Méthode de dosage des lipides cutanés par HPTLC

Jeudi 30 juin 2022

Pôle Recherche Appliquée
Service de Pharmacoclinique

C. Jacques-Jamin, L. Jourdes, C. Dejean, H. Duplan, S. Bessou-Touya

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

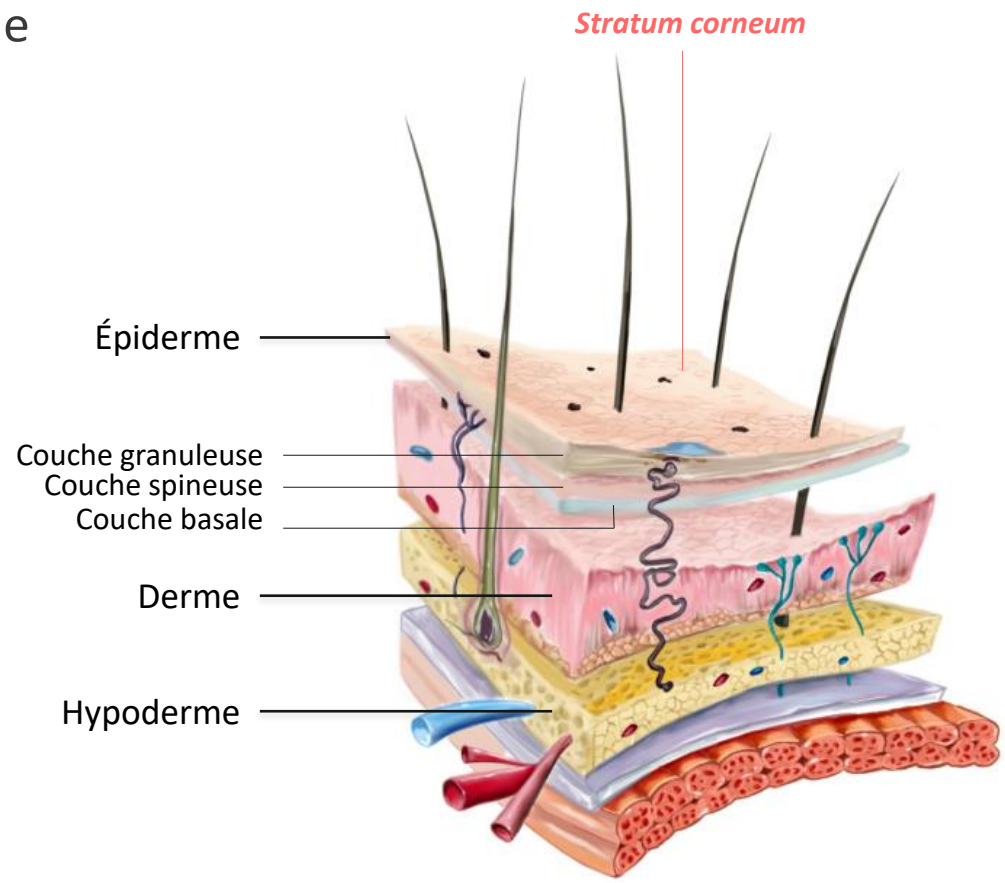
La Peau

- *Rôle majeur :* barrière de protection

- *Structure multi-couches :* hypoderme, derme et épiderme

- *Épiderme :*
  - Couche basale
  - Couche spineuse
  - Couche granuleuse
  - Couche cornée

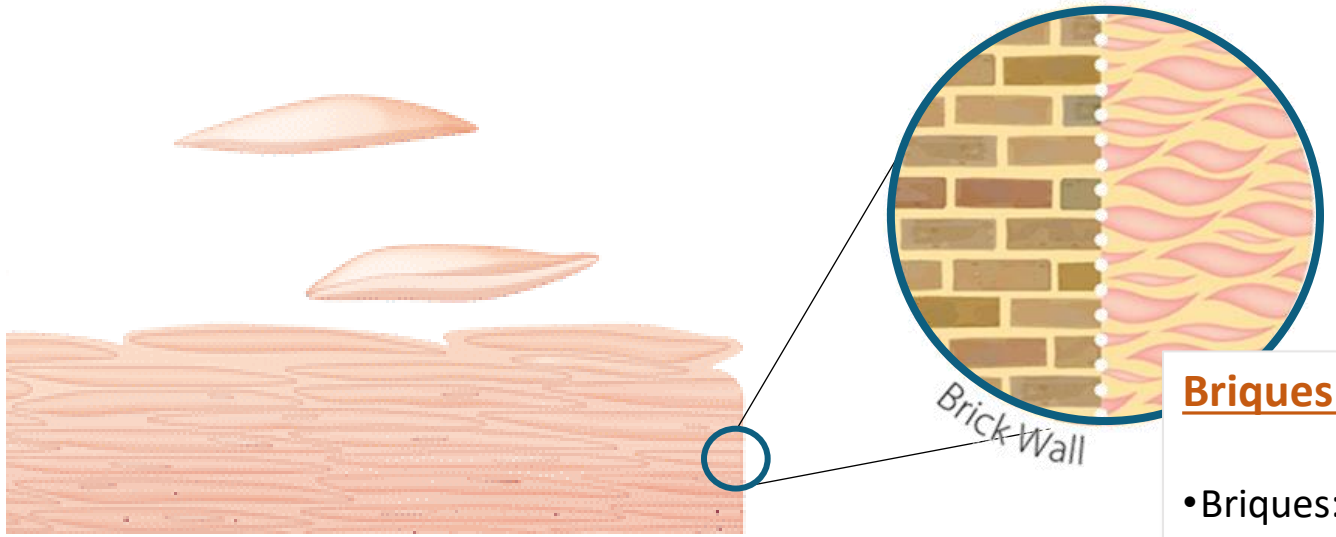
  ↳ ***Stratum Corneum***



Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

V. Thakoersing (2012), A. Laplante (2002)

Le Stratum corneum



Lipides cutanés :

