₅₃ O ₈ NCl	1-O-EAP+α(OH)+ω(O) 79:2 1-O-EAH+α(OH)+ω(O) 79:1 1-O-ENT+α(OH)+ω(O) 79:2 1-O-EAT+ω(O) 79:2
0,003	10,52	1373,21	C ₈₆ H ₁₆₃ O ₈ NCl	1-O-E(EO)H+α(OH) 86:0 1-O-E(EO)T 86:1
0,005	5,90	794,68	C ₄₉ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 49:1
0,000	5,95	806,68	C ₅₀ H ₉₃ O ₄ NCl	1-O-ENS 50:2
0,003	5,65	892,79	C ₅₆ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENS 56:1
0,007	5,67	920,82	C ₅₈ H ₁₁₁ O ₄ NCl	1-O-ENS 58:1
0,003	10,25	952,81	C ₅₈ H ₁₁₁ O ₆ NCl	1-O-EAP 58:2
0,009	9,95	996,87	C ₆₁ H ₁₁₉ O ₆ NCl	1-O-EAH 61:0 1-O-ENT 61:1
0,009	14,80	1026,89	C ₆₂ H ₁₂₁ O ₇ NCl	1-O-EAT 62:1
0,007	9,82	1279,13	C ₇₉ H ₁₅₃ O ₈ NCl	1-O-EAP+α(OH)+ω(O) 79:2 1-O-EAH+α(OH)+ω(O) 79:1 1-O-ENT+α(OH)+ω(O) 79:2 1-O-EAT+ω(O) 79:2
0,005	12,25	824,69	C ₅₀ H ₉₅ O ₅ NCl	OH 50:2
0,001	11,93	922,8	C ₅₇ H ₁₀₉ O ₅ NCl	OH 57:2
0,001	11,75	950,83	C ₅₉ H ₁₁₃ O ₅ NCl	OH 59:2
0,003	8,60	962,87	C ₆₁ H ₁₁₇ O ₄ NCl	OS 61:2
0,010	10,47	922,8	C ₅₇ H ₁₀₉ O ₅ NCl	1-O-ENdS+α(OH) 57:2
0,003	10,52	1373,21	C ₈₆ H ₁₆₃ O ₈ NCl	1-O-E(EO)H+α(OH) 86:0 1-O-E(EO)T 86:1

Tableau 14. Sous-classes de céramides **diminuant** significativement ($pV < 0,01$) dans la peau à tendance acnéique (groupe 3), comparativement à la peau normale (groupe 1). Tr : Temps de rétention.

pValue	Tr (min)	m/z [M+Cl] ⁻	Formule brute	Hypothèses structurales
0,008	3,32	868,79	C ₅₄ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:0
0,009	5,32	868,79	C ₅₄ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:0
0,002	2,47	882,81	C ₅₅ H ₁₀₉ O ₄ NCl	1-O-ENdS 55:0
0,007	5,73	966,86	C ₆₀ H ₁₁₇ O ₅ NCl	1-O-EAdS 60:1
0,010	15,07	1014,85	C ₆₄ H ₁₁₇ O ₅ NCl	EOs 64:2
0,003	19,65	1030,85	C ₆₄ H ₁₁₇ O ₆ NCl	EOH 64:2
0,003	19,55	1058,88	C ₆₆ H ₁₂₁ O ₆ NCl	EOH 66:2
0,008	19,37	1086,91	C ₆₈ H ₁₂₅ O ₆ NCl	EOH 68:2
0,008	3,32	868,79	C ₅₄ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:0
0,009	5,32	868,79	C ₅₄ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:0
0,002	2,47	882,81	C ₅₅ H ₁₀₉ O ₄ NCl	1-O-ENdS 55:0
0,007	5,73	966,86	C ₆₀ H ₁₁₇ O ₅ NCl	1-O-EAdS 60:1
0,003	19,65	1030,85	C ₆₄ H ₁₁₇ O ₆ NCl	EOH 64:2
0,003	19,55	1058,88	C ₆₆ H ₁₂₁ O ₆ NCl	EOH 66:2
0,008	19,37	1086,91	C ₆₈ H ₁₂₅ O ₆ NCl	EOH 68:2
0,010	15,07	1014,85	C ₆₄ H ₁₁₇ O ₅ NCl	EOs 64:2

Nous avons pu observer que l'augmentation impacte majoritairement des céramides possédant des longueurs de chaînes courtes, tels que les sous classes AS ou NH avec des longueurs de chaînes totales comprises entre C33 et C43. Cependant, d'autres sous-classes céramidiques possédant des longueurs de chaîne entre C49 et C86 sont également augmentées dans les peaux acnéiques. La diminution des céramides concerne des longueurs de chaîne totale allant de C54 à C68. Différentes études ont montré que la longueur de la chaîne des céramides est en relation directe avec la fonction de barrière cutanée. En effet, la perméabilité cutanée est augmentée avec des céramides à chaînes courtes. La diminution de la longueur de la chaîne des céramides observée dans l'acné pourrait donc induire un effet néfaste sur la fonction barrière cutanée^{211,212}.

D'autre part, nous avons mis en avant une augmentation des céramides mono-insaturés possédant une base sphingoïde S, contrairement aux céramides saturés possédant eux, une base sphingoïde dS, qui eux diminuent. Une augmentation des sous-classes de céramides insaturées, plus hydrophobes, a également été mise en évidence dans le cas des peaux atopiques, provoquant ainsi une altération de la barrière cutanée⁷⁹. De plus, une diminution des sous-classes de céramides estérifiés à la position oméga avec l'acide linoléique (EOH et

EOS) a également été observée, ainsi qu'une augmentation des sous-classes OS et OH, ne possédant, elles, pas d'estérification supplémentaire. Rabionet *et al.*⁶⁷, ainsi que Van Smeden *et al.*⁶⁸, ont montré l'importance des céramides estérifiés dans la fonction barrière dans le cas de la dermatite atopique. En effet, une diminution des sous-classes de céramides estérifiés entraîne une altération de la barrière cutanée.

c. Evolution de la composition des lipides du SC entre la peau grasse et la peau acnéique

Dans le cas de la peau acnéique comparée à la peau grasse, nous observons une diminution significative de l'ensemble de céramides discriminants (n = 17). L'ensemble de ces céramides font partie des céramides estérifiés avec un acide gras (à la position ω de la partie acide gras – avec l'acide linoléique - ou sur à la position α -hydroxyle sur la tête polaire du céramides) ou avec deux acides gras (aux deux positions).

Les céramides estérifiés jouant un rôle très important dans la fonction barrière^{67,68}, cette diminution pourrait également expliquer une altération de la voie de biosynthèse d'estérification des céramides et par conséquent la dégradation de cette importante fonction chez les sujets ayant une peau acnéique.

Tableau 15. Sous-classes de céramides **diminuant** significativement ($pV < 0,01$) dans la peau à tendance acnéique (groupe 3), comparativement à la peau grasse (groupe 2). Tr : Temps de rétention.

pValue	Tr (min)	m/z [M+Cl] ⁻	Formule brute	Hypothèses structurales
0,007	18,78	844,68	C ₄₉ H ₉₅ O ₇ NCl	1-O-EAT 49:1 /
0,003	2,17	868,79	C ₅₄ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:0
0,006	3,32	868,79	C ₅₄ H ₁₀₇ O ₄ NCl	1-O-ENdS 54:0
0,005	5,57	910,84	C ₅₇ H ₁₁₃ O ₄ NCl	1-O-ENdS 57:0
				1-O-EAdS 58:1
0,001	5,78	938,83	C ₅₈ H ₁₁₃ O ₅ NCl	1-O-EAS 58:0
				1-O-ENP 58:1
				1-O-ENH 58:0
0,009	5,78	952,89	C ₆₀ H ₁₁₉ O ₄ NCl	1-O-ENdS 60:0
				1-O-EAP 58:0
0,007	13,10	956,84	C ₅₈ H ₁₁₅ O ₆ NCl	OT 58:1
				1-O-ENT 58:0
0,001	5,73	966,86	C ₆₀ H ₁₁₇ O ₅ NCl	1-O-EAdS 60:1
				1-O-EAH 62:0
0,001	11,18	1010,89	C ₆₂ H ₁₂₁ O ₆ NCl	OT 62:2
				1-O-ENT 62:1
0,006	9,23	1189,1	C ₇₆ H ₁₄₇ O ₅ NCl	EoS 76:0
				1-O-EAS+α(OH)+ω(O) 74:2
0,000	14,33	1191,04	C ₇₄ H ₁₄₁ O ₇ NCl	1-O-ENH+α(OH)+ω(O) 74:2
				1-O-EAH+ω(O) 74:2
0,005	5,17	1211,08	C ₇₈ H ₁₄₅ O ₅ NCl	EOS 78:2
0,007	7,80	1215,12	C ₇₈ H ₁₄₉ O ₅ NCl	1-O-ENS+α(OH) ou ω(O) 78:2
				1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 81:1
0,004	7,18	1293,19	C ₈₁ H ₁₅₉ O ₇ NCl	1-O-ENP+α(OH)+ω(O) 81:1
				1-O-EAP+ω(O) 81:1
0,007	13,70	1303,17	C ₈₃ H ₁₆₁ O ₆ NCl	1-O-EAH 83:1
				1-O-ENT 83:2
				1-O-EAdS+α(OH)+ω(O) 82:1
0,003	7,13	1307,2	C ₈₂ H ₁₆₁ O ₇ NCl	1-O-ENP+α(OH)+ω(O) 82:1
				1-O-EAP+ω(O) 82:1
0,003	9,48	1345,18	C ₈₄ H ₁₅₉ O ₈ NCl	1-O-E(O)H+α(OH) 84:0
				1-O-E(O)T 84:1

Ces résultats concernant l'évolution de la composition des lipides du SC nous a permis d'observer pour la première fois, que les modifications concernant la peau grasse et la peau acnéique concerne différentes voies de biosynthèse et possèdent deux voies biologiques bien distinctes. En effet, toutes les voies de biosynthèse semblent impactées au sein de la peau grasse, sans impact majeur sur les sous-classes possédant un rôle important dans le maintien de la fonction barrière cutanée. En revanche, une altération de la fonction barrière

cutanée a clairement été mise en évidence chez les sujets ayant une peau acnéique, avec notamment la diminution des sous-classes de céramides estérifiés, très important dans le maintien de cette fonction.

5. Conclusion : impact de l'hyperséborrhée et de l'acné sur la barrière cutanée

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont permis d'observer que les problématiques liées à la peau grasse ainsi que celles liées à la peau acnéique font appel à des voies biologiques indépendantes, et sont résumés dans le Tableau 16. En effet, la peau grasse ne semble pas être une étape dans le passage à la peau acnéique. Les différents résultats obtenus ainsi que leurs explications nous ont permis d'observer que ces deux problématiques impactent différemment les voies biologiques, notamment celles concernant les LCS ainsi que les voies de biosynthèse des lipides du SC. Une signature spécifique avec la variation de LCS spécifiques pour les peaux grasses et les peaux acnéiques a également été observée.















Concernant la peau grasse, nous avons observé une augmentation de l'activité des glandes sébacées, reflétée par une augmentation du taux de porphyrine totale, une augmentation du taux de sébum à la surface de la peau, ainsi qu'une augmentation absolue de la majorité des classes lipidiques des LCS. Contrairement à la peau acnéique, une augmentation de la brillance spéculaire a été observée chez les sujets ayant la peau grasse. Cette augmentation a été associée à une modification de la composition des LCS observée dans cette population, avec notamment une augmentation des cires possédant trois insaturations.

D'autre part, nous n'avons pas observé d'impact significatif sur la présence de *C.acnes* à la surface de la peau, suggérant une modification différente du microbiote cutané, connu pour être particulièrement impliqué dans la pathogenèse de l'acné. La fonction barrière cutanée semble relativement préservée chez les volontaires ayant la peau grasse. En effet, les modifications n'impactent pas spécifiquement les voies de biosynthèse des lipides du SC jouent un rôle important dans la fonction barrière cutanée, et impactent plutôt la surface

cutanée, notamment les LCS.

Notre approche comprenant l'étude des différentes composantes de la couche supérieure de l'épiderme (paramètres biométriques, LCS et lipides du SC) a permis de mettre en évidence une altération à la fois de l'activité sébacée connue et largement étudiée depuis quelques années, mais également de l'activité épidermique, jusqu'à ce jour peu étudiée, dans le cas de l'acné. En effet, une augmentation de l'activité des glandes sébacées a également été observée à travers l'augmentation du taux de porphyrine totale, l'augmentation du taux de sébum à la surface de la peau ainsi que l'augmentation de la majorité des composés d'origine sébacée. L'augmentation significative et spécifique du squalène représente également un marqueur lipidique important de l'acné. L'augmentation de certains peroxydes de squalène tel que le 2,3-oxidosqualène, possédant une activité comédogène et étant impliqué dans l'inflammation cutanée montre une altération plus probable de la barrière cutanée. D'autre part, l'augmentation de l'hydrolyse des TG, ainsi que l'augmentation de *C.acnes* confirme des modifications majeures du microbiote chez les sujets acnéiques. En parallèle, des modifications importantes ont été, pour la première fois, observées au niveau de la composition des lipides du SC. En effet, dans la peau acnéique comparée à la peau normale ou à la peau grasse, une diminution des sous-classes de céramides estérifiées, notamment [EOH] et [EOS] a été observée, ainsi qu'une augmentation des sous-classes de céramides mono-insaturées [S]. Les céramides estérifiés ainsi que les insaturations représentent un rôle majeur dans le maintien d'une fonction barrière. Ainsi, la diminution des estérifications ainsi que l'augmentation des insaturations tendent à montrer une altération de la voie de biosynthèse d'estérification des céramides et ainsi de la matrice intercornéocytaire au niveau du SC, dans le cas de l'acné. Dans cette pathologie cutanée, l'ensemble des lipides cutanés semblent être impactés de manière conséquente, entraînant une altération de la fonction barrière cutanée. De ce fait, une prise en charge plus globale nécessiterait d'être développée afin de mieux appréhender ce désordre cutané.

Tableau 16. Tableau récapitulatif des modifications significatives observées dans le cas de la peau grasse et de la peau acnéique, comparées à la peau saine. NS : non significatif.

	Peau grasse (grades 0,1)²⁴⁶	Peau acnéique (grades 2,3)²⁴⁶
Modifications générales		
Taux de porphyrine totale	 (+85,4 %)	 (+122,1 %)
Taux de porphyrine liée à <i>C.acnes</i>	NS	 (+106,2 %)
Brillance spéculaire	 (+157,8 %)	NS
Taux de sébum	 (+46,5 %)	 (+44,4 %)
Modifications de la composition des LCS		
Modifications classes lipidiques	 Hydrolyse des TG	 Hydrolyse des TG
	 Cires ayant 3 insaturations	
Lipides augmentant spécifiquement	 16 :0, C14 :0, C12 :0, C16 :0, Squalène monohydroperoxyde, certaines cires	 C18 :0, C20 :1, C16 :0, Squalène, certaines cires, certains EChol
Modifications de la composition des lipides du SC		
	Absence de modifications spécifiques, impacte toutes les voies de biosynthèse des lipides du SC	 CER [S]  CER [EOH] et [EOS]  CER [OH] et [OS]

Chapitre 3 : Impacts des conditions environnementales extrêmes sur la barrière cutanée, dans le cadre du projet « Under The Pole »

La plongée sous-marine dans les eaux froides et salées du pôle Nord soumet la peau à des stress thermiques et hydriques pouvant perturber l'état de la surface de la peau, notamment au niveau de la couche cornée. Nous avons eu l'opportunité de suivre la peau des plongeurs du projet « Under the Pole », un programme ambitieux visant à étudier la flore sous-marine à travers le monde et notamment dans la zone arctique. L'objectif principal était d'évaluer l'impact de plusieurs heures de plongée sur l'hydratation et la barrière cutanée et d'enregistrer les changements à court terme et à long terme, se produisant après 2 mois d'excursion au pôle Nord.

1. Méthodologies expérimentales

La population était composée de 7 hommes caucasiens ayant la peau saine, ne présentant aucune lésion cutanée au visage, âgées entre 18 et 45 ans. Les mesures cutanées ont été effectuées de septembre à décembre 2017, lorsque l'expédition était située dans l'océan Arctique. L'apparence de la peau a été documentée en utilisant l'imagerie faciale complète, grâce à l'« Observer 520 » (Innofaith) tandis que la teneur en eau et la perte insensible en eau ont été évaluées sur la joue à l'aide respectivement du « Moisturemeter SC » et du « Vapometer » (Delfin). Des échantillons de *Stratum Corneum* ont également été collectés sur la joue par tape-stripping. Deux prélèvements consécutifs ont été réalisés sur la même zone à l'aide de D-Squames après application d'un poids calibré pendant 10 secondes, puis analysés par spectroscopie Raman et par ATR-imaging afin d'obtenir des informations concernant les structures lipides et protéines au sein du SC. Des prélèvements par écouvillonnage réalisés sur le front, et analysés par NPLC/HR-MS (selon les mêmes protocoles que ceux utilisés pour l'étude portant sur l'acné) ont permis d'obtenir des informations concernant la composition lipidique du SC.

Toutes les mesures ont été effectuées à l'arrivée sur le site de plongée (J0), puis après 28 (J28) et 56 jours (J56) sur le site. Durant cette période, les volontaires ont effectué au moins 4 plongées jusqu'à 150m de profondeur. Les mesures de teneur en eau et de perte insensible en eau ont également été effectuées selon le design suivant : T0 : juste avant la plongée, T1 : juste après la plongée, T2 : cinq minutes après la plongée ; T3 : deux heures après la plongée.

L'ensemble des prélèvements réalisés (D-Squames et écouvillons) ont été stockées à -20°C et nous ont été envoyés à la fin de l'expédition, tout en maintenant des conditions permettant d'éviter la dégradation de nos échantillons. A réception, les échantillons ont été vérifiés et stockés afin d'être analysés.

a. Optimisations réalisées dans le cadre des analyses Raman et FTIR sur les bandes adhésives (D-Squames) employées pendant l'expédition « Under The Pole »

La principale difficulté rencontrée concernait la présence de colle sur les strips D-Squames. En effet, sa contribution pollue la signature spectrale du SC prélevé.