- Acide gras : 10 - 12%
- Cholestérol : 20 - 27%
- Céramides : 40 - 50%

Briques et Mortier

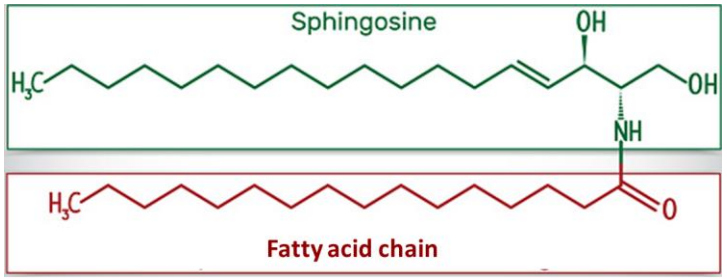
- Briques: kératinocytes
- Mortier: ciment lipidique
  - Produit par les kératinocytes
  - Excreté par les glandes sébaccées

Rôle de barrière contre la déshydratation et les agressions externes

M.R. Prausnitz *et al.* (2012), N.A. Monteiro-Riviere *et al.* (2001)

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Les Céramides

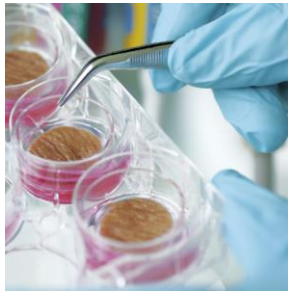


Sphingoid base moiety \ Fatty acid moiety	Non-hydroxyl fatty acid [N]	α-hydroxyl fatty acid [A]	Esterified ω-hydroxyl fatty acid [EO]
Sphingosine [S]	[NS], Cer 2 7.4%	[AS], Cer 5 9.6%	[EOS], Cer 1 6.5%
Dihydrosphingosine (sphinganine) [dS]	[NdS], Cer 10 9.8%	[AdS], Cer 11 1.6%	[EOdS] 0.4%
Phytosphingosine [P]	[NP], Cer 3 22.1%	[AP], Cer 6 8.8%	[EOP], Cer 9 1.1%
6-hydroxy-sphingosine [H]	[NH], Cer 8 14.5%	[AH], Cer 7 10.8%	[EOH], Cer 4 4.3%

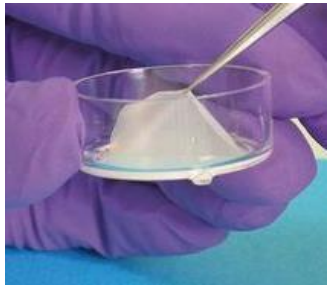
Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Modèles tissulaires utilisés

Explants de peau humaine



Modèles de peau reconstruite



❖ Extraction des lipides cutanés

- *Isolation du stratum corneum* : via l'action de la trypsine
- *Extraction des lipides cutanés :* extraction solide-liquide

  → broyage au Potter-Elvehjem

  → 2 solvants : chloroforme / méthanol

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

HPTLC

Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4)

Automated Multiple Development 2 (AMD2)

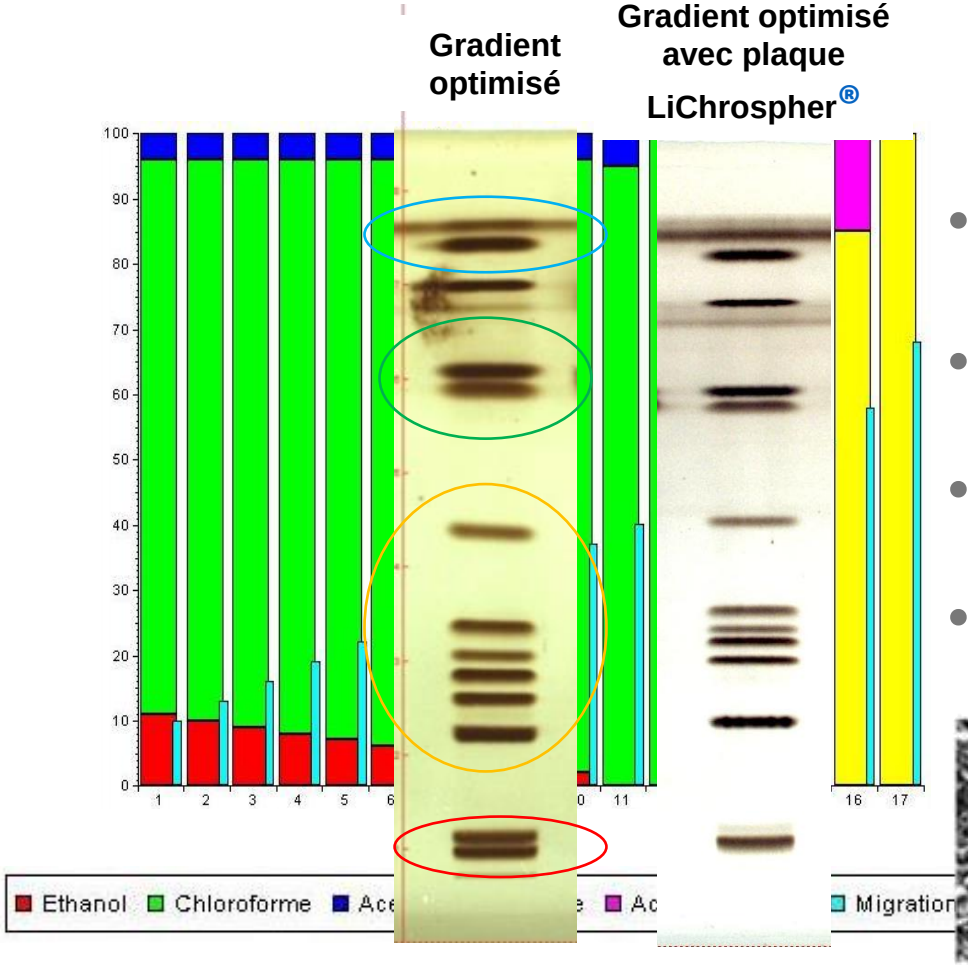
Chromatogram Immersion Device III

TLC Plate Heater

TLC Scanner

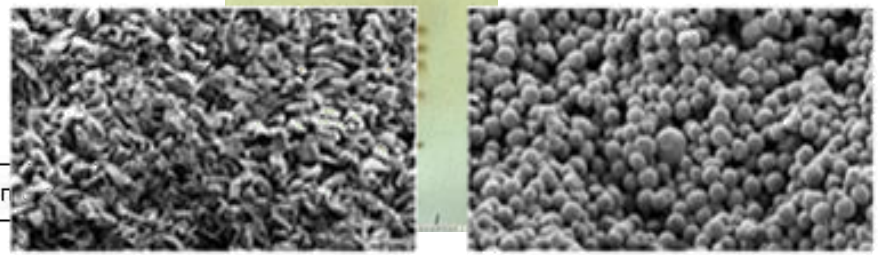
TLC-MS Interface

Methode HPTLC/UV



Optimisation du gradient :

- ↗ de la polarité en début de gradient
- ↗ des distances de migration
- Essai d'ajout d'acide
- Changement de la phase stationnaire:

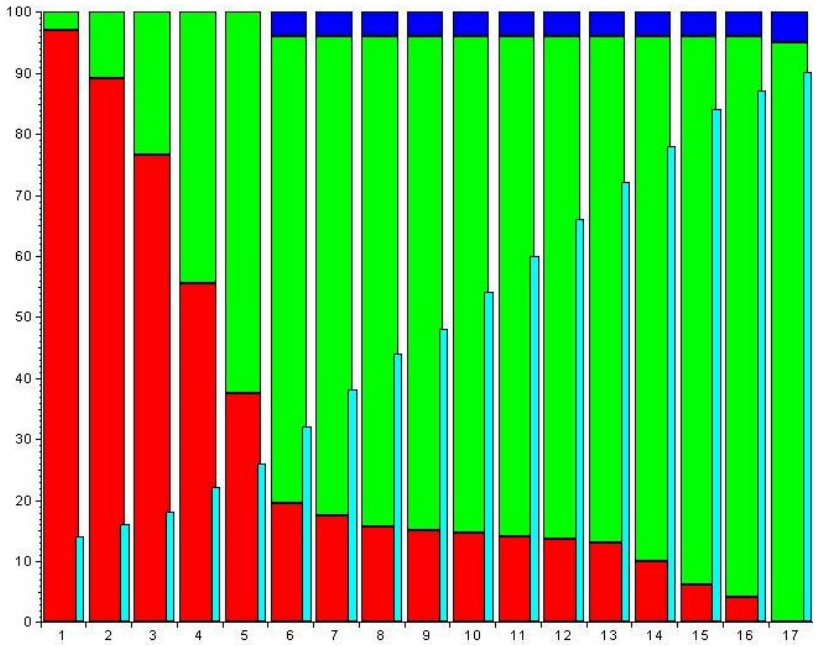


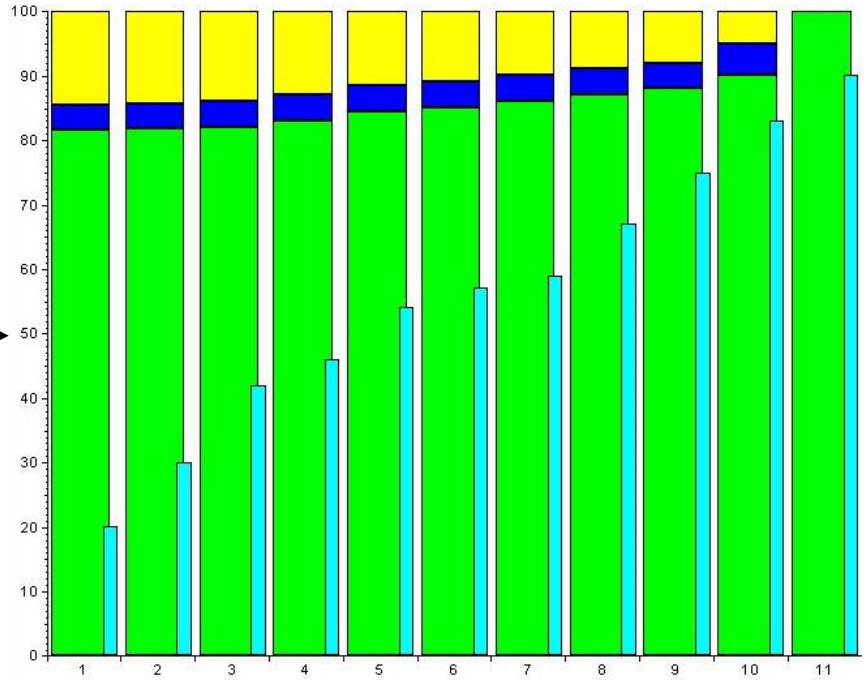
Plaque HPTLC Silice gel → Plaque HPTLC LiChrospher®

Farwanah *et al* (2002)

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

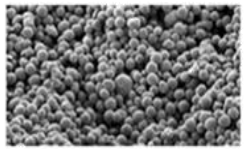
❖ Optimisation de la séparation des céramides :





Durée: **3h33** → Durée : **2h31**

Système HPTLC/UV



Plaque Lichrospher®

Automated TLC Sampler 4

Automated Multiple Development 2

Chromatogram Immersion Device III

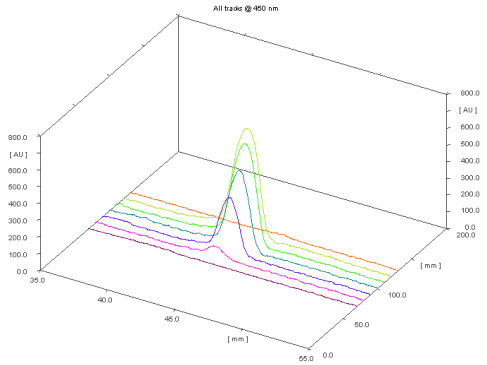
TLC Plate Heater

TLC Visualizer

+

TLC Scanner

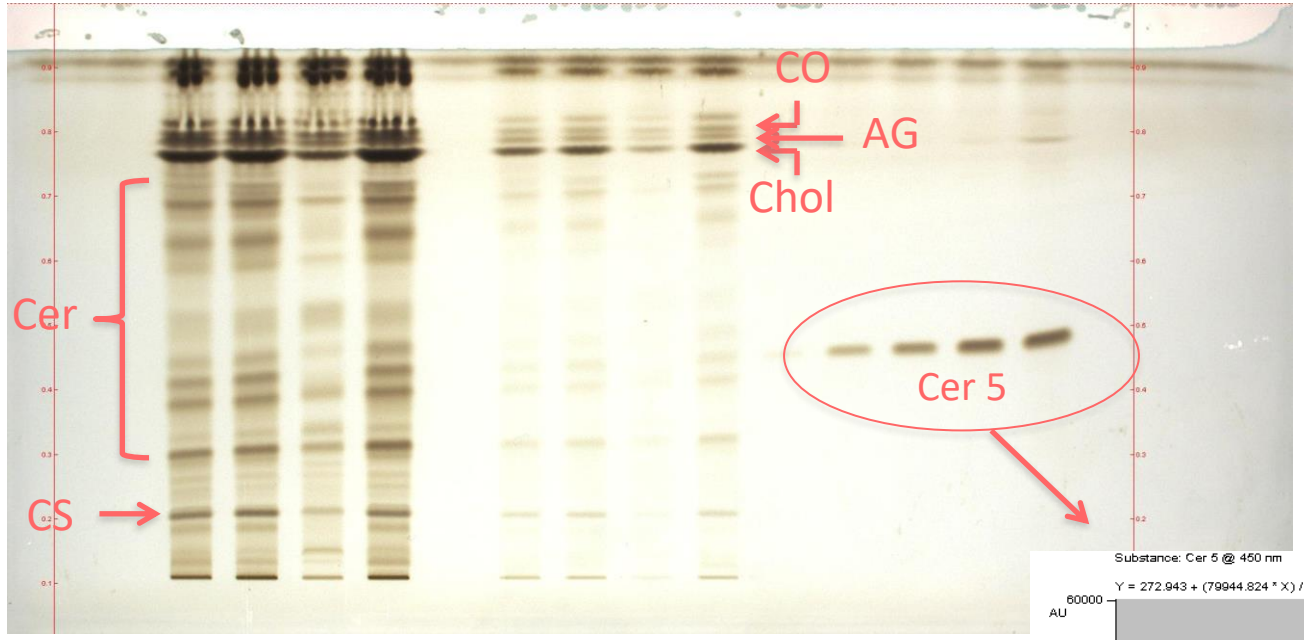
Plaque	Dépôt	Gradient	Dérivatisation	Chauffage	Détection
	Bandes de 6mm	- 11 étapes - 20 à 90 mm - 3 solvants : Chloroforme + Acétone + Méthanol/Eau/Acide acétique (97/3/1)	CuSO4	20 min à 150 ° C	Qualitative Quantitative : λ=540nm