En spectroscopie Raman, la résolution axiale optimale obtenue était de 0,5 μm en utilisant un Objectif 100x, O.N, 0,9. Malgré cette résolution, la contribution de la colle dans le signal du SC est restée dominante. Des soustractions spectrales ont été effectuées afin de diminuer l'influence du signal de la colle dans la signature globale (Figure 50).

Avant les soustractions, tous les spectres ont subi les mêmes prétraitements décrits dans les parties précédentes (« Traitement des données obtenues en spectroscopie Raman », page 123), à savoir : lissage en utilisant la méthode de Savitzky-Golay, correction de la ligne de base et normalisation.

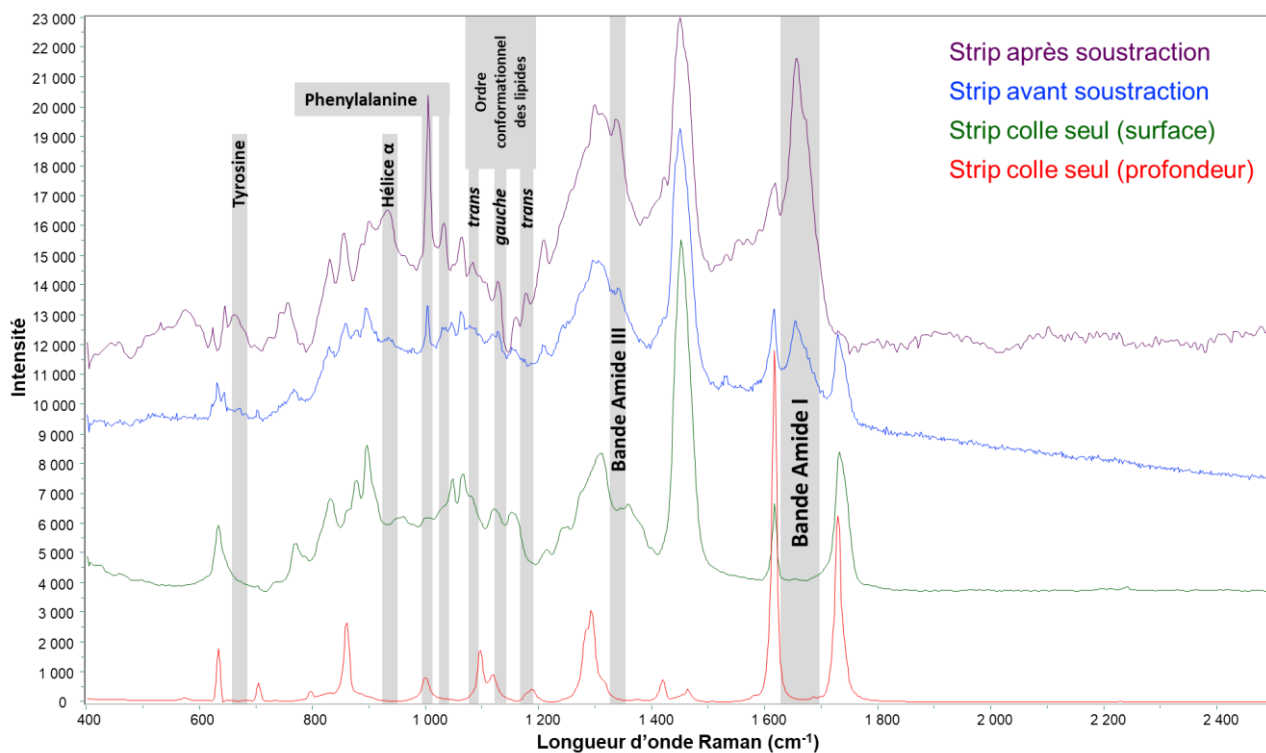


Figure 50. Spectres Raman obtenus avant et après soustraction du signal correspondant à la colle.

Imagerie par ATR-FTIR :

Comme indiqué précédemment, 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, $n=2,4$). Les analyses ainsi faites permettent d'avoir une moindre contribution de la colle dans les zones de prélèvement du SC.

Mise en place expérimentale et analyses des données :

L'ensemble des strips issus des 7 volontaires ont été analysés.

- 3 conditions de prélèvement : à J0, à J28 et à J56
- 3 images ont été collectées par strip
- 64 images spectrales ont été collectées (contenant 1024 spectres chacune).

Les images étant collectées sur des strips, aucune information spatiale ne peut être obtenue. D'autre part, les images ont servi comme sources de spectres uniquement : seuls les 6400 spectres présentant les meilleurs rapports signal sur bruit ont été retenus (100 spectres par

analyse) (Figure 51).

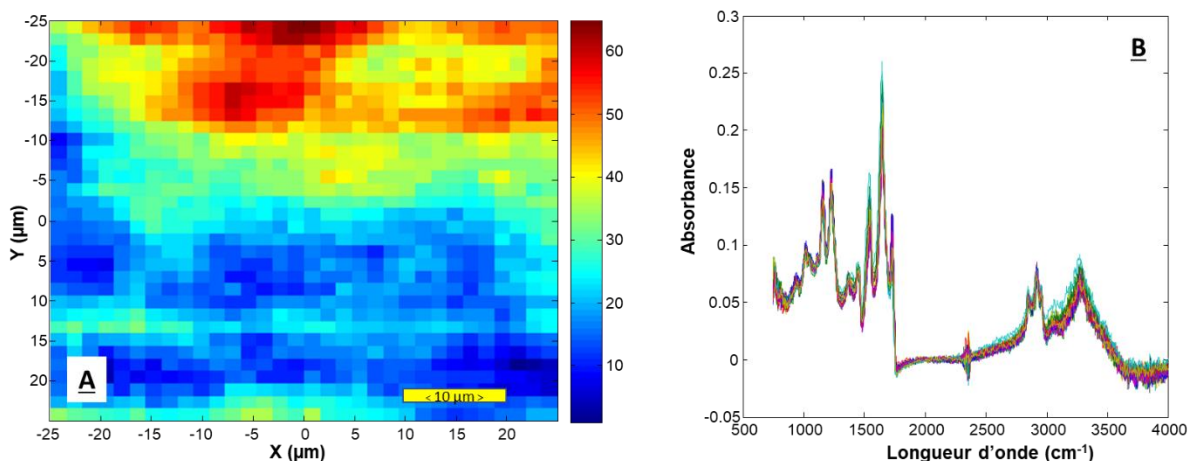


Figure 51. Extraction des spectres des images du SC, A/ Exemple d'une image pseudo-couleur reconstruite à partir de l'absorbance de chaque spectre (pixel) d'une image hyperspectrale de SC, B/ Spectres bruts extraits aléatoirement de l'image hyperspectrale.

En plus des images sur le SC, des images ont été collectées sur la colle et ont servi comme référence pour soustraction du signal de la colle. Le but étant d'identifier les spectres de la colle et prendre en compte leur variabilité potentielle, 3 images par strip ont été réalisées sur des zones où la colle domine (64*1024 spectres au total) (Figure 52).

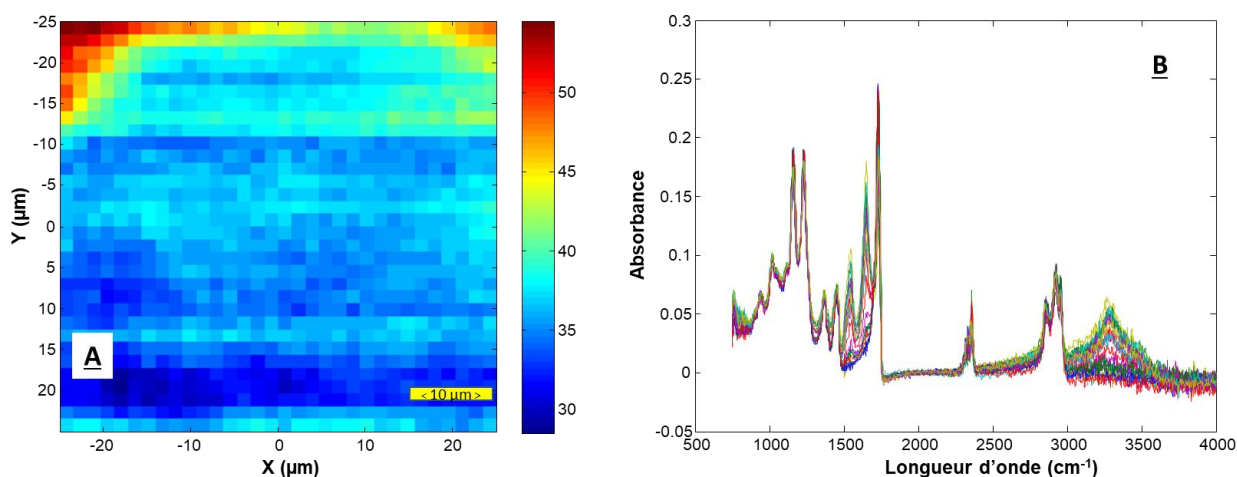


Figure 52. Extraction des spectres à partir des images de références (sur colle), A/ Exemple d'une image contenant principalement des spectres de colle avec des traces de spectres de SC (partie rouge), B/ Spectres extraits aléatoirement de l'image hyperspectrale.

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,

Pour les images du SC : les 100 spectres présentant le rapport signal sur bruit le plus élevé ont été sélectionnés. Un total de 6400 spectres est obtenu.

- 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} : cette zone ne présente aucune bande d'intérêt pour la peau. Seules les élongations 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 (Figure 53).

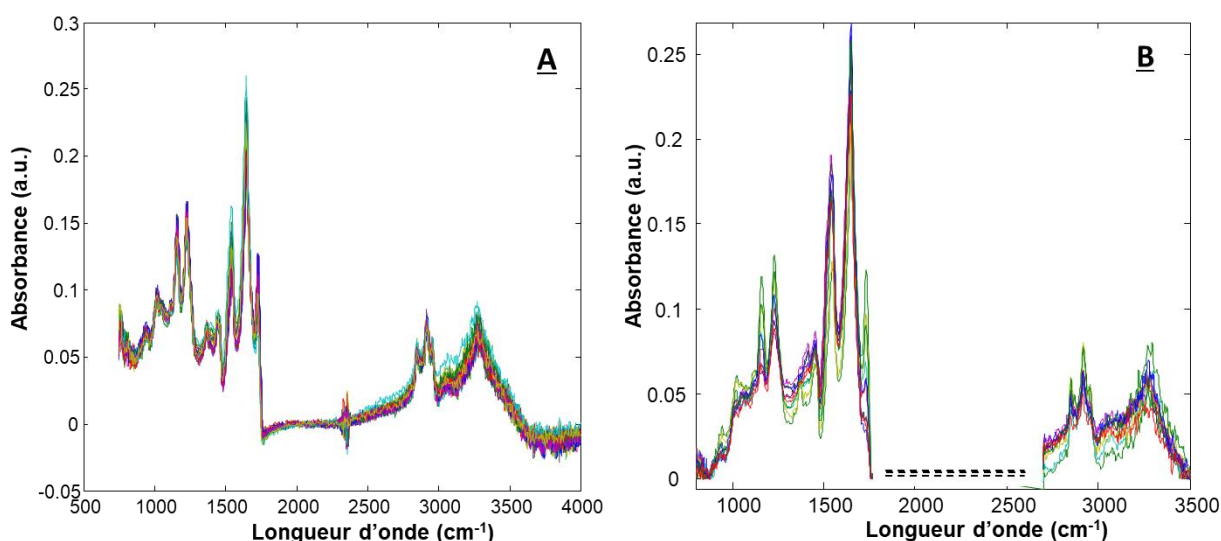


Figure 53. Spectres ATR extraits des images spectrales, A/ avant prétraitement, B/ après prétraitement

- Pour les images du blanc (colle), la sélection des spectres est réalisée par K-means.

L'objectif est de sélectionner des spectres de référence prenant en compte la potentielle variabilité entre les différentes images. La méthode K-means a été utilisée pour l'identification des spectres de références.

La K-means est une méthode qui permet de regrouper les spectres possédant des caractéristiques communes (clusters). Au départ, le nombre de clusters dans lesquels les spectres vont être classés est déterminé par l'utilisateur. Pour chaque cluster, un spectre est sélectionné au hasard pour agir comme centre initial du cluster. Tous les spectres sont ensuite comparés sur la base de distances inter-spectrales avec les centres de clusters et seront classés dans le cluster auquel ils se rapprochent le plus. Des nouveaux centres sont alors calculés en moyennant les spectres de chaque cluster. Cette procédure est ensuite répétée jusqu'à atteindre une solution stable :

- Une première K-means est d'abord effectuée sur chaque image pour garder 100 spectres (représentant les centres de 100 clusters),
- Une seconde est effectuée en regroupant l'ensemble des spectres issus de toutes les images. Le choix de nombre final de spectres de référence (nombre de clusters) a été guidé par l'étape de régression des spectres (CLS) (étape suivante). Différents nombres ont été testés : 100, 50 et 5.

Le choix s'est porté sur une K-means avec 5 clusters. Les spectres moyens sont présentés dans la Figure 54.

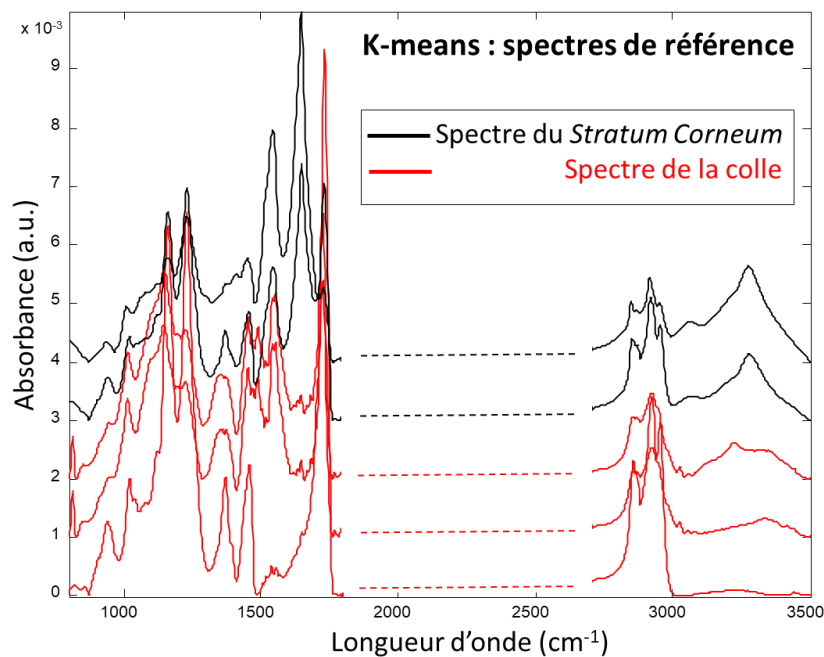


Figure 54. Spectres moyens des clusters obtenus par K-means (centroïdes), 3 sont associés à la colle (en rouge) et 2 au signal du SC (en noir).

Bien que la contribution de la colle dans les spectres collectés sur le SC soit moindre, certains spectres peuvent présenter des pics liés à la colle. Afin d'éviter un biais d'évaluation lié à ces influences, la contribution de la colle dans chaque spectre des 6400 retenus pour le SC a été calculée par la méthode des moindres carrés avec une contrainte de non négativité (Non-negativity constraint least square - NCLS).

La NCLS vise à estimer les concentrations (ou fractions d'abondance) de signatures spectrales d'espèces chimiques connues dans des mélanges linéaires mesurés de ces signatures. La contribution positive de chacune de ces sources connues est calculée pour chaque spectre de l'image^{337,338}.

Pour modéliser la contribution de la colle et du SC, les spectres moyens générés par K-means sont utilisés comme signatures sources. Pour chaque spectre, un coefficient est attribué à chacune des signatures sources. La contribution de la colle est ensuite soustraite de chaque spectre en multipliant chaque source par son coefficient correspondant.

Comme indiqué précédemment différents nombres de centroïdes ont été générés par K-means et testés par NCLS : 100, 50 et 5. Les fittings avec un nombre de centroïdes élevé

(100,50) ont générés des coefficients nuls pour plusieurs centroïdes dans les spectres. Seuls 5 centroïdes avaient des coefficients non nuls.

Le choix s'est alors porté vers une K-means avec 5 clusters. Comme indiqué précédemment, 3 sont associés à la colle et deux au SC. La Figure 55 montre un exemple de spectres après élimination de la contribution de la colle.

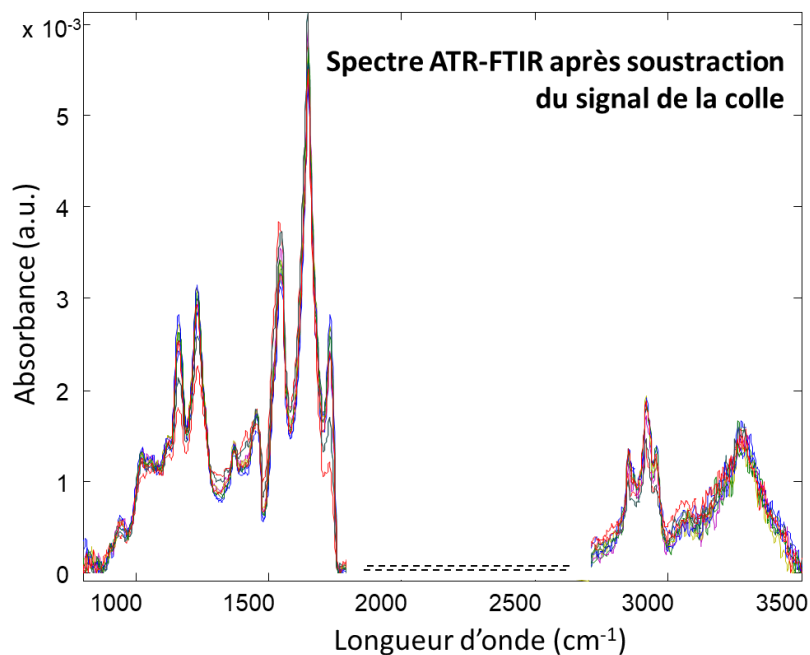


Figure 55. Exemple de spectre obtenu en ATR-imaging après étapes d'élimination du signal associé à la colle

Traitement des données :

Les différents descripteurs vibrationnels Raman et infrarouge ont été calculés à partir des spectres prétraités. Une analyse de variance ANOVA a été utilisée pour la comparaison des différents groupes.

b. Analyses de la composition des lipides du SC, après prélèvement par écouvillonnage

Les prélèvements de SC réalisés sur le front par écouvillonnage ont été analysés par NPLC/HR-MS en utilisant le protocole appliqué aux échantillons de l'étude portant sur la population acnéique, afin d'obtenir des informations sur les modifications de composition du SC. La Figure 56 présente un chromatogramme obtenu lors de cette campagne d'analyse. Le même traitement de données a également été utilisé.