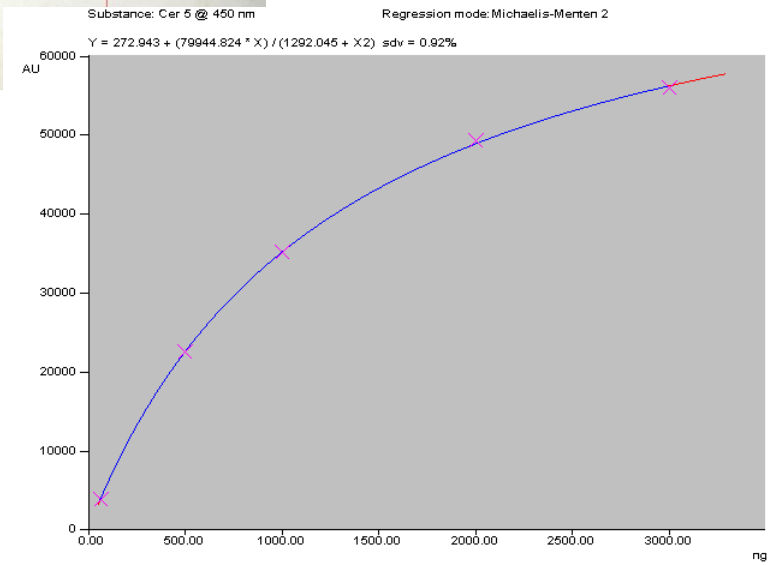


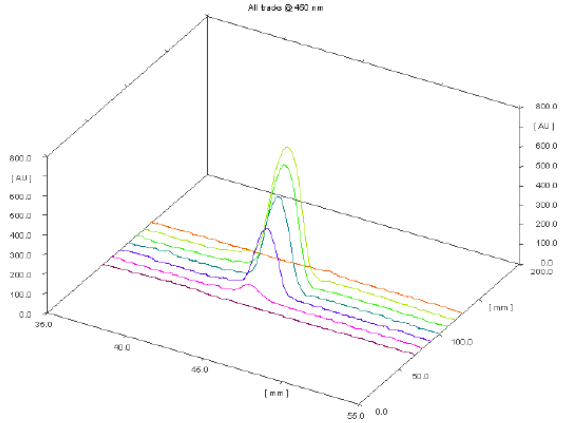
Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Qualification de méthode

❖ HPTLC/UV







LOD = 20 ng/bande

LOQ = 60 ng/bande

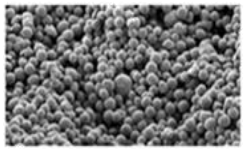
Répétabilité : CV_{moyen} = 3,7%

Reproductibilité : CV_{moyen} = 3,2%

< 15%

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Système HPTLC/MS



Plaque Lichrospher®

Automated TLC Sampler 4

Automated Multiple Development 2

Chromatogram Immersion Device III

TLC Plate Heater

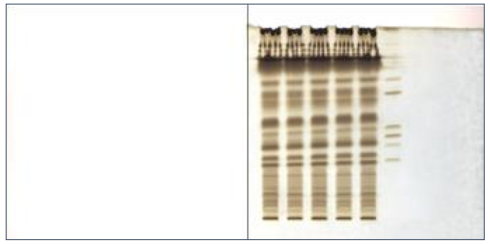
TLC-MS Interface

+

TSQ Quantum Discovery MAX

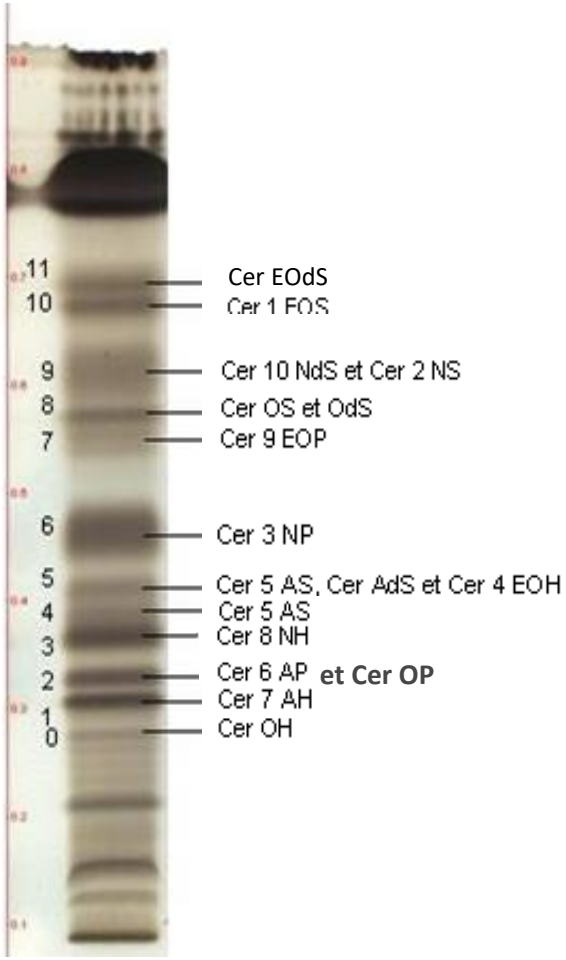
Plaque	Dépôt	Gradient	Dérivatisation	Chauffage	Détection
Phase normale	Bandes de 6mm	Adaptation	Aucune ou CuSO4	20 min à 150 ° C	