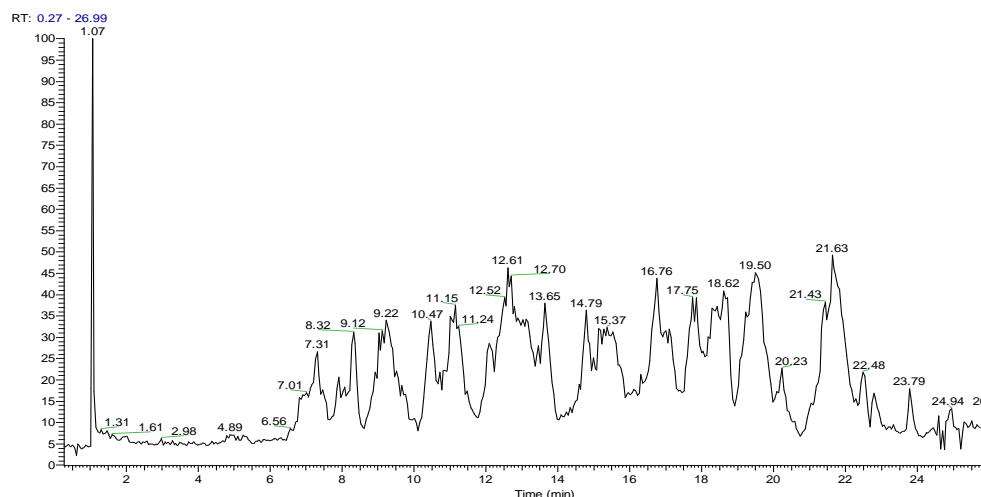


Figure 56. Exemple de chromatogramme obtenu après analyse par NPLC/HRMS, dans le cadre du projet « Under The Pole »

Une ANOVA ($pV < 0,01$) a été réalisée entre les différents temps de l'expédition J0, J28 et J56. Ces analyses n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives au sein des composés lipidiques du SC, entre les différents jours de l'expédition.

Ces résultats pourraient mettre en avant une absence de perturbation majeure des voies de biosynthèses lipidiques au sein du SC. Néanmoins, le faible nombre de volontaires impliqués ($n=7$), la variabilité interindividuelle importante, ainsi que les conditions de prélèvement et de conservation des échantillons pourraient également impacter les résultats obtenus.

2. Résultats : Impacts des conditions environnementales extrêmes sur la barrière cutanée

a. Impact direct des plongées sur le contenu en eau et la perte insensible en eau

Les mesures de contenu en eau (cornéomètre) et de perte insensible en eau (tewamètre) (Figure 57) nous ont permis de mettre en évidence l'impact des plongées en eaux profondes sur leur variation. Nous avons pu observer une augmentation de 100% de la teneur en eau après chaque plongée (Figure 57.A), avant une diminution drastique quelques minutes après seulement. Deux heures après, nous avons observé un contenu en eau encore diminué, retrouvant le niveau mesuré avant la plongée.

De la même manière, nous avons observé une augmentation de la perte insensible en eau

juste après la plongée (Figure 57.B), qui a retrouvé son niveau initial deux heures après la réalisation de la plongée.

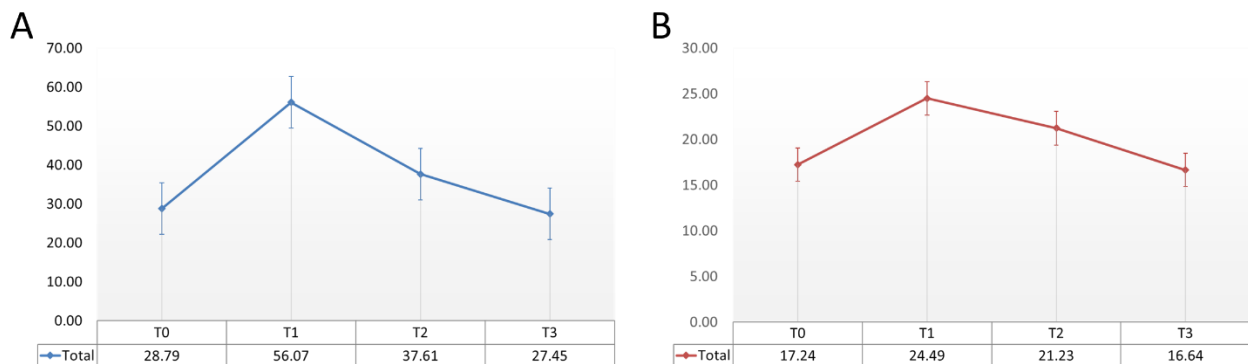


Figure 57. A. Evolution du contenu en eau, mesurée par Moisturemeter, B. Evolution de la perte insensible en eau, mesurée par Vapometer, avant et après la plongée. Moyenne \pm SEM. T0 : juste avant la plongée, T1 : juste après la plongée, T2 : 5min après la plongée

Ces résultats nous permettent d'observer un mécanisme instantané de réaction de la peau, suite à ces plongées en eaux profondes.

b. Impact de la vie en conditions extrêmes, à court terme

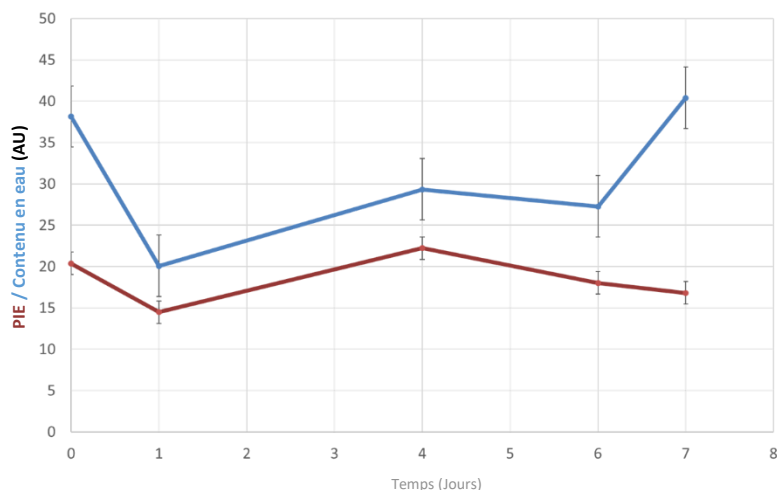


Figure 58. Evolution du contenu en eau (en bleu) et de la perte insensible en eau (en rouge) au cours des dix premiers jours de l'expédition.

Les mesures de contenu en eau et de perte insensible en eau durant les premiers jours de l'expédition dans l'océan Arctique, nous ont permis de mettre en évidence que les

changements de température et d'humidité induisent une baisse de 47,3% de la teneur en eau, accompagnée d'une diminution du PIE. En revanche, sept jours après, la peau montre une adaptation, le taux d'hydratation ainsi que la PIE retrouvent leurs niveaux initiaux.

c. Impact de la vie en conditions extrêmes, à long terme, sur les paramètres de surface

Les résultats obtenus à plus long terme nous permettent d'observer l'effet cumulatif de plusieurs plongées à la fois sur la teneur en eau et sur la barrière cutanée (Figure 59). Après 56 jours, la teneur en eau a été réduite de 17 % tandis que le PIE a été augmentée.

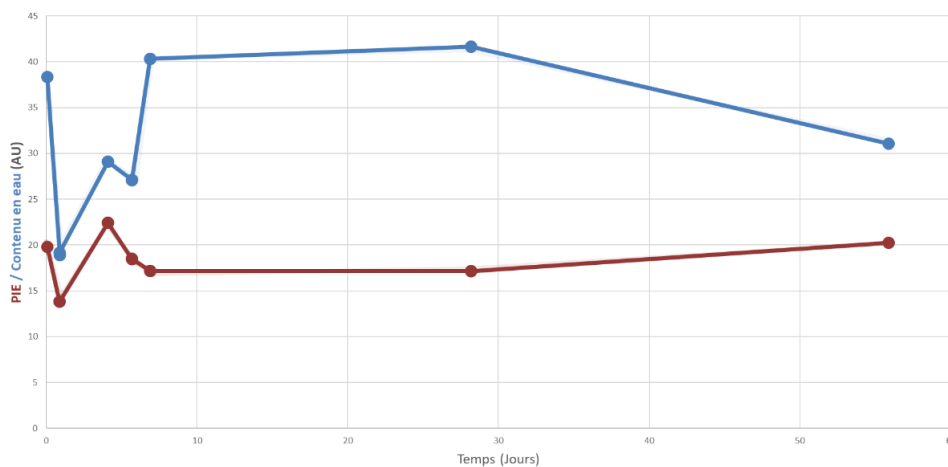


Figure 59. Evolution du contenu en eau (en bleu) et de la perte insensible en eau (en rouge) au cours de la totalité de l'expédition (J0, J28 et J56).

Concernant l'aspect visuel, l'apparence du visage semble plus rouge tandis que la rugosité de la peau augmente considérablement (Figure 60).



Figure 60. Apparence du visage à J0, J28 et J56 de l'expédition

d. Impact de la vie en conditions extrêmes, à long terme, sur le *Stratum Corneum*

L'analyse par spectroscopie Raman des strips obtenus, nous a permis d'observer d'importantes modifications au niveau de l'organisation lipidique au sein du SC. En effet, l'analyse du ratio entre les conformations $\nu C-C_{trans}$ et $\nu C-C_{gauche}$ $((1062+1127)/11080$; Figure 61), permet d'évaluer la compacité des lipides. La diminution de ce ratio observée à 28 jours après le début de l'expédition indique une tendance à la diminution de l'ordre conformationnel. En revanche, un retour à la normale est noté entre J28 et J56, avec une augmentation du ratio, montrant une augmentation de la compacité des lipides du SC.

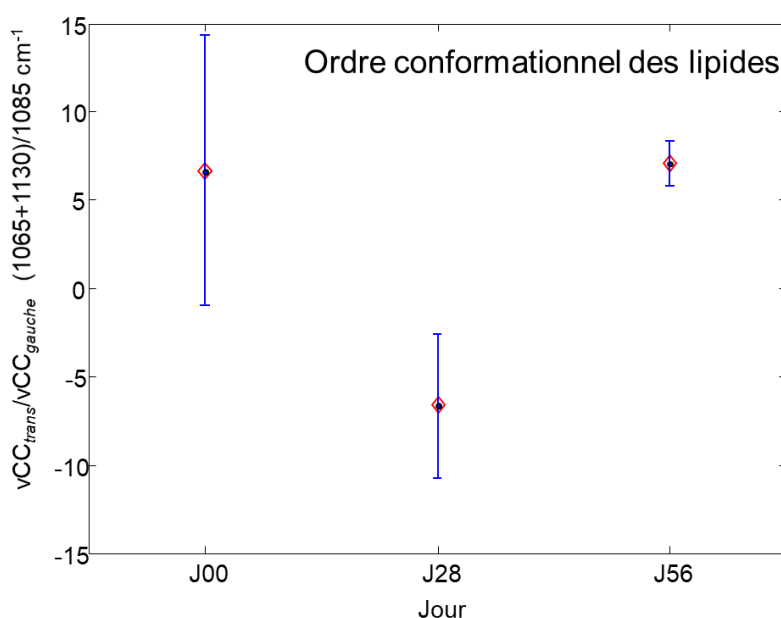


Figure 61. Evolution de l'ordre conformationnel des lipides du SC à J0, J28 et J56, obtenue par analyse du ratio $\nu C-C_{trans}/\nu C-C_{gauche}$.

Un effet de ces conditions extrêmes a également été observé sur les protéines du SC, particulièrement sur la bande Amide I. En effet, celle-ci est directement liée à la structure secondaire des protéines, et peut être déconvoluée en plusieurs sous-bandes associées à différentes formes de structure secondaire ; *i.e.* hélice α , feuillet β , structures aléatoires. Généralement, les structures secondaires des protéines sont formées par les liaisons hydrogène intramoléculaires entre, d'un côté, l'oxygène du groupe carbonyle et de l'autre côté le groupe NH. Ces structures organisées peuvent être affectées par l'ajout/suppression de molécules d'eau. La liaison hydrogène ($-C=O \dots H-N$) pourrait être affaiblie par une

présence excessive de molécules d'eau s'insérant entre les chaînes peptidiques ($-C=O...H_2O...H-N$). La sous-bande, observée à 1650 cm^{-1} est associée à la forme en hélice α de la kératine, tandis que la sous-bande apparaissant vers 1670 cm^{-1} a été attribuée aux feuillets β .

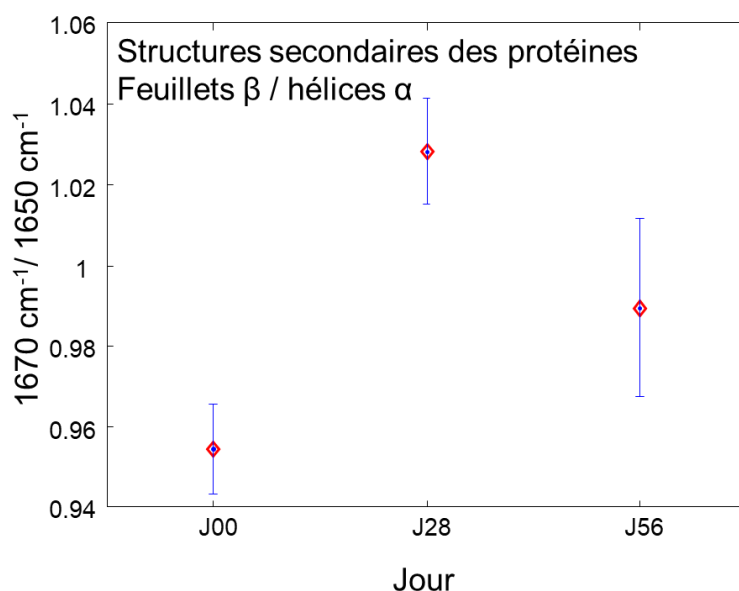


Figure 62. Evolution de la structure secondaire des protéines : ratio entre les feuillets β et les hélices α .

L'observation des structures secondaires des protéines (Figure 62) montre une tendance d'évolution non significative avec une augmentation de la part relative de l'aire sous la courbe associée aux feuillets β par rapport aux hélices α 28 jours après le début de l'expédition. 56 jours après le début de l'expédition, une diminution de ce rapport indique une tendance de retour vers la normale.

Les signatures spectrales Raman étant largement impactées par la contribution de la colle et les résultats obtenus montrant des tendances non significatives, ces tendances nécessitaient d'être confirmées par des mesures complémentaires.

Dans cet objectif, des analyses complémentaires des strips ont été réalisées en ARTR-imaging. Ces analyses nous ont permis d'observer et de confirmer les variations organisationnelles observées au niveau du SC avec les analyses réalisées par spectroscopie Raman. En effet, l'analyse de la position de $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ en ATR, nous informe sur l'état

organisationnel des lipides du SC. L'augmentation significative observée entre J0 et J28 (Figure 63) montre clairement une désorganisation lipidique. La diminution significative de ce marqueur observé entre J28 et J56, montre quant à elle, le retour à une meilleure organisation.

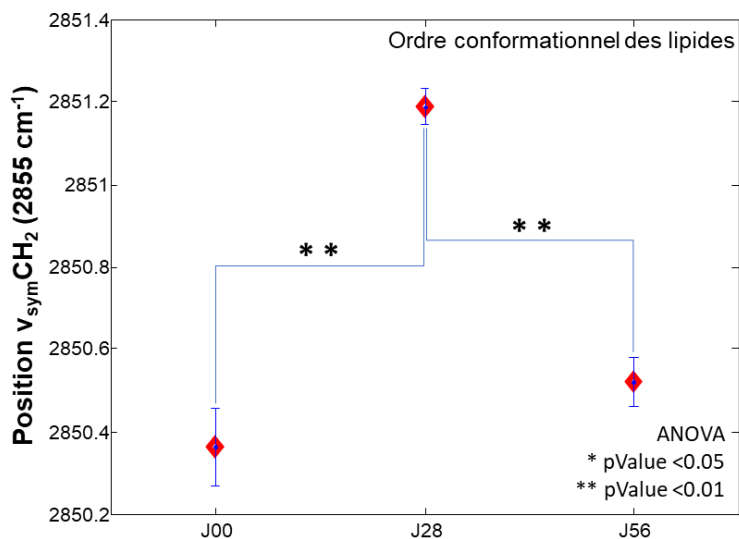


Figure 63. Evolution de la position de $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ observée en ATR-imaging, à J0, J28 et J56 de l'expédition.

D'autre part, l'analyse de la structure secondaire des protéines par ATR-imaging, à travers le ratio feuillets β /hélices α ((1630 cm^{-1} + 1670 cm^{-1})/1650 cm^{-1} ; Figure 64), confirme l'augmentation de ce rapport également observé lors des analyses par spectroscopie Raman. Ces résultats montrent alors une augmentation de la contribution des feuillets β . Ces résultats, montrant une augmentation des feuillets β et une diminution de la compacité des lipides à J28, est cohérente avec de précédents résultats obtenus au sein de l'équipe sur SC *ex vivo*³²⁵.

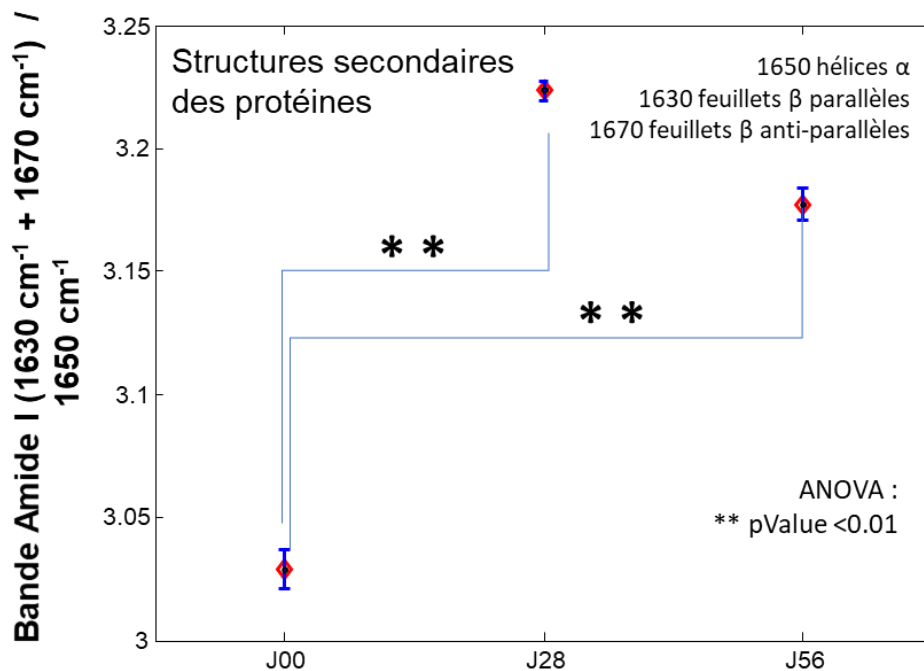


Figure 64. Evolution du rapport des structures secondaires des protéines : feuillets β /hélices α ; à J0, J28 et J56 de l'expédition.

3. Conclusion : Adaptation de la peau dans des conditions de température et d'humidité extrêmes

La réalisation de cette étude nous a permis d'observer des adaptations majeures de la peau dans des conditions de température et d'humidité extrêmes. En effet, avec le choc climatique, la peau subit un stress hydrique important avant de subir une adaptation sept jours plus tard. L'équilibre est alors maintenu, jusqu'à un affaiblissement vers le cinquante-sixième jour. De la même manière, les descripteurs lipidiques ont mis en évidence une adaptation épidermique face à des conditions environnementales extrêmes pouvant expliquer les variations de teneur en eau et de PIE. Après une désorganisation des lipides du SC au cours des vingt-huit premiers jours de l'expédition, leur organisation retrouve ensuite un état identique à celui de départ, au cinquante-sixième jour de l'expédition. Ces résultats, pertinents pour comprendre le comportement de la peau dans des conditions extrêmes, pourraient être utiles afin de développer de nouveaux produits pour prévenir la déshydratation épidermique et ainsi mieux protéger la fonction barrière cutanée.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Les différentes manifestations cliniques observées au niveau cutané sont liées à des phénomènes moléculaires complexes sous-jacents, dans les différentes couches de la peau. Grâce à des techniques récentes, innovantes et performantes, ces phénomènes peuvent aujourd'hui être mieux caractérisés, permettant ainsi d'apporter une meilleure compréhension de différentes conditions physio-pathologiques. Les travaux de cette thèse ont permis une caractérisation réalisée plus précisément au niveau de la surface cutanée et du *Stratum Corneum*, jouant un rôle majeur dans la fonction essentielle de barrière cutanée, grâce à une approche innovante et multiparamétrique. La caractérisation des modifications cutanées dans le cas du vieillissement, de l'acné et dans le cas de conditions environnementales extrêmes a nécessité la mise en place et l'optimisation d'un protocole le plus complet possible, tout en prenant en compte le cadre juridique des études cliniques *in vivo*, les contraintes méthodologiques, organisationnelles et scientifiques.

Le vieillissement cutané représente actuellement un intérêt majeur en recherche, cependant, nous avons observé que peu d'informations sont disponibles concernant les femmes âgées de plus de 70 ans, pourtant très actives aujourd'hui, et très sensibles à leur apparence. Les analyses réalisées nous ont permis d'observer d'importants changements à différents niveaux. En effet, une diminution de l'activité des glandes sébacées a clairement été mise en évidence, ainsi qu'une diminution de la quantité de lipides au sein du *Stratum Corneum*. D'autre part, une modification de la composition des LCS a été observée, suggérant une modification de l'activité enzymatique et par conséquent du microbiote, avec l'augmentation de l'hydrolyse des TG et l'augmentation du 2,3-oxydosqualène, produit de peroxydation du squalène, encore jamais détectée à ce jour dans le cas du vieillissement cutané. En parallèle, l'utilisation de la spectroscopie Raman et l'analyse des lipides du SC nous ont permis de mettre en évidence d'importantes modifications de la structure de la matrice lipidique intercornéocytaire, jouant un rôle primordial dans la fonction barrière cutanée. Malgré la diminution quantitative des lipides, des adaptations qualitatives ont

clairement été mises en avant. Alors que le SC s'épaissit, l'organisation lipidique devient plus compacte, des changements majeurs de composition des céramides interviennent avec notamment une augmentation des longueurs de chaînes carbonées et du taux d'estérification, tendant à montrer une amélioration de la fonction barrière cutanée. Ces résultats ont été complétés par l'observation de la diminution de la perte en eau transdermique avec l'âge, signe également d'un renforcement de la barrière cutanée chez les femmes de plus de 70 ans. Ce résultat a de nombreuses fois été observé mais jusqu'à ce jour non expliqué dans la littérature.

L'acné et les problématiques d'hyperséborrhée touchent, quant à elles, une grande partie de la population, comprenant les adolescents mais également les adultes. En apportant une meilleure caractérisation, nous cherchons à être plus à même de proposer des solutions afin de pallier aux désordres cutanés pouvant survenir à différents moments de la vie. L'étude de la peau grasse ainsi que de la peau acnéique, nous a permis d'observer que ces deux situations forment deux problématiques indépendantes, faisant appel à des voies biologiques distinctes.

Les travaux réalisés nous ont permis d'observer une modification principale dans les peaux grasses, notamment au niveau visuel, avec une augmentation importante de la brillance cutanée. L'utilisation de la HT-GC/MS pour l'analyse de la composition des LCS a montré que cette augmentation, en plus de l'augmentation importante de la quantité de lipides à la surface de la peau, semble être associée à un changement de composition des LCS. En effet, une augmentation du nombre d'insaturations dans la classe des cires provoquerait des modifications d'apparence, avec notamment une augmentation de la brillance spéculaire. En revanche, la problématique de peau grasse ne semble pas avoir d'impact majeur sur la matrice lipidique intercornéocytaire, semblant ainsi préserver la barrière cutanée.

Dans le cas de l'acné, notamment des peaux à tendance acnéique, de fortes modifications ont été observées à différents niveaux, confirmant le caractère multifactoriel de cette pathologie cutanée. L'augmentation de l'activité sébacée ainsi que l'augmentation spécifique de certains composés tels que le squalène ou encore ses produits de

peroxydation, sont caractéristiques de l'hyperséborrhée ainsi que de la modification de composition des LCS, connus pour présenter une activité comédogène et une éventuelle implication dans l'inflammation cutanée. D'autre part, l'augmentation de l'hydrolyse des TG au sein des LCS ainsi que l'augmentation de *C.acnes* confirme les modifications majeures ayant lieu au sein du microbiome. La diminution des céramides estérifiés, notamment les sous classes [EOH] et [EOS] et l'augmentation des céramides mono-insaturés possédant une base sphingoïde [S], participant à la composition du ciment intercornéocytaire, tendent à montrer une altération de cette matrice lipidique et ainsi de la fonction barrière cutanée. De manière complémentaire, une signature spécifique au sein de la composition des LCS a pu être identifiée pour les peaux grasses ainsi que pour les peaux acnéiques.

L'étude des modifications cutanées dans des conditions environnementales extrêmes, de température et d'humidité notamment, nous a permis de mettre en évidence une adaptation marquée de la peau. Avec le choc climatique, la peau semble subir un stress hydrique très important, avant de s'adapter rapidement au bout d'une semaine dans ces mêmes conditions. De la même manière, la matrice lipidique apparaît désorganisée au bout de 28 jours dans des conditions extrêmes, avant de retrouver son état initial, au bout de 56 jours. Ces résultats suggèrent alors une adaptation sur le long terme, malgré une première altération de la barrière cutanée, et pourraient être utiles afin de développer de nouveaux produits pour prévenir la déshydratation épidermique et mieux protéger la fonction barrière cutanée.

Les travaux réalisés durant cette thèse nous ont donc permis de mettre en évidence de nombreuses et importantes adaptations *in vivo*, ayant lieu au niveau de différentes structures constituant la barrière cutanée, notamment au niveau du film hydrolipidique et du *Stratum Corneum* dans les différentes conditions physio-pathologiques étudiées. Les résultats nous ont également permis de mettre en évidence l'importance majeure de la complémentarité de différentes méthodes d'investigation *in vivo* utilisées afin d'aboutir à un résultat pertinent.

Perspectives

Les travaux réalisés pendant cette thèse nous ont permis d'observer l'importance du caractère multi-paramétrique des études réalisées. En revanche, cette disposition entraîne la collecte d'une quantité très importante de données et de résultats. Le développement d'une approche chimiométrique permettant un traitement de données plus élaboré semble alors indispensable. En effet, cela nous permettrait d'obtenir un « témoin analytique de la surface cutanée », associant ainsi la totalité des techniques utilisées et mettant en évidence les différents liens, obtenus par les analyses réalisées à différents niveaux. Cela permettrait également 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*. Ce développement constituerait également une méthode plus facilement transposable à l'étude d'autres conditions physiopathologiques cutanées, et permettrait ainsi de déterminer d'éventuels nouveaux biomarqueurs lipidiques liés aux problématiques étudiées.

Afin de compléter les résultats obtenus concernant la composition des lipides du SC dans le cas de l'hyperséborrhée et de l'acné, l'analyse de la structure lipidique du SC par spectroscopie Raman *in vivo* porterait un intérêt majeur, afin de compléter les résultats évoquant jusqu'à présent une altération de la fonction barrière cutanée.

L'analyse de la composition des lipides du SC nous a permis d'obtenir des hypothèses biologiques d'intérêt dans les différentes conditions physio-pathologiques étudiées. Ces résultats pourraient être complétés avec de nouvelles optimisations de la méthode utilisée en NP-HPLC/HR-MS. En effet, les résultats obtenus jusqu'à maintenant peuvent comprendre plusieurs hypothèses. L'utilisation, entre autres, de la fragmentation par CID permet une fragmentation plus douce que celle obtenue par HCD, cela nous donnerait ainsi l'accès au schéma de fragmentation des molécules. De plus, l'analyse en spectrométrie de masse en haute résolution au niveau MS² et MS³ permettrait d'avoir accès à leur structure moléculaire

exacte et à la structure fine de l'ensemble des fragments. Ces analyses permettraient également l'étude des autres classes lipidiques du SC (glucosylcéramides, sphingomyélines, acides gras libres, cholestérol, triglycérides), pouvant représenter un intérêt complémentaire dans la compréhension des phénomènes observés.

In fine, ces travaux nous ont permis la mise en place d'un outil global permettant d'apporter une caractérisation approfondie de diverses conditions physio-pathologiques, tout en montrant l'importance de la complémentarité et de la performance des méthodes *in vivo* appliquées à la caractérisation cutanée. Après l'acquisition de ces compétences, cette approche testée et validée à travers trois études permettrait d'élargir les projets de recherche. En effet, le champ d'application de cet outil pourrait être complété par l'étude d'autres composants acteurs de la fonction barrière cutanée tels que les NMF, les protéines, ou encore la flore cutanée. 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 biologie sus-cutanée, exprimant au mieux le fonctionnement complexe de l'organe indispensable que représente la peau.

Références

- (1) Dréno, B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* **2009**, 136, S247-S251.
- (2) Lampe, M. A.; Burlingame, A.; Whitney, J.; Williams, M. L.; Brown, B. E.; Roitman, E.; Elias, P. M. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *Journal of lipid research* **1983**, 24, 120-130.
- (3) Agache, P.: *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées Pierre Agache et al*; Edition Medicale International, 2000.
- (4) Baroni, A.; Buommino, E.; De Gregorio, V.; Ruocco, E.; Ruocco, V.; Wolf, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in dermatology* **2012**, 30, 257-262.
- (5) Mohammed, D.; Matts, P. J.; Hadgraft, J.; Lane, M. E. Variation of stratum corneum biophysical and molecular properties with anatomic site. *The AAPS journal* **2012**, 14, 806-812.
- (6) Norlen, L.; Nicander, I.; Lundh Rozell, B.; Ollmar, S.; Forslind, B. Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo. *The Journal of investigative dermatology* **1999**, 112, 72-77.
- (7) Nguyen, T.; Gobinet, C.; Feru, J.; Pasco, S. B.; Manfait, M.; Piot, O. 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, 421-427.
- (8) Xu, F.; Lu, T.: Skin Structure and Skin Blood Flow. In *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*; Springer, 2011; pp 7-19.
- (9) Martini, M.-C.: *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*; Lavoisier, 2011.
- (10) Camera, E.; Ottaviani, M.; Picardo, M.: Squalene chemistry and biology. In *Lipids and Skin Health*; Springer, 2015; pp 185-198.
- (11) Madison, K. C. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **2003**, 121, 231-241.
- (12) Greene, R. S.; Downing, D. T.; Pochi, P. E.; Strauss, J. S. Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid. *The Journal of investigative dermatology* **1970**, 54, 240-247.
- (13) Vantrou, M.; Venencie, P.; CHAUMEIL, J.-C. In *Tilte*1987.
- (14) Sheu, H. M.; Chao, S. C.; Wong, T. W.; Yu-Yun Lee, J.; Tsai, J. C. Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum. *The British journal of dermatology* **1999**, 140, 385-391.
- (15) Zouboulis, C. C. Acne and sebaceous gland function. *Clinics in dermatology* **2004**, 22, 360-366.
- (16) Schneider, M. R.; Paus, R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2010**, 42, 181-185.
- (17) Humbert, P. Conséquences fonctionnelles des perturbations des lipides cutanés. *Pathologie Biologie* **2003**, 51, 271-274.

- (18) Downing, D. T.; Strauss, J. S. Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **1974**, *62*, 228-244.
- (19) Stewart, M. E.; Downing, D. T.; Cook, J. S.; Hansen, J. R.; Strauss, J. S. Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls. *Archives of dermatology* **1992**, *128*, 1345-1348.
- (20) Pappas, A.; Fantasia, J.; Chen, T. Age and ethnic variations in sebaceous lipids. *Dermato-endocrinology* **2013**, *5*, 319-324.
- (21) Nicolaides, N. Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science* **1974**, *186*, 19-26.
- (22) Camera, E.; Ludovici, M.; Galante, M.; Sinagra, J. L.; Picardo, M. Comprehensive analysis of the major lipid classes in sebum by rapid resolution high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Journal of lipid research* **2010**, *51*, 3377-3388.
- (23) Michael-Jubeli, R.; Bleton, J.; Baillet-Guffroy, A. High-temperature gas chromatography-mass spectrometry for skin surface lipids profiling. *Journal of lipid research* **2011**, *52*, 143-151.
- (24) Boniforti, L.; Passi, S.; Caprilli, F.; Porro, M. N. Skin surface lipids. Identification and determination by thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta* **1973**, *47*, 223-231.
- (25) Downing, D. T.; Greene, R. S. Double bond positions in the unsaturated fatty acids of vernix caseosa. *Journal of Investigative Dermatology* **1968**, *50*, 380-386.
- (26) Downing, D. T.; Strauss, J. S.; Pochi, P. E. Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. *Journal of Investigative Dermatology* **1969**, *53*, 322-327.
- (27) Strauss, J. S.; Pochi, P. E.; Downing, D. T. The sebaceous glands: twenty-five years of progress. *Journal of Investigative Dermatology* **1976**, *67*, 90-97.
- (28) Pappas, A. Epidermal surface lipids. *Dermato-endocrinology* **2009**, *1*, 72-76.
- (29) Huang, Z. R.; Lin, Y. K.; Fang, J. Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules* **2009**, *14*, 540-554.
- (30) Kohno, Y.; Egawa, Y.; Itoh, S.; Nagaoka, S.-i.; Takahashi, M.; Mukai, K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1995**, *1256*, 52-56.
- (31) Haahti, E.; Horning, E. Isolation and characterization of saturated and unsaturated fatty acids and alcohols of human skin surface lipids. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **1963**, *15*, 73-78.
- (32) Ansari, M.; Fu, H.; Nicolaides, N. Fatty acids of the alkane diol diesters of vernix caseosa. *Lipids* **1970**, *5*, 279-282.
- (33) Kaerkkäinen, J.; Nikkari, T.; Ruponen, S.; Haahti, E. Lipids of vernix caseosa. *Journal of Investigative Dermatology* **1965**, *44*, 333-338.
- (34) Nicolaides, N.; Fu, H. C.; Ansari, M.; Rice, G. R. The fatty acids of wax esters and sterol esters from vernix caseosa and from human skin surface lipid. *Lipids* **1972**, *7*, 506-517.