Mode	ESI / Négatif
Full Scan	150 à 1500 m/z
MS²	25 et 35 kV



Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Identification par HPTLC/MS

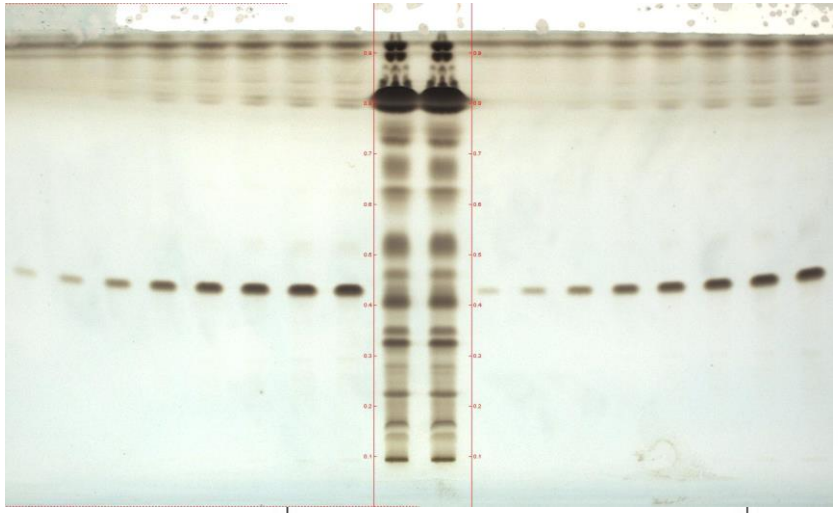


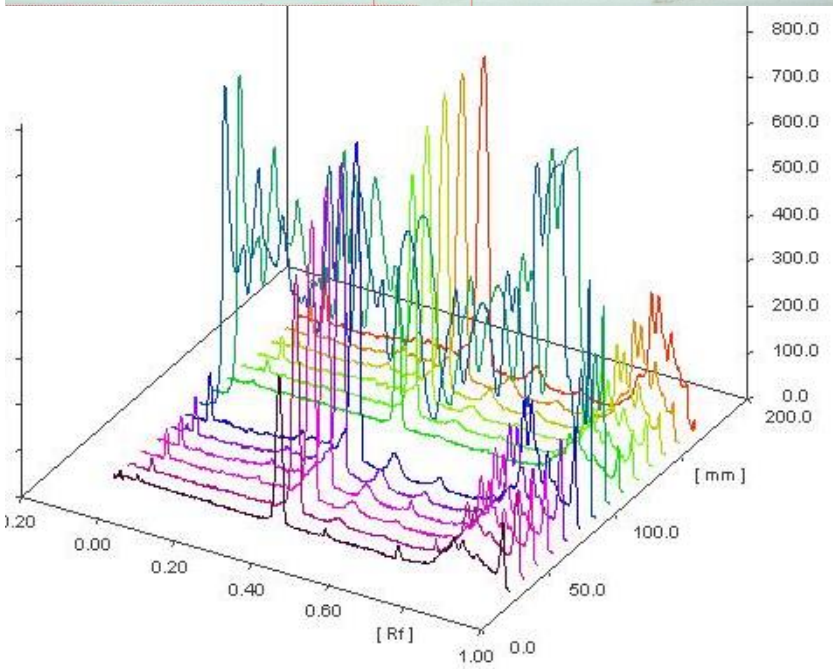
Bande sur plaque HPTLC	Céramide	Désignation	Longueur de chaîne
Bande 0	Cer OH	ω-hydroxyacyl-6-hydroxysphingosine	C_{12} à C_{32} sauf C_{13} et C_{14}
Bande 1	Cer 7 AH	α-OH-acyl-6-OH-sphingosine	C_{19} à C_{31} sauf C_{26}
Bande 2	Cer 6 AP	α-OH-acyl-phytosphingosine	C_{16} à C_{29} sauf C_{23}
	Cer OP	ω-hydroxyacyl- phytosphingosine	-
Bande 3	Cer 8 NH	Non-hydroxy-acyl-6-OH-sphingosine	C_{18} à C_{29} sauf C_{20}
Bande 4	Cer 5 AS	α-OH-acyl-sphingosine	C_{24} à C_{29} sauf C_{26} et C_{28}
Bande 5	Cer 5 AS	α-OH-acyl-sphingosine	C_{24} à C_{29} sauf C_{26} et C_{28}
	Cer AdS	α-OH-acyl-dihydrosphingosine	C_{21} à C_{28}
	Cer 4 EOH	Ester-ω-hydroxyacyl- OH-sphingosine	-
Bande 6	Cer 3 NP	Non-hydroxy-acyl-phytosphingosine	C_{15} à C_{28}
Bande 7	Cer 9 EOP	Ester-ω-hydroxyacyl-phytosphingosine	C_{29} à C_{39}
Bande 8	Cer OS	ω-hydroxyacyl-sphingosine	C_{21} à C_{32} sauf C_{28} et C_{31}
	Cer OdS	ω-hydroxyacyl-dihydrosphingosine	C_{15} à C_{34}
Bande 9	Cer 2 NS	Non-hydroxy-acyl-sphingosine	C_{23} à C_{32} sauf C_{24}
	Cer NdS	Non-hydroxy-dihydrosphingosine	C_{23} à C_{31}
Bande 10	Cer 1 EOS	Ester-ω-hydroxyacyl-sphingosine	C_{28} à C_{36}