- (35) Saint-Léger, D.; Lévêque, J. Les méthodes d'évaluation quantitative des lipides de surface chez l'homme. Présentation d'une nouvelle procédure. *International journal of cosmetic science* **1980**, *2*, 283-294.
- (36) Shalita, A. R. Genesis of free fatty acids. *Journal of Investigative Dermatology* **1974**, *62*.
- (37) Pablo, G.; Hammons, A.; Bradley, S.; Fulton Jr, J. E. Characteristics of the extracellular lipases from corynebacterium acnes and staphylococcus epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **1974**, *63*, 231-238.
- (38) Brancalion, L.; Bamberg, M. P.; Kollias, N. Spectral Differences between Stratum Corneum and Sebaceous Molecular Components in the Mid-IR. *Applied Spectroscopy* **2000**, *54*, 1175-1182.
- (39) Knox, S.; O'Boyle, N. M. Skin Lipids in Health and Disease: A Review. *Chemistry and Physics of Lipids* **2021**, 105055.
- (40) Radner, F. P.; Fischer, J. The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841*, 409-415.
- (41) Sjövall, P.; Skedung, L.; Gregoire, S.; Biganska, O.; Clément, F.; Luengo, G. S. Imaging the distribution of skin lipids and topically applied compounds in human skin using mass spectrometry. *Scientific reports* **2018**, *8*, 1-14.
- (42) Sadowski, T.; Klose, C.; Gerl, M. J.; Wojcik-Maciejewicz, A.; Herzog, R.; Simons, K.; Reich, A.; Surma, M. A. Large-scale human skin lipidomics by quantitative, high-throughput shotgun mass spectrometry. *Scientific reports* **2017**, *7*, 43761.
- (43) Feingold, K. R. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *Journal of lipid research* **2009**, *50 Suppl*, S417-422.
- (44) Elias, P. M.; Crumrine, D.; Rassner, U.; Hachem, J.-P.; Menon, G. K.; Man, W.; Choy, M. H. W.; Leypoldt, L.; Feingold, K. R.; Williams, M. L. Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. *Journal of investigative dermatology* **2004**, *122*, 314-319.
- (45) Smith, K. R.; Thiboutot, D. M. Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *Journal of lipid research* **2008**, *49*, 271-281.
- (46) Nikkari, T. Comparative chemistry of sebum. *The Journal of investigative dermatology* **1974**, *62*, 257-267.
- (47) Yardley, H. J.; Summerly, R. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacology & therapeutics* **1981**, *13*, 357-383.
- (48) Picardo, M.; Ottaviani, M.; Camera, E.; Mastrofrancesco, A. Sebaceous gland lipids. *Dermato-endocrinology* **2009**, *1*, 68-71.
- (49) Zouboulis, C. C.; Baron, J. M.; Böhm, M.; Kippenberger, S.; Kurzen, H.; Reichrath, J.; Thielitz, A. Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Experimental dermatology* **2008**, *17*, 542-551.
- (50) Mavon, A.; Zahouani, H.; Redoules, D.; Agache, P.; Gall, Y.; Humbert, P. 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*, 147-155.
- (51) Pilgram, G.; Van der Meulen, J.; Gooris, G.; Koerten, H.; Bouwstra, J. The

influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2001**, *1511*, 244-254.

(52) Man, M. Q.; Xin, S. J.; Song, S. P.; Cho, S. Y.; Zhang, X. J.; Tu, C. X.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. 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*, 190-199.

(53) Fluhr, J. W.; Mao-Qiang, M.; Brown, B. E.; Wertz, P. W.; Crumrine, D.; Sundberg, J. P.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice. *The Journal of investigative dermatology* **2003**, *120*, 728-737.

(54) Thiele, J. J.; Weber, S. U.; Packer, L. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *The Journal of investigative dermatology* **1999**, *113*, 1006-1010.

(55) Wille, J.; Kydonieus, A. Palmitoleic acid isomer (C16: 1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. *Skin pharmacology and physiology* **2003**, *16*, 176-187.

(56) Byrd, A. L.; Belkaid, Y.; Segre, J. A. The human skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology* **2018**, *16*, 143-155.

(57) Pilgram, G. S.; Vissers, D. C.; van der Meulen, H.; Koerten, H. K.; Pavel, S.; Lavrijsen, S. P.; Bouwstra, J. A. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *Journal of investigative dermatology* **2001**, *117*, 710-717.

(58) Guo, J.-W.; Lin, T.-K.; Wu, C.-H.; Wei, K.-C.; Lan, C.-C. E.; Peng, A. C.-Y.; Tsai, J.-C.; Sheu, H.-M. Human sebum extract induces barrier disruption and cytokine expression in murine epidermis. *Journal of dermatological science* **2015**, *78*, 34-43.

(59) Coderch, L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L. Ceramides and skin function. *American journal of clinical dermatology* **2003**, *4*, 107-129.

(60) Boncheva, M. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *International journal of cosmetic science* **2014**, *36*, 505-515.

(61) Feingold, K. R.; Elias, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1841*, 280-294.

(62) Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G. Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema. *Journal of investigative dermatology* **2011**, *131*, 2136-2138.

(63) Feingold, K. R. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of lipid research* **2007**, *48*, 2531-2546.

(64) van Smeden, J.; Boiten, W. A.; Hankemeier, T.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Vreeken, R. J. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1841*, 70-79.

(65) Wohlrab, J.; Gabel, A.; Wolfram, M.; Grosse, I.; Neubert, R. H.; Steinbach, S. C. Age- and diabetes-related changes in the free fatty acid composition of the human stratum corneum. *Skin pharmacology and physiology* **2018**, *31*, 283-291.

(66) Vávrová, K.; Kováčik, A.; Opálka, L. Ceramides in the skin barrier. *Acta*

Facultatis Pharmaceuticae **2017**, 64, 28.

(67) Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, 1841, 422-434.

(68) Van Smeden, J.; Bouwstra, J. A. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Skin barrier function* **2016**, 49, 8-26.

(69) Elias, P. M. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology* **2005**, 125, 183-200.

(70) Long, S.; Wertz, P.; Strauss, J.; Downing, D. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Archives of dermatological research* **1985**, 277, 284-287.

(71) Giménez-Arnau, A. Standards for the protection of skin barrier function. *Skin Barrier Function* **2016**, 49, 123-134.

(72) van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, 1841, 295-313.

(73) Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Kita, K. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *Journal of lipid research* **2008**, 49, 1466-1476.

(74) van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *Journal of lipid research* **2011**, 52, 1211-1221.

(75) Breiden, B.; Sandhoff, K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, 1841, 441-452.

(76) Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Gröne, H.-J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *Journal of lipid research* **2013**, 54, 3312-3321.

(77) Kawana, M.; Miyamoto, M.; Ohno, Y.; Kihara, A. Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *Journal of lipid research* **2020**, 61, 884-895.

(78) Assi, A.; Bakar, J.; Libong, D.; Sarkees, E.; Solgadi, A.; Baillet-Guffroy, A.; Michael-Jubeli, R.; Tfayli, A. Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MS n: 1-OE (EO) Cer, a new ceramide subclass. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2020**, 412, 777-793.

(79) Bakar, J. Etude de la biosynthèse lipidique au cours de la différenciation kératinocytaire en lien avec l'intégrité de la fonction barrière cutanée. université Paris-Saclay, 2021.

(80) Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1993**, 1182, 147-151.

(81) t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2012**, 84, 403-411.

- (82) Hinder, A.; Schmelzer, C.; Rawlings, A.; Neubert, R. Investigation of the molecular structure of the human stratum corneum ceramides [NP] and [EOS] by mass spectrometry. *Skin pharmacology and physiology* **2011**, *24*, 127-135.
- (83) Kondo, N.; Ohno, Y.; Yamagata, M.; Obara, T.; Seki, N.; Kitamura, T.; Naganuma, T.; Kihara, A. Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nature communications* **2014**, *5*, 1-13.
- (84) Školová, B.; Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepíčka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A. Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir* **2013**, *29*, 15624-15633.
- (85) Opálka, L.; Kováčik, A.; Pullmannová, P.; Maixner, J.; Vávrová, K. Effects of omega-O-acylceramide structures and concentrations in healthy and diseased skin barrier lipid membrane models. *Journal of lipid research* **2020**, *61*, 219-228.
- (86) Sahle, F. F.; Gebre-Mariam, T.; Dobner, B.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin pharmacology and physiology* **2015**, *28*, 42-55.
- (87) Fischer, C. L. Antimicrobial activity of host-derived lipids. *Antibiotics* **2020**, *9*, 75.
- (88) Wertz, P. W. Lipids and the Permeability and Antimicrobial Barriers of the Skin. *Journal of lipids* **2018**, 2018.
- (89) Becam, J.; Walter, T.; Burgert, A.; Schlegel, J.; Sauer, M.; Seibel, J.; Schubert-Unkmeir, A. Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic *Neisseria*. *Scientific reports* **2017**, *7*, 1-12.
- (90) Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91*, 784-790.
- (91) Meckfessel, M. H.; Brandt, S. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2014**, *71*, 177-184.
- (92) Starr, N. J.; Johnson, D. J.; Wibawa, J.; Marlow, I.; Bell, M.; Barrett, D. A.; Scurr, D. J. Age-related changes to human stratum corneum lipids detected using time-of-flight secondary ion mass spectrometry following in vivo sampling. *Analytical chemistry* **2016**, *88*, 4400-4408.
- (93) Boireau-Adamezyk, E.; Baillet-Guffroy, A.; Stamatias, G. N. Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* **2014**, *20*, 409-415.
- (94) Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M. E. Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. *Mechanisms of ageing and development* **2018**, *172*, 6-12.
- (95) Ludovici, M.; Kozul, N.; Materazzi, S.; Risoluti, R.; Picardo, M.; Camera, E. Influence of the sebaceous gland density on the stratum corneum lipidome. *Scientific reports* **2018**, *8*, 1-12.
- (96) Rogers, J.; Harding, C.; Mayo, A.; Banks, J.; Rawlings, A. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Archives of dermatological research* **1996**, *288*, 765-770.
- (97) Wang, Z.; Man, M.-Q.; Li, T.; Elias, P. M.; Mauro, T. M. Aging-associated

alterations in epidermal function and their clinical significance. *Aging (Albany NY)* **2020**, *12*, 5551.

(98) Gilchrest, B. A. Skin aging and photoaging: an overview. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1989**, *21*, 610-613.

(99) Yaar, M.; Eller, M. S.; Gilchrest, B. A. In *Tilte2002*; Elsevier.

(100) Lavker, R. M. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *Journal of Investigative Dermatology* **1979**, *73*, 59-66.

(101) Lavker, R. M.; Kligman, A. M. Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *Journal of investigative dermatology* **1988**, *90*, 325-330.

(102) Lavker, R. M.; Zheng, P.; Dong, G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *Journal of investigative dermatology* **1987**, *88*, 44-51.

(103) Grove, G.; DUNCAN, S.; Kligman, A. Effect of ageing on the blistering of human skin with ammonium hydroxide. *British Journal of Dermatology* **1982**, *107*, 393-400.

(104) Shuster, S.; BLACK, M. M.; McVitie, E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *British Journal of Dermatology* **1975**, *93*, 639-643.

(105) Marks, R. Measurement of biological ageing in human epidermis. *British Journal of Dermatology* **1981**, *104*, 627-633.

(106) Beauregard, S.; Gilchrest, B. A. A survey of skin problems and skin care regimens in the elderly. *Archives of dermatology* **1987**, *123*, 1638-1643.

(107) Longo, C.; Casari, A.; Beretti, F.; Cesinaro, A. M.; Pellacani, G. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* **2013**, *68*, e73-82.

(108) Naylor, E. C.; Watson, R. E.; Sherratt, M. J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **2011**, *69*, 249-256.

(109) Kang, S.; Fisher, G. J.; Voorhees, J. J. Photoaging and topical tretinoin: therapy, pathogenesis, and prevention. *Archives of dermatology* **1997**, *133*, 1280-1284.

(110) Südel, K. M.; Venzke, K.; Mielke, H.; Breitenbach, U.; Mundt, C.; Jaspers, S.; Koop, U.; Sauermann, K.; Knußmann-Hartig, E.; Moll, I. Novel Aspects of Intrinsic and Extrinsic Aging of Human Skin: Beneficial Effects of Soy Extract[¶]. *Photochemistry and photobiology* **2005**, *81*, 581-587.

(111) Robinson, M. K. Population differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment. *Contact dermatitis* **1999**, *41*, 65-79.

(112) Glogau, R. G. Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatologic clinics* **1997**, *15*, 555-559.

(113) Reed, J. T.; Elias, P. M.; Ghadially, R. Integrity and permeability barrier function of photoaged human epidermis. *Archives of dermatology* **1997**, *133*, 395-396.

(114) El-Domyati, M.; Attia, S.; Saleh, F.; Brown, D.; Birk, D.; Gasparro, F.; Ahmad, H.; Uitto, J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental dermatology* **2002**, *11*, 398-405.

(115) Huzaira, M.; Rius, F.; Rajadhyaksha, M.; Anderson, R. R.; González, S.

- Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *Journal of investigative dermatology* **2001**, *116*, 846-852.
- (116) Neerken, S.; Lucassen, G. W.; Bisschop, M. A.; Lenderink, E.; Nuijs, T. A. Characterization of age-related effects in human skin: A comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics* **2004**, *9*, 274-281.
- (117) Branchet, M.; Boissic, S.; Frances, C.; Robert, A. Skin thickness changes in normal aging skin. *Gerontology* **1990**, *36*, 28-35.
- (118) Lock-Andersen, J.; Therkildsen, P.; de Olivarius, F. F.; Gniadecka, M.; Dahlstrom, K.; Poulsen, T.; Wulf, H. C. Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **1997**, *13*, 153-158.
- (119) Grove, G. L. Physiologic changes in older skin. *Clinics in geriatric medicine* **1989**, *5*, 115-125.
- (120) Elias, P. M.; Ghadially, R. The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities. *Clinics in geriatric medicine* **2002**, *18*, 103-120.
- (121) Miller, M. A. F. K. W.; Maibach, H. I. 4 Degenerative Changes in Aging Skin. *Textbook of Aging Skin* **2009**, *19*, 25.
- (122) Tagami, H. Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Archives of dermatological research* **2008**, *300*, 1-6.
- (123) Grove, G. L.; Kligman, A. M. Age-associated changes in human epidermal cell renewal. *Journal of Gerontology* **1983**, *38*, 137-142.
- (124) BAKER, H.; BLAIR, C. P. Cell replacement in the human stratum corneum in old age. *British Journal of Dermatology* **1968**, *80*, 367-372.
- (125) Machado, M.; Hadgraft, J.; Lane, M. E. Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *International journal of cosmetic science* **2010**, *32*, 397-409.
- (126) Ghadially, R.; Brown, B. E.; Sequeira-Martin, S. M.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *The Journal of clinical investigation* **1995**, *95*, 2281-2290.
- (127) Roskos, K. V.; Guy, R. H. Assessment of skin barrier function using transepidermal water loss: effect of age. *Pharmaceutical research* **1989**, *6*, 949-953.
- (128) Wilhelm, K.-P.; Cua, A. B.; Maibach, H. I. Skin aging: effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Archives of dermatology* **1991**, *127*, 1806-1809.
- (129) Berardesca, E.; Maibach, H. Transepidermal water loss and skin surface hydration in the non invasive assessment of stratum corneum function. *Dermatosen in Beruf und Umwelt. Occupation and environment* **1990**, *38*, 50-53.
- (130) Le Fur, I.; Reinberg, A.; Lopez, S.; Morizot, F.; Mechkouri, M.; Tschachler, E. Analysis of circadian and ultradian rhythms of skin surface properties of face and forearm of healthy women. *Journal of investigative dermatology* **2001**, *117*, 718-724.
- (131) Wendling, P. A.; Dell'Acqua, G. Skin biophysical properties of a population

living in Valais, Switzerland. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* **2003**, *9*, 331-338.

(132) Fritsch, M.; Orfanos, C. E.; Zouboulis, C. C. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *The Journal of investigative dermatology* **2001**, *116*, 793-800.

(133) Giltay, E. J.; Gooren, L. J. Effects of sex steroid deprivation/administration on hair growth and skin sebum production in transsexual males and females. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **2000**, *85*, 2913-2921.

(134) Dieudonne, M.; Pecquery, R.; Leneuve, M.; Giudicelli, Y. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor γ 2. *Endocrinology* **2000**, *141*, 649-656.

(135) Tavakkol, A.; Varani, J.; Elder, J. T.; Zouboulis, C. C. Maintenance of human skin in organ culture: role for insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor. *Archives of dermatological research* **1999**, *291*, 643-651.

(136) Shetage, S. S.; Traynor, M. J.; Brown, M. B.; Raji, M.; Graham-Kalio, D.; Chilcott, R. P. Effect of ethnicity, gender and age on the amount and composition of residual skin surface components derived from sebum, sweat and epidermal lipids. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* **2014**, *20*, 97-107.

(137) Hayashi, N.; Togawa, K.; Yanagisawa, M.; Hosogi, J.; Mimura, D.; Yamamoto, Y. Effect of sunlight exposure and aging on skin surface lipids and urate. *Experimental dermatology* **2003**, *12 Suppl 2*, 13-17.

(138) Jacobsen, E.; Billings, J. K.; Frantz, R. A.; Kinney, C. K.; Stewart, M. E.; Downing, D. T. Age-related changes in sebaceous wax ester secretion rates in men and women. *The Journal of investigative dermatology* **1985**, *85*, 483-485.

(139) Pelle, E.; Muizzuddin, N.; Mammone, T.; Marenus, K.; Maes, D. Protection against endogenous and UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **1999**, *15*, 115-119.

(140) Saint-Leger, D.; Bague, A.; Lefebvre, E.; Cohen, E.; Chivot, M. A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. II. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acne patients. *The British journal of dermatology* **1986**, *114*, 543-552.

(141) Waller, J. M.; Maibach, H. I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin research and technology* **2005**, *11*, 221-235.

(142) Cua, A. B.; Wilhelm, K.-P.; Maibach, H. I. Skin surface lipid and skin friction: relation to age, sex and anatomical region. *Skin pharmacology and physiology* **1995**, *8*, 246-251.

(143) Schreiner, V.; Pfeiffer, S.; Lanzendörfer, G.; Wenck, H.; Diembeck, W.; Gooris, G. S.; Proksch, E.; Bouwstra, J. Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *Journal of investigative dermatology* **2000**, *114*, 654-660.

- (144) Roskos, K. V.; Guy, R. H.; Maibach, H. I. Percutaneous absorption in the aged. *Dermatologic clinics* **1986**, *4*, 455-465.
- (145) Léger, S.; Francois, A.; Leveque, J.; Stoudemayer, T.; Grove, G.; Kligman, A. Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness. *Dermatology* **1988**, *177*, 159-164.
- (146) Denda, M.; Koyama, J.; Hori, J.; Horii, I.; Takahashi, M.; Hara, M.; Tagami, H. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Archives of dermatological research* **1993**, *285*, 415-417.
- (147) Makrantonaki, E.; Zouboulis, C. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2007**, *1119*, 40-50.
- (148) Potts, R. O.; Francoeur, M. L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *Journal of investigative dermatology* **1991**, *96*, 495-499.
- (149) Denda, M.; Koyama, J.; Namba, R.; Horii, I. Stratum corneum lipid morphology and transepidermal water loss in normal skin and surfactant-induced scaly skin. *Archives of dermatological research* **1994**, *286*, 41-46.
- (150) Tfayli, A.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Raman spectroscopy: feasibility of in vivo survey of stratum corneum lipids, effect of natural aging. *European journal of dermatology : EJD* **2012**, *22*, 36-41.
- (151) Eklouh-Molinier, C.; Gaydou, V.; Froigneux, E.; Barlier, P.; Couturaud, V.; Manfait, M.; Piot, O. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2015**, *407*, 8363-8372.
- (152) Biniek, K.; Tfayli, A.; Vyumvuhore, R.; Quatela, A.; Galliano, M. F.; Delalleau, A.; Baillet-Guffroy, A.; Dauskardt, R. H.; Duplan, H. Measurement of the biomechanical function and structure of ex vivo drying skin using raman spectral analysis and its modulation with emollient mixtures. *Experimental dermatology* **2018**, *27*, 901-908.
- (153) Sano, T.; Kume, T.; Fujimura, T.; Kawada, H.; Moriwaki, S.; Takema, Y. The formation of wrinkles caused by transition of keratin intermediate filaments after repetitive UVB exposure. *Archives of dermatological research* **2005**, *296*, 359-365.
- (154) Egawa, M.; Tagami, H. Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration. *The British journal of dermatology* **2008**, *158*, 251-260.
- (155) Gniadecka, M.; Nielsen, O. F.; Christensen, D. H.; Wulf, H. C. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *Journal of investigative dermatology* **1998**, *110*, 393-398.
- (156) Boireau-Adamezyk, E.; Baillet-Guffroy, A.; Stamatias, G. N. Mobility of water molecules in the stratum corneum: effects of age and chronic exposure to the environment. *The Journal of investigative dermatology* **2014**, *134*, 2046-2049.
- (157) Gniadecka, M.; Wessel, S.; Heidenheim, M.; Wulf, H. C.; Nielsen, O. F.; Christensen, D. H. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *Journal of investigative dermatology* **1998**, *111*, 1129-1133.
- (158) McCallion, R.; Po, A. L. W. Dry and photo-aged skin: and manifestations

management. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* **1993**, *18*, 15-32.

(159) Verdier-Sevrain, S.; Bonte, F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of cosmetic dermatology* **2007**, *6*, 75-82.

(160) Wu, J.; Kilpatrick-Liverman, L. Characterizing the composition of underarm and forearm skin using confocal raman spectroscopy. *International journal of cosmetic science* **2011**, *33*, 257-262.

(161) Oh, J.-H.; Kim, Y. K.; Jung, J.-Y.; Shin, J.-e.; Kim, K. H.; Cho, K. H.; Eun, H. C.; Chung, J. H. Intrinsic aging-and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *Journal of dermatological science* **2011**, *62*, 192-201.

(162) Lopez-Torres, M.; Shindo, Y.; Packer, L. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. *Journal of investigative dermatology* **1994**, *102*, 476-480.

(163) Kohen, R.; Gati, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* **2000**, *148*, 149-157.

(164) Wei, Y.-H.; Lu, C.-Y.; Wei, C.-Y.; Ma, Y.-S.; Lee, H.-C. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chinese journal of physiology* **2001**, *44*, 1-12.

(165) MacLaughlin, J.; Holick, M. F. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *The Journal of clinical investigation* **1985**, *76*, 1536-1538.

(166) Gloth, F. M.; Gundberg, C. M.; Hollis, B. W.; Haddad, J. G.; Tobin, J. D. Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *Jama* **1995**, *274*, 1683-1686.

(167) Sander, C. S.; Chang, H.; Salzman, S.; Müller, C. S.; Ekanayake-Mudiyanselage, S.; Elsner, P.; Thiele, J. J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **2002**, *118*, 618-625.

(168) Thiele, J. J.; Traber, M. G.; Packer, L. Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *Journal of investigative dermatology* **1998**, *110*, 756-761.

(169) Kondo, S. The roles of cytokines in photoaging. *Journal of dermatological science* **2000**, *23*, S30-S36.

(170) Rittié, L.; Fisher, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2015**, *5*, a015370.

(171) Varani, J.; Dame, M. K.; Rittié, L.; Fligel, S. E.; Kang, S.; Fisher, G. J.; Voorhees, J. J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *The American journal of pathology* **2006**, *168*, 1861-1868.

(172) Boisnic, S.; Branchet, M. C. Vieillessement cutané chronologique. *EMC - Dermatologie-Cosmétologie* **2005**, *2*, 232-241.

(173) Suh, D.; Kwon, H. What's new in the physiopathology of acne? *British Journal of Dermatology* **2015**, *172*, 13-19.

(174) Dréno, B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2017**, *31*, 8-12.

(175) Dréno, B.; Dagnelie, M. A.; Khammari, A.; Corvec, S. The skin microbiome: a new actor in inflammatory acne. *American journal of clinical dermatology* **2020**, 1-7.

- (176) Pappas, A.; Johnsen, S.; Liu, J. C.; Eisinger, M. Sebum analysis of individuals with and without acne. *Dermato-endocrinology* **2009**, *1*, 157-161.
- (177) Thiboutot, D.; Del Rosso, J. Q. Acne vulgaris and the epidermal barrier: is acne vulgaris associated with inherent epidermal abnormalities that cause impairment of barrier functions? Do any topical acne therapies alter the structural and/or functional integrity of the epidermal barrier? *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* **2013**, *6*, 18.
- (178) Lynn, D. D.; Umari, T.; Dunnick, C. A.; Dellavalle, R. P. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. *Adolescent health, medicine and therapeutics* **2016**, *7*, 13.
- (179) Deng, Y.; Wang, H.; Zhou, J.; Mou, Y.; Wang, G.; Xiong, X. Patients with acne vulgaris have a distinct gut microbiota in comparison with healthy controls. *Acta dermato-venereologica* **2018**, *98*, 783-790.
- (180) Cordain, L. In *Tilte2005*; WB Saunders.
- (181) Jung, J. Y.; Kwon, H. H.; Hong, J. S.; Yoon, J. Y.; Park, M. S.; Jang, M. Y.; Suh, D. H. Effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acid and gamma-linolenic acid on acne vulgaris: a randomised, double-blind, controlled trial. *Acta dermato-venereologica* **2014**, *94*, 521-526.
- (182) Dreno, B.; Bettoli, V.; Araviiskaia, E.; Sanchez Viera, M.; Bouloc, A. The influence of exposome on acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2018**, *32*, 812-819.
- (183) Dréno, B.; Shourick, J.; Kérob, D.; Bouloc, A.; Taieb, C. The role of exposome in acne: results from an international patient survey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2020**, *34*, 1057-1064.
- (184) Yan, H. M.; Zhao, H. J.; Guo, D. Y.; Zhu, P. Q.; Zhang, C. L.; Jiang, W. Gut microbiota alterations in moderate to severe acne vulgaris patients. *The Journal of dermatology* **2018**, *45*, 1166-1171.
- (185) Clark, A. K.; Haas, K. N.; Sivamani, R. K. Edible plants and their influence on the gut microbiome and acne. *International journal of molecular sciences* **2017**, *18*, 1070.
- (186) Taylor, M.; Gonzalez, M.; Porter, R. Pathways to inflammation: acne pathophysiology. *European Journal of Dermatology* **2011**, *21*, 323-333.
- (187) Dréno, B. Données récentes sur l'épidémiologie de l'acné. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* **2010**, *137*, S49-S51.
- (188) AYRES JR, S.; MIHAN, R. Acne vulgaris and lipid peroxidation: new concepts in pathogenesis and treatment. *International journal of dermatology* **1978**, *17*, 305-307.
- (189) Ottaviani, M.; Camera, E.; Picardo, M. Lipid mediators in acne. *Mediators of inflammation* **2010**, *2010*.
- (190) Clayton, R. W.; Gobel, K.; Niessen, C. M.; Paus, R.; van Steensel, M. A. M.; Lim, X. Homeostasis of the sebaceous gland and mechanisms of acne pathogenesis. *The British journal of dermatology* **2019**, *181*, 677-690.
- (191) Thielitz, A.; Reinhold, D.; Vetter, R.; Bank, U.; Helmuth, M.; Hartig, R.; Wrenger, S.; Wiswedel, I.; Lendeckel, U.; Kähne, T. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N target major pathogenetic steps in acne initiation. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127*, 1042-1051.
- (192) Li, X.; He, C.; Chen, Z.; Zhou, C.; Gan, Y.; Jia, Y. A review of the role of sebum in the mechanism of acne pathogenesis. *Journal of cosmetic dermatology* **2017**, *16*, 168-173.

- (193) Chen, F.; Hu, X.; Dong, K. Consistency changes of potential lipid markers in acne patients of different ages and their role in acne pathogenesis. *Journal of cosmetic dermatology* **2021**.
- (194) OHSAWA, K.; WATANABE, T.; MATSUKAWA, R.; YOSHIMURA, Y.; IMAEDA, K. The possible role of squalene and its peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage caused by UV irradiation. *The Journal of toxicological sciences* **1984**, *9*, 151-159.
- (195) Motoyoshi, K. Enhanced comedo formation in rabbit ear skin by squalene and oleic acid peroxides. *British Journal of Dermatology* **1983**, *109*, 191-198.
- (196) Chiba, K.; Yoshizawa, K.; Makino, I.; Kawakami, K.; Onoue, M. Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *The Journal of toxicological sciences* **2000**, *25*, 77-83.
- (197) Shimizu, N.; Ito, J.; Kato, S.; Otoki, Y.; Goto, M.; Eitsuka, T.; Miyazawa, T.; Nakagawa, K. Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers. *Scientific reports* **2018**, *8*, 9116.
- (198) Alestas, T.; Ganceviciene, R.; Fimmel, S.; Müller-Decker, K.; Zouboulis, C. C. Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B 4 and prostaglandin E 2 are active in sebaceous glands. *Journal of molecular medicine* **2006**, *84*, 75-87.
- (199) Nakagawa, K.; Shibata, A.; Maruko, T.; Sookwong, P.; Tsuduki, T.; Kawakami, K.; Nishida, H.; Miyazawa, T. γ -Tocotrienol reduces squalene hydroperoxide-induced inflammatory responses in HaCaT keratinocytes. *Lipids* **2010**, *45*, 833-841.
- (200) Zouboulis, C. C.; Picardo, M.; Ju, Q.; Kurokawa, I.; Torocsik, D.; Biro, T.; Schneider, M. R. Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **2016**, *17*, 319-334.
- (201) Camera, E.; Ludovici, M.; Tortorella, S.; Sinagra, J. L.; Capitanio, B.; Goracci, L.; Picardo, M. Use of lipidomics to investigate sebum dysfunction in juvenile acne. *Journal of lipid research* **2016**, *57*, 1051-1058.
- (202) Zhou, M.; Gan, Y.; He, C.; Chen, Z.; Jia, Y. Lipidomics reveals skin surface lipid abnormality in acne in young men. *The British journal of dermatology* **2018**, *179*, 732-740.
- (203) Ottaviani, M.; Alestas, T.; Flori, E.; Mastrofrancesco, A.; Zouboulis, C. C.; Picardo, M. Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* **2006**, *126*, 2430-2437.
- (204) Ge, L.; Gordon, J. S.; Hsuan, C.; Stenn, K.; Prouty, S. M. Identification of the Δ -6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. *Journal of Investigative Dermatology* **2003**, *120*, 707-714.
- (205) Downing, D. T.; Stewart, M. E.; Wertz, P. W.; Strauss, J. S. Essential fatty acids and acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1986**, *14*, 221-225.
- (206) Cunliffe, W. J.; Holland, D. B.; Jeremy, A. Comedone formation: etiology, clinical presentation, and treatment. *Clinics in dermatology* **2004**, *22*, 367-374.
- (207) Drake, D. R.; Brogden, K. A.; Dawson, D. V.; Wertz, P. W. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of lipid research* **2008**, *49*, 4-11.
- (208) Zhou, M.; Yang, M.; Zheng, Y.; Dong, K.; Song, L.; He, C.; Liu, W.; Wang, Y.; Jia,

- Y. Skin surface lipidomics revealed the correlation between lipidomic profile and grade in adolescent acne. *Journal of cosmetic dermatology* **2020**, *19*, 3349-3356.
- (209) Zouboulis, C. C.; Jourdan, E.; Picardo, M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2014**, *28*, 527-532.
- (210) Tsujita, T.; Sumiyoshi, M.; Okuda, H. Wax ester-synthesizing activity of lipases. *Lipids* **1999**, *34*, 1159-1166.
- (211) Novotný, J.; Janůšová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin pharmacology and physiology* **2009**, *22*, 22-30.
- (212) Bouwstra, J.; Dubbelaar, F.; Gooris, G.; Weerheim, A.; Ponc, M. The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1999**, *1419*, 127-136.
- (213) Pelle, E.; McCarthy, J.; Seltmann, H.; Huang, X.; Mammone, T.; Zouboulis, C. C.; Maes, D. Identification of histamine receptors and reduction of squalene levels by an antihistamine in sebocytes. *Journal of investigative dermatology* **2008**, *128*, 1280-1285.
- (214) Krämer, C.; Seltmann, H.; Seifert, M.; Tilgen, W.; Zouboulis, C. C.; Reichrath, J. Characterization of the vitamin D endocrine system in human sebocytes in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2009**, *113*, 9-16.
- (215) Farrar, M. D.; Ingham, E. Acne: inflammation. *Clinics in dermatology* **2004**, *22*, 380-384.
- (216) Grice, E. A.; Kong, H. H.; Conlan, S.; Deming, C. B.; Davis, J.; Young, A. C.; Bouffard, G. G.; Blakesley, R. W.; Murray, P. R.; Green, E. D. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **2009**, *324*, 1190-1192.
- (217) Rosenthal, M.; Goldberg, D.; Aiello, A.; Larson, E.; Foxman, B. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infection, Genetics and Evolution* **2011**, *11*, 839-848.
- (218) Christensen, G. J. M.; Brüggemann, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial microbes* **2014**, *5*, 201-215.
- (219) Szabó, K.; Erdei, L.; Bolla, B. S.; Tax, G.; Bíró, T.; Kemény, L. Factors shaping the composition of the cutaneous microbiota. *British Journal of Dermatology* **2017**, *176*, 344-351.
- (220) Sanchez, D. A.; Nosanchuk, J. D.; Friedman, A. J. The skin microbiome: is there a role in the pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis? *Journal of drugs in dermatology: JDD* **2015**, *14*, 127-130.
- (221) Fitz-Gibbon, S.; Tomida, S.; Chiu, B. H.; Nguyen, L.; Du, C.; Liu, M.; Elashoff, D.; Erfe, M. C.; Loncaric, A.; Kim, J.; Modlin, R. L.; Miller, J. F.; Sodergren, E.; Craft, N.; Weinstock, G. M.; Li, H. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *The Journal of investigative dermatology* **2013**, *133*, 2152-2160.
- (222) Grice, E. A.; Segre, J. A. The skin microbiome. *Nature reviews microbiology* **2011**, *9*, 244-253.
- (223) Lee, Y. B.; Byun, E. J.; Kim, H. S. Potential Role of the Microbiome in Acne: A Comprehensive Review. *Journal of clinical medicine* **2019**, *8*.
- (224) Ramasamy, S.; Barnard, E.; Dawson, T. L., Jr.; Li, H. The role of the skin

- microbiota in acne pathophysiology. *The British journal of dermatology* **2019**, *181*, 691-699.
- (225) Scholz, C. F.; Kilian, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2016**, *66*, 4422-4432.
- (226) Dessinioti, C.; Katsambas, A. *Propionibacterium acnes* and antimicrobial resistance in acne. *Clinics in dermatology* **2017**, *35*, 163-167.
- (227) Miura, Y.; Ishige, I.; Soejima, N.; Suzuki, Y.; Uchida, K.; Kawana, S.; Eishi, Y. Quantitative PCR of *Propionibacterium acnes* DNA in samples aspirated from sebaceous follicles on the normal skin of subjects with or without acne. *Journal of medical and dental sciences* **2010**, *57*, 65-74.
- (228) Omer, H.; McDowell, A.; Alexeyev, O. A. Understanding the role of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris: The critical importance of skin sampling methodologies. *Clinics in dermatology* **2017**, *35*, 118-129.
- (229) Pécastaings, S.; Roques, C.; Nocera, T.; Peraud, C.; Mengeaud, V.; Khammari, A.; Dréno, B. Characterisation of *Cutibacterium acnes* phylotypes in acne and in vivo exploratory evaluation of Myrtacine®. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2018**, *32*, 15-23.
- (230) Barnard, E.; Shi, B.; Kang, D.; Craft, N.; Li, H. The balance of metagenomic elements shapes the skin microbiome in acne and health. *Scientific reports* **2016**, *6*, 1-12.
- (231) Dagnelie, M. A.; Montassier, E.; Khammari, A.; Mounier, C.; Corvec, S.; Dréno, B. Inflammatory skin is associated with changes in the skin microbiota composition on the back of severe acne patients. *Experimental dermatology* **2019**, *28*, 961-967.
- (232) Saint-Jean, M.; Corvec, S.; Nguyen, J.-M.; Le Moigne, M.; Boisrobert, A.; Khammari, A.; Dréno, B. Adult acne in women is not associated with a specific type of *Cutibacterium acnes*. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2019**, *81*, 851-852.
- (233) Paugam, C.; Corvec, S.; Saint-Jean, M.; Le Moigne, M.; Khammari, A.; Boisrobert, A.; Nguyen, J.; Gaultier, A.; Dréno, B. *Propionibacterium acnes* phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2017**, *31*, e398-e399.
- (234) Dagnelie, M. A.; Corvec, S.; Saint-Jean, M.; Nguyen, J. M.; Khammari, A.; Dréno, B. *Cutibacterium acnes* phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammatory process. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2019**, *33*, 2340-2348.
- (235) Tomida, S.; Nguyen, L.; Chiu, B.-H.; Liu, J.; Sodergren, E.; Weinstock, G. M.; Li, H. Pan-genome and comparative genome analyses of *propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *mbio* **2013**, *4*.
- (236) Johnson, T.; Kang, D.; Barnard, E.; Li, H. Strain-level differences in porphyrin production and regulation in *Propionibacterium acnes* elucidate disease associations. *Msphere* **2016**, *1*.
- (237) Borrel, V.; Gannesen, A. V.; Barreau, M.; Gaviard, C.; Duclairoir-Poc, C.; Hardouin, J.; Konto-Ghiorgi, Y.; Lefeuvre, L.; Feuilloley, M. G. Adaptation of acneic and non acneic strains of *Cutibacterium acnes* to sebum-like environment. *Microbiologyopen* **2019**, *8*, e00841.