Jamin et al, 2019 European Journal of Mass spectrometry. Identification of lipids of the stratum corneum by high performance thin layer chromatography and mass spectrometry

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Quantification de méthode

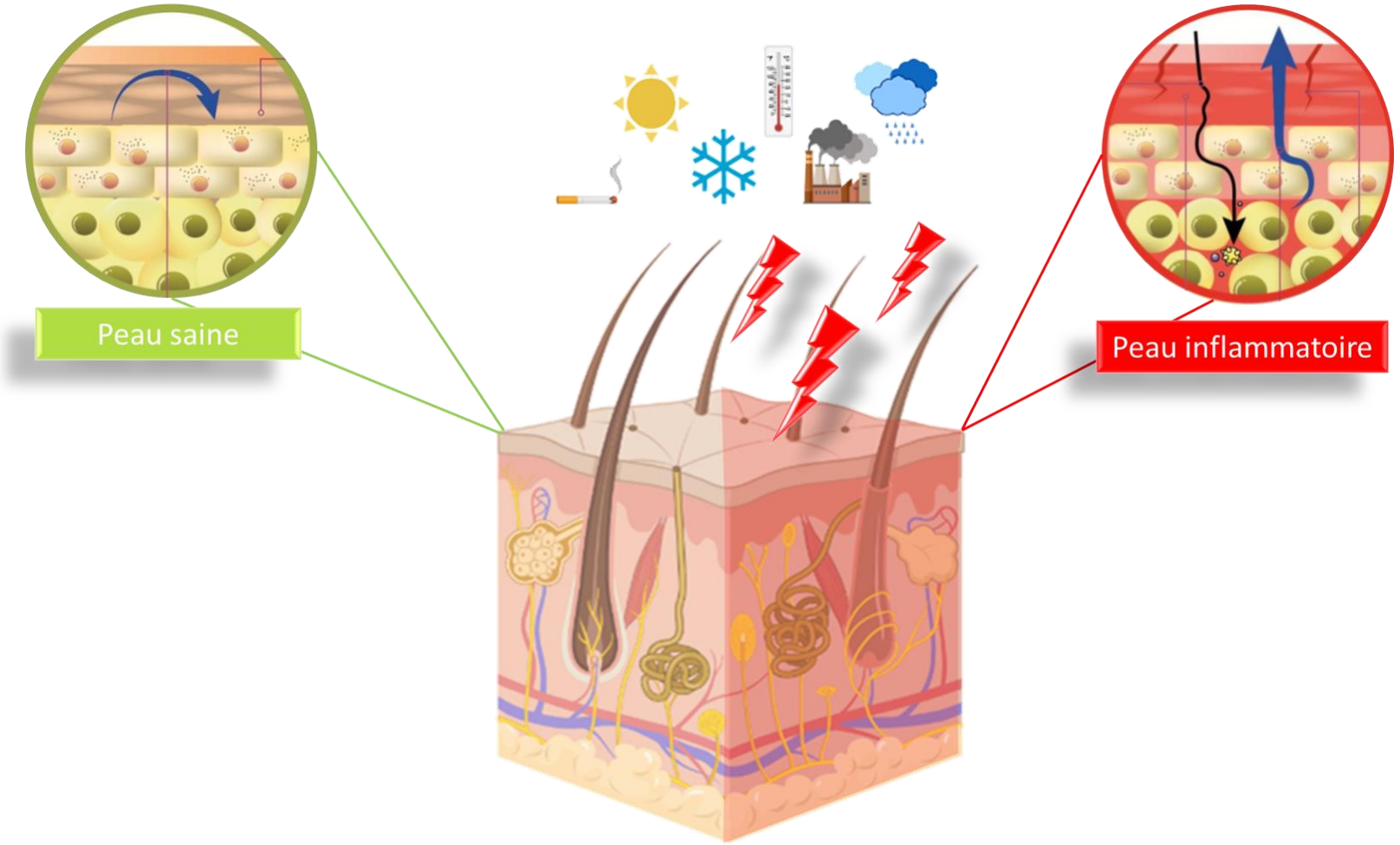




Nom du céramide	Quantité retrouvée (ng)	Pourcentage par rapport à la masse SC
Cer OH	593.67	0.119 %
Cer 7 AH	492.66	0.099 %
Cer 6 AP	< LOD	< 0.003%
Cer 8 NH	1081.61	0.216 %
Cer AdS	218.91	0.044 %
Cer 5 AS	< LOD	< 0.003%
Cer 3 NP	1247.31	0.250 %
Cer 9 EOP	< LOD	< 0.003%
Cer OS et Ods	386.27	0.077 %
Cer 2 NS et Nds	676.28	0.135 %
Cer 1 EOS	< LOD	< 0.003 %
Cer EOdS	578.71	0.116 %
Total	**5275.42**	**0.528 %**