- (238) Christensen, G. J.; Scholz, C. F.; Enghild, J.; Rohde, H.; Kilian, M.; Thürmer, A.; Brzuszkiewicz, E.; Lomholt, H. B.; Brüggemann, H. Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis. *BMC genomics* **2016**, *17*, 1-14.
- (239) Dreno, B.; Martin, R.; Moyal, D.; Henley, J. B.; Khammari, A.; Seité, S. Skin microbiome and acne vulgaris: *Staphylococcus*, a new actor in acne. *Experimental dermatology* **2017**, *26*, 798-803.
- (240) Wang, Y.; Kuo, S.; Shu, M.; Yu, J.; Huang, S.; Dai, A.; Two, A.; Gallo, R. L.; Huang, C.-M. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris. *Applied microbiology and biotechnology* **2014**, *98*, 411-424.
- (241) Skabytska, Y.; Biedermann, T. *Staphylococcus epidermidis* sets things right again. *Journal of Investigative Dermatology* **2016**, *136*, 559-560.
- (242) Claudel, J.-P.; Auffret, N.; Leccia, M.-T.; Poli, F.; Corvec, S.; Dréno, B. *Staphylococcus epidermidis*: a potential new player in the physiopathology of acne? *Dermatology* **2019**, *235*, 287-294.
- (243) Higaki, S. Lipase inhibitors for the treatment of acne. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, *22*, 377-384.
- (244) N'Diaye, A.; Mijouin, L.; Hillion, M.; Diaz, S.; Konto-Ghiorghi, Y.; Percoco, G.; Chevalier, S.; Lefeuvre, L.; Harmer, N. J.; Lesouhaitier, O. Effect of substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: implication for skin homeostasis. *Frontiers in microbiology* **2016**, *7*, 506.
- (245) Wang, Z.; Choi, J. E.; Wu, C. C.; Di Nardo, A. Skin commensal bacteria *Staphylococcus epidermidis* promote survival of melanocytes bearing UVB-induced DNA damage, while bacteria *Propionibacterium acnes* inhibit survival of melanocytes by increasing apoptosis. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **2018**, *34*, 405-414.
- (246) Dreno, B.; Poli, F.; Pawin, H.; Beylot, C.; Faure, M.; Chivot, M.; Auffret, N.; Moyses, D.; Ballanger, F.; Revuz, J. Development and evaluation of a Global Acne Severity Scale (GEA Scale) suitable for France and Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2011**, *25*, 43-48.
- (247) Puccetti, G.; Nguyen, T.; Stroever, C. Skin colorimetric parameters involved in skin age perception. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* **2011**, *17*, 129-134.
- (248) Choi, C. W.; Choi, J. W.; Park, K. C.; Youn, S. W. Ultraviolet-induced red fluorescence of patients with acne reflects regional casual sebum level and acne lesion distribution: qualitative and quantitative analyses of facial fluorescence. *The British journal of dermatology* **2012**, *166*, 59-66.
- (249) Seo, I.; Tseng, S.-H.; Cula, G.; Bargo, P.; Kollias, N. In *Tilte2009*; International Society for Optics and Photonics.
- (250) Berardesca, E.; Loden, M.; Serup, J.; Masson, P.; Rodrigues, L. M. The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin. *Skin Research and Technology* **2018**, *24*, 351-358.
- (251) Pierard, G. E.; Pierard-Franchimont, C.; Marks, R.; Paye, M.; Rogiers, V. EEMCO

- guidance for the in vivo assessment of skin greasiness. The EEMCO Group. *Skin pharmacology and applied skin physiology* **2000**, *13*, 372-389.
- (252) Parra, J.; Paye, M. EEMCO guidance for the in vivo assessment of skin surface pH. *Skin pharmacology and physiology* **2003**, *16*, 188-202.
- (253) Rogiers, V.; Group, E. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin pharmacology and applied skin physiology* **2001**, *14*, 117-128.
- (254) Rodrigues, L. EEMCO Guidance to the in vivo Assessment of Tensile Functional Properties of the Skin. *Skin pharmacology and physiology* **2001**, *14*, 52-67.
- (255) Ohshima, H.; Kinoshita, S.; Oyobikawa, M.; Futagawa, M.; Takiwaki, H.; Ishiko, A.; Kanto, H. Use of Cutometer area parameters in evaluating age-related changes in the skin elasticity of the cheek. *Skin Research and Technology* **2013**, *19*, e238-e242.
- (256) Cutometer® Dual MPA 580. <https://www.courage-khazaka.de/>.
- (257) Qu, D.; Leverett, J.; Freis, O.; Sabadotto, M.; Périé, G.; Mayne, J.; Seehra, G. P.; Scimeca, J.; Luke, B.; Pauly, G. Correlating Age and Quantifying Product Efficacy on Human Skin Using Novel Viscoelastic Parameters. *Proceedings IFSCC* **2007**, 1-6.
- (258) Cai, S.-S.; Syage, J. A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for analysis of fatty acid and acylglycerol lipids. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1110*, 15-26.
- (259) Myher, J.; Kuksis, A.; Pind, S. Molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelins of human erythrocytes: improved method of analysis. *Lipids* **1989**, *24*, 396-407.
- (260) Myher, J.; Kuksis, A.; Yang, L.-Y. Stereospecific analysis of menhaden oil triacylglycerols and resolution of complex polyunsaturated diacylglycerols by gas-liquid chromatography on polar capillary columns. *Biochemistry and Cell Biology* **1990**, *68*, 336-344.
- (261) Godoy Ramos, R. Développement d'outils analytiques pour l'étude du mécanisme d'action de la miltefosine (hexadecylphosphocholine) chez les Leishmanies. Paris 11, 2008.
- (262) Menet, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires* **2011**, *2011*, 41-53.
- (263) Firooz, A.; Rajabi-Estarabadi, A.; Zartab, H.: Measurement of Skin Surface Sebum. In *Agache's Measuring the Skin*; Humbert, P., Maibach, H., Fanian, F., Agache, P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 1-10.
- (264) Cunliffe, W. J.; Burton, J. L.; Shuster, S. The effect of local temperature variations on the sebum excretion rate. *The British journal of dermatology* **1970**, *83*, 650-654.
- (265) Agache, P. 27 Sebaceous Function Assessment. *Measuring the skin* **2004**, 281.
- (266) Blanc, D.; Agache, P. Sebum Excretion. Methods of measurement and influence of physical factors. *International journal of cosmetic science* **1980**, *2*, 243-250.
- (267) Nazzaro-Porro, M.; Passi, S.; Boniforti, L.; Belsito, F. Effects of aging on fatty acids in skin surface lipids. *The Journal of investigative dermatology* **1979**, *73*, 112-117.
- (268) James, A.; Wheatley, V. Studies of sebum. 6. The determination of the component fatty acids of human forearm sebum by gas-liquid chromatography.

Biochemical Journal **1956**, *63*, 269-273.

(269) Nordstrom, K. M.; Labows, J. N.; McGinley, K. J.; Leyden, J. J. Characterization of wax esters, triglycerides, and free fatty acids of follicular casts. *Journal of investigative dermatology* **1986**, *86*, 700-705.

(270) Green, S. C.; Stewart, M. E.; Downing, D. T. Variation in sebum fatty acid composition among adult humans. *The Journal of investigative dermatology* **1984**, *83*, 114-117.

(271) Mark, F.; Murphy, R. C. Electrospray mass spectrometry of human hair wax esters. *Journal of lipid research* **2007**, *48*, 1231-1246.

(272) Yamamoto, A.; Serizawa, S.; Ito, M.; Sato, Y. Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters. *Journal of investigative dermatology* **1987**, *89*, 507-512.

(273) Vrkoslav, V.; Urbanová, K.; Cvačka, J. Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 4184-4194.

(274) Marzouki, Z.; Taha, A.; Goma, K. Fatty acid profiles of sebaceous triglycerides by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1988**, *425*, 11-24.

(275) Smith, R. N.; Braue, A.; Varigos, G. A.; Mann, N. J. The effect of a low glycemic load diet on acne vulgaris and the fatty acid composition of skin surface triglycerides. *Journal of dermatological science* **2008**, *50*, 41-52.

(276) Marzouki, Z.; Taha, A.; Gomma, K. S. Variability in the composition of human skin surface lipids in tropical climates. *Tropical and geographical medicine* **1987**, *39*, 366-371.

(277) Bonté, F.; Pinguet, P.; Chevalier, J. M.; Meybeck, A. Analysis of all stratum corneum lipids by automated multiple development high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1995**, *664*, 311-316.

(278) Robosky, L. C.; Wade, K.; Woolson, D.; Baker, J. D.; Manning, M. L.; Gage, D. A.; Reily, M. D. Quantitative evaluation of sebum lipid components with nuclear magnetic resonance. *Journal of lipid research* **2008**, *49*, 686-692.

(279) Myher, J.; Kuksis, A. General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1995**, *671*, 3-33.

(280) Christie, W. Determination of lipid profiles by gas chromatography. *Lipids Analysis. 3rd edition. WW Christie, editor. The Oily Press, Bridgwater (UK)* **2003**, 118-121.

(281) Rigal, A.; Michael-Jubeli, R.; Bigouret, A.; Nkengne, A.; Bertrand, D.; Baillet-Guffroy, A.; Tfayli, A. Skin surface lipid composition in women: increased 2, 3-oxidosqualene correlates with older age. *European Journal of Dermatology* **2020**, *30*, 103-110.

(282) Aichholz, R.; Lorbeer, E. Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography–chemical ionization mass spectrometry: II: High-temperature gas chromatography–chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2000**, *883*, 75-88.

(283) Jover, E.; Moldovan, Z.; Bayona, J. M. Complete characterisation of lanolin

steryl esters by sub-ambient pressure gas chromatography–mass spectrometry in the electron impact and chemical ionisation modes. *Journal of Chromatography A* **2002**, *970*, 249-258.

(284) Lusby, W. R.; Thompson, M. J.; Kochansky, J. Analysis of sterol esters by capillary gas chromatography-electron impact and chemical ionization-mass spectrometry. *Lipids* **1984**, *19*, 888-901.

(285) Dickel, H.; Scola, N.; Altmeyer, P. The strip patch test–indication in occupational dermatology demonstrated with a case history. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **2009**, *7*, 965-967.

(286) Fernandes, M.; De Mello, J.; Pires, M.; Vizeu, M. Comparative study of patch test using traditional method vs. prior skin abrading. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2007**, *21*, 1351-1359.

(287) Kim, B. E.; Goleva, E.; Kim, P. S.; Norquest, K.; Bronchick, C.; Taylor, P.; Leung, D. Y. Side-by-side comparison of skin biopsies and skin tape stripping highlights abnormal stratum corneum in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* **2019**, *139*, 2387-2389. e2381.

(288) Lademann, J.; Jacobi, U.; Surber, C.; Weigmann, H.-J.; Fluhr, J. The tape stripping procedure–evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *72*, 317-323.

(289) Koppes, S. A.; Brans, R.; Hadzavdic, S. L.; Frings-Dresen, M. H.; Rustemeyer, T.; Kezic, S. Stratum corneum tape stripping: monitoring of inflammatory mediators in atopic dermatitis patients using topical therapy. *International archives of allergy and immunology* **2016**, *170*, 187-193.

(290) Dickel, H.; Goulioumis, A.; Gambichler, T.; Fluhr, J.; Kamphowe, J.; Altmeyer, P.; Kuss, O. Standardized tape stripping: a practical and reproducible protocol to uniformly reduce the stratum corneum. *Skin pharmacology and physiology* **2010**, *23*, 259-265.

(291) Boireau-Adamezyk, E. Spectroscopies vibrationnelles (MCR et ATR-FTIR) et Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution (LC-HR-MS): Outils d'investigation in vivo de l'impact du vieillissement cutané sur le Stratum Corneum aux niveaux tissulaire, supra-moléculaire et moléculaire. Université Paris Sud-Paris XI, 2015.

(292) Ezerskaia, A.; Uzunbajakava, N. E.; Puppels, G. J.; De Sterke, J.; Caspers, P. J.; Urbach, H. P.; Varghese, B. Potential of short-wave infrared spectroscopy for quantitative depth profiling of stratum corneum lipids and water in dermatology. *Biomedical optics express* **2018**, *9*, 2436-2450.

(293) Weerheim, A.; Ponc, M. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of dermatological research* **2001**, *293*, 191-199.

(294) Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *Journal of lipid research* **2008**, *49*, 1466-1476.

(295) Masukawa, Y.; Narita, H.; Sato, H.; Naoe, A.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *Journal of lipid research* **2009**, *50*, 1708-1719.

- (296) Merle, C.; Laugel, C.; Chaminade, P.; Baillet-Guffroy, A. Quantitative study of the stratum corneum lipid classes by normal phase liquid chromatography: comparison between two universal detectors. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2010**, *33*, 629-644.
- (297) Bleton, J.; Gaudin, K.; Chaminade, P.; Goursaud, S.; Baillet, A.; Tchapla, A. Structural analysis of commercial ceramides by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2001**, *917*, 251-260.
- (298) Vietzke, J. P.; Brandt, O.; Abeck, D.; Rapp, C.; Strassner, M.; Schreiner, V.; Hintze, U. Comparative investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* **2001**, *36*, 299-304.
- (299) Martini, M. C. Analyse biochimique des lipides épidermiques. *Pathologie Biologie* **2003**, *51*, 267-270.
- (300) Abreu, S.; Solgadi, A.; Chaminade, P. Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1514*, 54-71.
- (301) Imbert, L.; Gaudin, M.; Libong, D.; Touboul, D.; Abreu, S.; Loiseau, P. M.; Laprévotte, O.; Chaminade, P. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of *Leishmania donovani*. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1242*, 75-83.
- (302) Farwanah, H.; Raith, K.; Neubert, R. H.; Wohlrab, J. Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Archives of dermatological research* **2005**, *296*, 514-521.
- (303) Eliuk, S.; Makarov, A. Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Annual review of analytical chemistry* **2015**, *8*, 61-80.
- (304) Kollias, N.; Stamatias, G. N. In *Tilte2002*; Elsevier.
- (305) Reich, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced drug delivery reviews* **2005**, *57*, 1109-1143.
- (306) Gillies, R.; Zonios, G.; Anderson, R. R.; Kollias, N. Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **2000**, *115*, 704-707.
- (307) Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia* **2000**, *2*, 89-117.
- (308) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. A new type of secondary radiation. *Nature* **1928**, *121*, 501-502.
- (309) McCreery, R. L.: *Raman spectroscopy for chemical analysis*; John Wiley & Sons, 2005; Vol. 225.
- (310) Diagramme énergétique spectroscopie infrarouge, Raman et Rayleigh.
- (311) Pudlas, M.; Koch, S.; Bolwien, C.; Thude, S.; Jenne, N.; Hirth, T.; Walles, H.; Schenke-Layland, K. Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells. *Tissue Engineering Part C: Methods* **2011**, *17*, 1027-1040.
- (312) 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. *The Analyst* **2013**, *138*, 4103-4111.
- (313) Egawa, M.; Hirao, T.; Takahashi, M. In vivo estimation of stratum corneum

thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta dermato-venereologica* **2007**, *87*, 4-8.

(314) Tfayli, A.; Piot, O.; Pitre, F.; Manfait, M. Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. *European Biophysics Journal* **2007**, *36*, 1049-1058.

(315) Wertz, P. Current understanding of skin biology pertinent to skin penetration: skin biochemistry. *Skin pharmacology and physiology* **2013**, *26*, 217-226.

(316) Wertz, P. W.; van den Bergh, B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and physics of lipids* **1998**, *91*, 85-96.

(317) Boncheva, M.: Molecular organization of the lipid matrix in stratum corneum and its relevance for the protective functions of human skin. In *Treatment of Dry Skin Syndrome*; Springer, 2012; pp 125-147.

(318) Potts, R. O.; Francoeur, M. L. Lipid biophysics of water loss through the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*, 3871-3873.

(319) Mojumdar, E.; Kariman, Z.; Van Kerckhove, L.; Gooris, G.; Bouwstra, J. The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2014**, *1838*, 2473-2483.

(320) Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2011**, *1808*, 1529-1537.

(321) 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. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2011**, *399*, 1201-1213.

(322) Tfayli, A.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *397*, 1281-1296.

(323) 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. *The Analyst* **2013**, *138*, 6582-6588.

(324) Vyumvuhore, R. Validation et implémentation des descripteurs de l'hydratation et des propriétés mécaniques du stratum corneum ex vivo et in vivo. 2013.

(325) Vyumvuhore, R.; Tfayli, A.; Biniek, K.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Dauskardt, R.; Baillet-Guffroy, A. The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo. *Journal of biophotonics* **2015**, *8*, 217-225.

(326) Quatela, A.; Tfayli, A.; Baillet-Guffroy, A. Examination of the effect of Stratum Corneum isolation process on the integrity of the barrier function: a confocal Raman spectroscopy study. *Skin Research and Technology* **2016**, *22*, 75-80.

(327) Michael-Jubeli, R. Stratégies analytiques et comparaison chimométrique de mélanges lipidiques complexes : composition, caractérisation et évolutions physiologiques du film hydrolipidique. 2011.

(328) Janssens, M.; van Smeden, J.; Puppels, G.; Lavrijsen, A.; Caspers, P.; Bouwstra, J. Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with

atopic eczema. *British Journal of Dermatology* **2014**, *170*, 1248-1255.

(329) Caussin, J.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. FTIR studies show lipophilic moisturizers to interact with stratum corneum lipids, rendering the more densely packed. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2008**, *1778*, 1517-1524.

(330) Caussin, J.; Gooris, G.; Groenink, H.; Wiechers, J.; Bouwstra, J. Interaction of lipophilic moisturizers on stratum corneum lipid domains in vitro and in vivo. *Skin pharmacology and physiology* **2007**, *20*, 175-186.

(331) Wesley, N. O.; Maibach, H. I. Racial (ethnic) differences in skin properties: the objective data. *American journal of clinical dermatology* **2003**, *4*, 843-860.

(332) Shipman, A. R.; Millington, G. W. Obesity and the skin. *The British journal of dermatology* **2011**, *165*, 743-750.