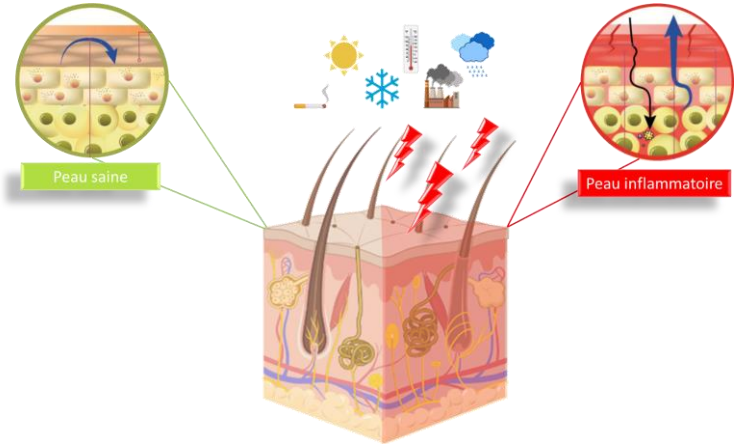
Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Application de la méthode

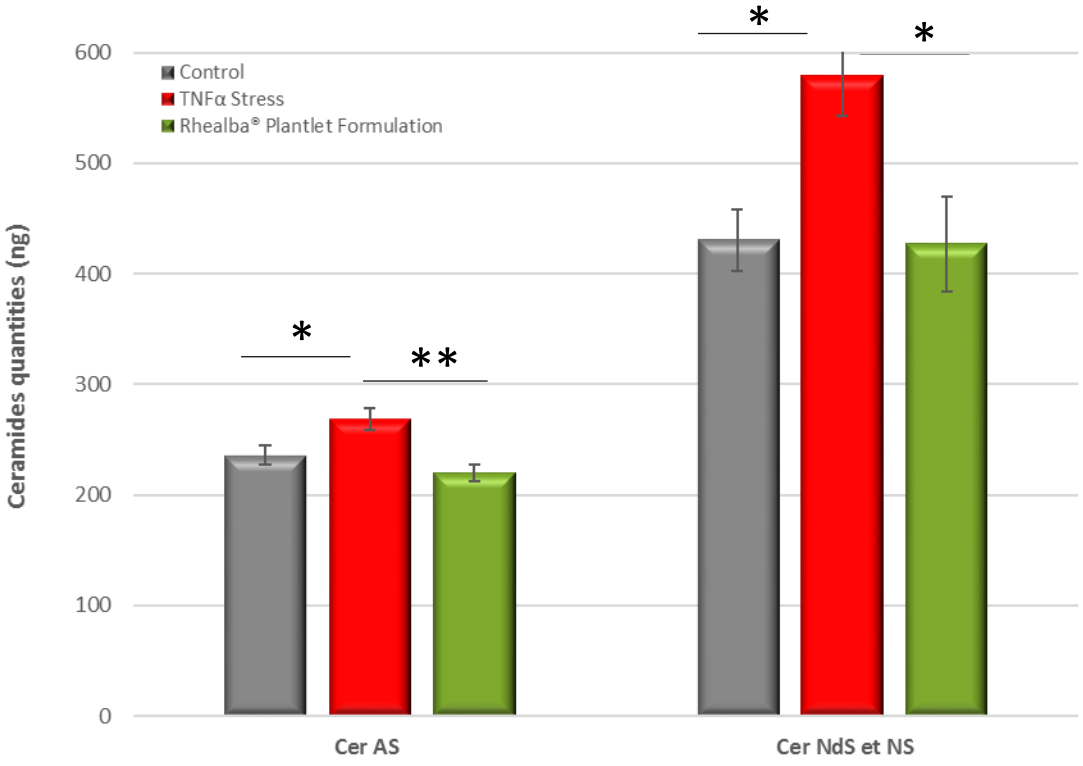


Modification des ratios lipidiques entrainant une modification de la fonction barrière

Application de la méthode



	Contrôle vs Stress		Stress vs Dermalibour	
Cer AS	14,00	*	-18,17	**
Cer NdS et NS	34,49	*	-26,15	*



Ceramides recovery in stratum corneum of the reconstructed epidermis
*(Mean ± SEM, n=9, NS not significant, * pvalue< 0.05, ** pvalue<0.01)*

Méthode qui nous a permis de doser les taux de céramides dans différents modèles cutanés et valoriser des produits dermo-cosmetiques

Jacques et al, 2022 Skin Pharmacology and Physiology, Evaluation of a novel skin emollient on skin lipidome and lipids organization. In press
Jacques et al, 2022 Experimental Dermatology, Barrier disruption and inflammatory skin models to … Under review

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement

Merci pour votre attention

Un grand merci à :

Laetitia Jourdes et Caroline Dejean, PFDC

Pierre Fabre

INRAE

Plateforme MetaboHUB-MetaToul-AXIOM, INRAE

Equipe Chromacim

CHROMACIM

Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique
& Personal Care
Recherche & Développement