(333) Mourelatos, K.; Eady, E. A.; Cunliffe, W. J.; Clark, S. M.; Cove, J. H. Temporal changes in sebum excretion and propionibacterial colonization in preadolescent children with and without acne. *The British journal of dermatology* **2007**, *156*, 22-31.

(334) Miller, J. M.: *Chromatography: concepts and contrasts*; John Wiley & Sons, 2005.

(335) SAISIR. http://www.chimiometrie.fr/saisir_webpage.html

(336) Beylot, C.; Auffret, N.; Poli, F.; Claudel, J. P.; Leccia, M. T.; Del Giudice, P.; Dreno, B. Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2014**, *28*, 271-278.

(337) Chang, C.-I.; Heinz, D. C. Constrained subpixel target detection for remotely sensed imagery. *IEEE transactions on geoscience and remote sensing* **2000**, *38*, 1144-1159.

(338) Tfayli, A.; Gobinet, C.; Vrabie, V.; Huez, R.; Manfait, M.; Piot, O. Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies. *Applied spectroscopy* **2009**, *63*, 564-570.

Productions scientifiques

- *ARTICLES SCIENTIFIQUES*

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Bertrand, D., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A. (2020), Skin surface lipid composition in women: increased 2, 3-oxidosqualene correlates with older age, ***European Journal of Dermatology***, 30(2), 103-110.

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., Bigouret, A., & Tfayli, A. (2021), Raman Confocal Microscopy and biophysics multi-parametric characterization of the skin barrier evolution with age, ***Journal of biophotonics***, p. e202100107.

- *COMMUNICATIONS ORALES / PRIX dans congrès nationaux et internationaux*

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Multimodal approach of skin aging study: biometric parameters, *in vivo* Raman spectroscopy descriptors and Stratum Corneum (SC) lipid composition", ***Journées Jean-Paul Marty***, Paris, 2017

⇒ *Obtention d'une bourse de la fédération de Chimie-Physique de Paris-Saclay (CPPS) pour participation au congrès*

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Skin barrier function: impact of the skin "very" aging on stratum corneum lipids organization and water content *in vivo*", ***Congress of International society for biophysics and imaging of the skin (ISBS)***, San Diego, 2018

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Characterization of the barrier function on skin "very" aging using a multi-parametric approach: biometric measurements, *in vivo* Raman spectroscopy, HTGC/MS and LC/HRMS", ***European Barrier Epidermal Research Network (E²BRN)***, Toulouse, 2018

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "An innovative multi-parametric approach to evaluate the "very aging" impact on skin barrier function, using "omic" analytical methods, *in vivo* Raman spectroscopy and biometric measurements", **Journée de l'écode doctorale 2MIB**, Orsay, 2018

⇒ **Prix de la meilleure communication orale**

Nkengne, A., Bigouret, A., Merour, V., Bardout, G., **Rigal, A.**, Michael-Jubeli, R., Tfayli, A., Baillet-Guffroy, A. & Vie, K., "Impact of Deep-Sea diving on the skin surface" analytical methods, *in vivo* Raman spectroscopy and biometric measurements", **Cosmetic Measurement and Testing (COMET)**, Cergy, 2019

- **COMMUNICATIONS AFFICHEES / PRIX dans congrès nationaux et internationaux**
-

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Skin aging: association between biometric measurements and *in vivo* Raman spectroscopy", **Journée de l'école doctorale 2MIB**, Orsay, 2017

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Skin aging: association between biometric measurements and *in vivo* Raman spectroscopy", **Journée de la recherche**, Châtenay-Malabry, 2017

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Multimodal approach of skin aging study: biometric parameters, *in vivo* Raman spectroscopy descriptors and Stratum Corneum (SC) lipid composition", **Journées Jean-Paul Marty**, Paris, 2017

⇒ **Obtention d'une bourse de la fédération de Chimie-Physique de Paris-Saclay (CPPS) pour participation au congrès**

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Raman, GC/MS and biometric measurements for determination of skin aging biomarkers", ***Journée de la recherche***, Châtenay-Malabry, 2018

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., & Tfayli, A., "Multiparametric and innovative approach to characterize skin aging biomarkers: SSLs composition, Raman descriptors and biometric measurements", ***Cosmetic Measurement and Testing (COMET)***, Cergy, 2019

⇒ ***Prix poster de la meilleure innovation***

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Nkengne, A., Bigouret, A., Merour, V., Bardout, G., Baillet-Guffroy, A., Tfayli, A., & Vie, K., "Impact of Deep-Sea diving on the skin barrier function: focus on SC lipid descriptors", ***ULLA summer school***, Helsinki, 2019

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Bigouret, A., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., Fitoussi, R., & Tfayli, A., "Very skin aging and Skin Surface Lipids composition: increase of the 2,3-oxidosqualene", ***European Society for Dermatological Research (ESDR)***, Bordeaux, 2019

Annexes

ANNEXE 1 - Protocole de prélèvement du sébum

Etude VIEILLISSEMENT & ACNE

Lip(Sys)²

Aline Rigal, Rime Michael-Jubeli, Ali Tfaily, Arlette Baillet-Guffroy

Matériel :

1. Papiers à cigarette (*Dimensions de papier : 7x3,5 cm*),
2. Ciseaux
3. Bécher
4. Tubes en verre avec bouchons 22mL
5. Bande médicale
6. Parafilm[®] M
7. Papier aluminium
8. Congélateur à -20°C
9. Pincettes pour manipuler les papiers,
10. Masque (pour délimiter zone(s) de prélèvement et de mesures)
11. Crayon maquillage yeux (pour délimiter masque) (crayon yeux Clarins)
12. Démaquillant (pour nettoyer les traces de crayon)
13. Bandeau cheveux

Préparation initiale - volontaires :

Ne pas appliquer de produits dermatologiques (*pharmaceutiques et/ou cosmétiques, ni maquillage*) sur le visage, la veille au soir et le matin de l'étude.

Durée de prélèvement : 2h par zone corporelle

Zone de prélèvement : Front

Méthode :

- Couper et jeter la partie collante des papiers à cigarette (1) à l'aide de ciseaux (4 papiers à cigarette par zone de prélèvement), placer les papiers dans un bécher (3) puis le fermer avec du Parafilm[®]M (6) durant le temps de prélèvement,
- Noter le numéro de l'étude, le numéro du volontaire et le type de prélèvement sur le tube en verre (4),
- Positionner le bandeau (13) afin de dégager les cheveux du front de la volontaire
- Marquer la zone médiane du front puis appliquer le masque (10) pour les mesures biométriques,
- Positionner la bande médicale (5) sur la volontaire (avec une zone découpée permettant les mesures biométriques (côté opposé aux prélèvements)),
- Se laver les mains avec précaution avant la manipulation, pour éviter tout dépôt de sébum par le manipulateur, ou porter des gants en nitrile sans latex,
- Poser 1 papiers sur le front (1), en évitant de toucher les cheveux et les sourcils : positionner le papier en partant du repère précédemment marqué sur la zone médiane du front,
- Maintenir le papier durant 30 minutes à l'aide de la bande médicale (5),
- Enlever le papier à l'aide de la pince (9), et le mettre dans le tube en verre (4), fermer le tube avec le bouchon,
- Répéter les étapes 7 et 8, 3 fois, afin de fixer au total 4 papiers (1 papier X 4 fois),
- Entourer le tube au niveau de la fermeture et le bouchon avec du Parafilm[®]M (6),
- Envelopper le tube avec des papiers d'aluminium (7),
- Conserver les tubes dans un congélateur à -20°C (8).

ANNEXE 2 - Protocole de prélèvement du Stratum Corneum

Etude VIEILLISSEMENT, ACNE & UNDER THE POLE

Lip(Sys)²

Aline Rigal, Rime Michael-Jubeli, Ali Tfayli, Arlette Baillet-Guffroy

Matériel (par prélèvement) :

Chaque prélèvement nécessite les éléments suivants :

1. 4 écouvillons
2. 2 flacons contenant les solvants :
 - a. 1 contenant l'éther diéthylique pour nettoyer la zone à prélever
 - b. 1 contenant le mélange Acétate d'éthyle (AE) / méthanol (MeOH) (20/80) pour imbiber les écouvillons avant le prélèvement
3. 1 flacon vide servant à la récolte des tissus d'écouvillons une fois le prélèvement effectué (*Tubes verre avec bouchon, 22mL*)
4. Papier filtre, pour nettoyage à l'aide de l'éther diéthylique
5. Parafilm[®] M
6. Papier aluminium
7. Pince pour manipuler les tissus d'écouvillon
8. Masque pour délimiter la zone de prélèvement (7cmx3cm)
9. Crayon pour marquer la zone délimitée
10. Lunettes de protection
11. Gants sans poudre
12. Congélateur à -20°C
13. Sac pour stockage des prélèvements dans le congélateur

Préparation initiale :

Ne pas appliquer des produits dermatologiques (pharmaceutiques et/ou cosmétiques, ni de maquillage) sur le visage, la veille au soir et le matin de l'étude.

Durée de prélèvement : 5 à 10 minutes par sujet

Zone de prélèvement : Front

Méthode :

- Mettre les gants sans poudre (11)
- Protéger les yeux du sujet à l'aide des lunettes de protection (10)
- Déposer 5mL d'éther diéthylique (2a) sur du papier filtre (4) (l'éther étant très volatile, il s'évapore très rapidement du papier filtre)
- Nettoyer tout le front à l'aide de 2 papiers filtre (4) imbibés d'éther diéthylique : faire 1 passage avec chaque papier filtre
- Positionner le masque (8) sur le front, à l'aide des repères indiqués sur celui-ci puis délimiter la zone de prélèvement à l'aide d'un crayon (9),
Attention : Veiller à ne pas inclure de cheveux et sourcils dans le masque,
- Imbiber légèrement un écouvillon (7) (environ 2mL restant sur l'écouvillon) dans le flacon contenant le mélange AE/MeOH (20/80) (2b), *Un même flacon peut être utilisé pour 4 prélèvements au maximum (4 x 4 écouvillons au total),*
- Passer l'écouvillon (7) 10 fois dans un sens, à l'intérieur de la zone préalablement délimitée à l'aide du masque, en appuyant modérément : *de gauche à droite,*
NB : Il est nécessaire de passer 10 fois l'écouvillon et de veiller à couvrir toute la zone délimitée, même si cela nécessite de passer plusieurs fois sur la même zone,
- Séparer le tissu de l'écouvillon (7) de la tige à l'aide d'une pince (7), et mettre le tissu contenant le prélèvement dans le flacon prévu à cet effet (3),
- Recommencer les étapes 7, 8 et 9, avec à chaque fois un nouvel écouvillon, en effectuant les passages dans les 3 autres directions : *10 passages de droite à gauche, 10 passages de haut en bas , 10 passages de bas en haut*
A la fin de chaque passage, les tissus des écouvillons doivent être regroupés dans le même flacon (3)
- Fermer le tube (3) à l'aide du bouchon puis entourer le tube (3) au niveau de la

- fermeture et le bouchon avec du Parafilm[®] M (5),
- Envelopper le tube avec du papier aluminium (6),
- Conserver les tubes dans un sac dédié (13), au congélateur -20°C (12).

ANNEXE 3 - Photographies des mesures réalisées dans le cadre de l'expédition « Under The Pole »



Photographie du matériel envoyé aux explorateurs afin de réaliser les mesures, accompagné de vidéos et documents explicatifs, notamment pour les prélèvements de *Stratum Corneum* par écouvillonnage :



Photographie effectuées lors de la réalisation des différentes mesures par les explorateurs de l'expédition « Under The Pole » :



Titre : Aspects moléculaires liés aux lipides cutanés : interactions physiologiques et corrélation en états pathologiques (acné)

Mots clés : Lipides cutanés de surface, *Stratum Corneum*, Raman, acné, NP-HPLC/HR-MS, HT-GC/MS.

Résumé : Le film hydrolipidique (FHL) et le *Stratum Corneum* (SC) représentent l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement et contribuent à la fonction primordiale de barrière cutanée. Les lipides constituent un composant essentiel de celle-ci, leurs composition et structure possèdent une importance particulière dans l'état de la peau. En effet, les manifestations cliniques observées au niveau cutané sont liées à des phénomènes moléculaires complexes sous-jacents, ayant lieu dans les différentes couches de la peau et peuvent impacter les lipides du SC et du FHL. L'objectif de ce travail consiste en la mise en place d'une approche analytique multiparamétrique permettant la caractérisation des modifications liées à la barrière cutanée, dans différentes conditions physiopathologiques. Pour cela, des techniques biométriques ont été utilisées telles que la mesure du contenu en eau, la perte insensible en eau (PIE), le pH, les paramètres mécaniques ou encore les paramètres colorimétriques. Des prélèvements de FHL et des lipides de SC ont été effectués afin d'analyser respectivement la composition des lipides cutanés de surface (LCS) par HT-GC/MS et des lipides du SC par NP-HPLC/HR-MS. La microspectroscopie Raman *in vivo* a permis l'obtention d'informations structurales complémentaires, concernant les lipides, les protéines et le contenu en eau au sein du SC. Cette approche a été appliquée à l'étude de trois conditions physiopathologiques : i/ le vieillissement cutané, chez des femmes âgées de plus de 70 ans ; ii/ l'hyperséborrhée et la peau acnéique chez la femme adulte ; iii/ et l'impact des conditions environnementales extrêmes. Les résultats obtenus à partir de ces travaux expérimentaux nous ont permis de mettre en avant de nombreuses modifications cutanées dans les différentes situations : le vieillissement cutané est associé à une diminution de la totalité des lipides cutanés, avec une diminution de l'activité des glandes sébacées, ainsi qu'une diminution de la quantité de lipides au sein du SC.

La modification de composition des LCS, avec une augmentation de l'hydrolyse des triglycérides et une augmentation du 2,3-oxydosqualène suggèrent une modification de l'activité enzymatique. En parallèle, d'importantes modifications structurales au niveau du SC ont lieu, avec une augmentation de son épaisseur, une organisation lipidique plus compacte, ainsi qu'une augmentation de la longueur de chaînes des céramides et de leur estérification, menant à une diminution de la PIE et évoquant ainsi une adaptation dans le sens d'un renforcement de la barrière cutanée. Bien que souvent associées, la peau grasse et l'acné chez la femme adulte représentent deux problématiques indépendantes. Dans le cas de la peau grasse, les modifications ont lieu majoritairement en surface, avec une augmentation de l'activité sébacée et une modification de la composition des LCS, probablement impliquée dans l'augmentation observée de la brillance de la peau. L'acné entraîne l'augmentation de l'activité sébacée, et la modification de la composition des LCS avec notamment l'augmentation de composés possédant une activité comédogène. Ces changements sont associés à des modifications du SC avec une diminution des sous-classes de céramides estérifiés, évoquant une altération de la matrice lipidique. L'étude des modifications cutanées dans des conditions environnementales extrêmes de température et d'humidité, nous a permis de mettre en évidence une adaptation marquée de la peau. Après une altération avec une désorganisation lipidique du SC durant les premiers jours, la peau retrouve son organisation initiale au bout de 56 jours. L'approche multiparamétrique utilisée durant cette thèse a permis d'apporter des informations complémentaires concernant les nombreuses et importantes adaptations ayant lieu au niveau de la barrière cutanée, en mettant en avant certains descripteurs de l'état de la surface cutanée dans différentes conditions physiopathologiques.

Title : Molecular aspects of skin lipids : physiological interactions and correlation with pathological states (acne)

Keywords : Skin surface lipids, *Stratum Corneum*, Raman, acne, NP-HPLC/HR-MS, HT-GC/MS.

Abstract : The hydrolipidic film (HLF) and the *Stratum Corneum* (SC) represent the ultimate barrier between the organism and the environment and thus contribute to the primary function of the skin barrier. Lipids play a primordial role in this barrier, their composition and structure are of particular importance in the condition of the skin and are intimately linked to skin changes. Indeed, the different clinical manifestations that can be observed in the skin are linked to complex underlying molecular phenomena, taking place in the different layers of the skin and can influence the lipids of the SC and/or the HLF. The objective of this work consists in the implementation of a multiparametric analytical approach allowing the characterization of the modifications related to the cutaneous barrier, in particular to the lipids, under various physio-pathological conditions. For this purpose, common biometric techniques were used such as the measurement of water content, trans-epidermal water loss, pH, mechanical parameters, or colorimetric parameters. Samples of HLF and SC were extracted in order to analyze respectively the composition of skin surface lipids by HT-GC/MS and SC lipids by NP-HPLC/HR-MS. In parallel, *in vivo* Raman microspectroscopy was used to obtain additional structural information, notably concerning lipids, proteins, and water content within the SC. This approach was applied to the study of three different physio-pathological conditions: i/ skin aging, more particularly on women over 70 years old; ii/ hyperseborrhea and acneic skin in adult women; iii/ and the impact of extreme environmental conditions. The results obtained from these experimental works have allowed us to highlight numerous skin modifications in the different situations: Skin aging is associated with a decrease in total skin lipids, including a decrease in sebaceous gland activity, including a decrease in sebaceous gland activity,

as well as a decrease in the amount of lipids within the SC. The change in skin surface lipid composition, with an increase in triglyceride hydrolysis and an increase in 2,3-oxydosqualene suggests a change in enzymatic activity. In parallel, important structural changes in the SC take place, with an increase in its thickness, a more compact lipid organization, as well as an increase in the chain length of ceramides and their esterification, leading to a decrease in trans-epidermal water loss and thus evoking an adaptation in the sense of a reinforcement of the skin barrier. Although often associated, oily skin and acne in adult women represent two independent problems. In the case of oily skin, the changes occur mainly on the surface, with an increase in sebaceous activity and a change in the composition of skin surface lipids, probably involved in the observed increase in skin brightness. Acne leads to an increase in sebaceous activity, and a modification of the composition of cutaneous surface lipids with an increase in compounds with comedogenic activity. These changes are associated with modifications of the SC with a decrease in esterified ceramide subclasses, suggesting an alteration of the lipid matrix. The study of skin changes under extreme environmental conditions, particularly temperature and humidity, enabled to highlight a marked adaptation of the skin. Indeed, after a marked impairment with lipids disorganization in the SC during the first days, the skin recovers its initial organization after 56 days. The multiparametric approach used during this thesis allowed to bring additional information concerning the numerous and important adaptations taking place at the level of the cutaneous barrier, by highlighting some descriptors of the state of the cutaneous surface under different physio-pathological conditions.