



Mise au point d'une méthode de dosage des lipides cutanés par HPTLC

Carine JACQUES-JAMIN, Tiphaine HAMON, Sandrine BESSOU-TOUYA et Hélène DUPLAN

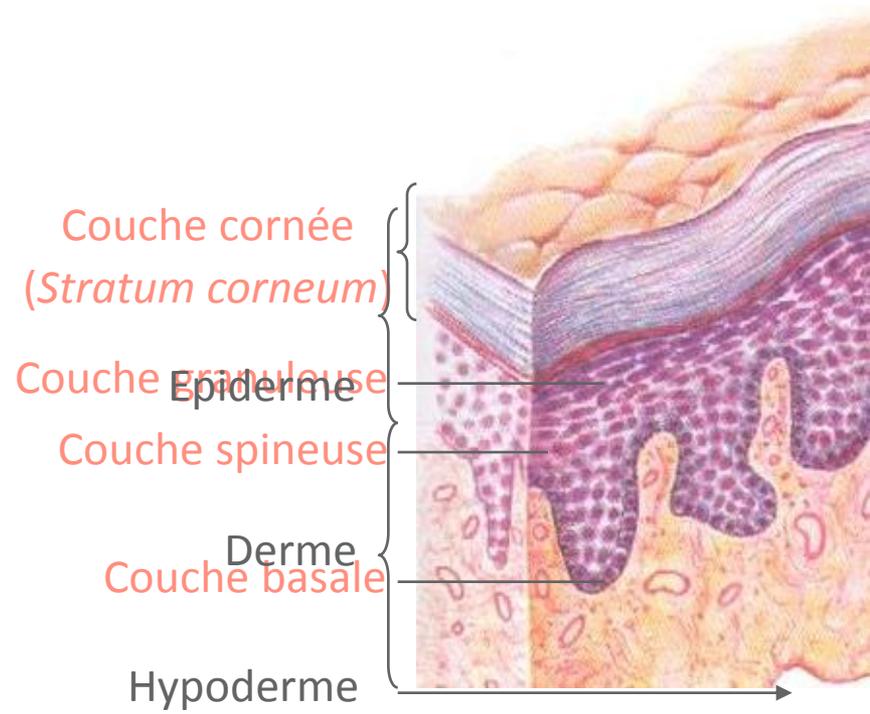
Pôle Pharmacologie – R&D Pierre Fabre Dermo-cosmétique



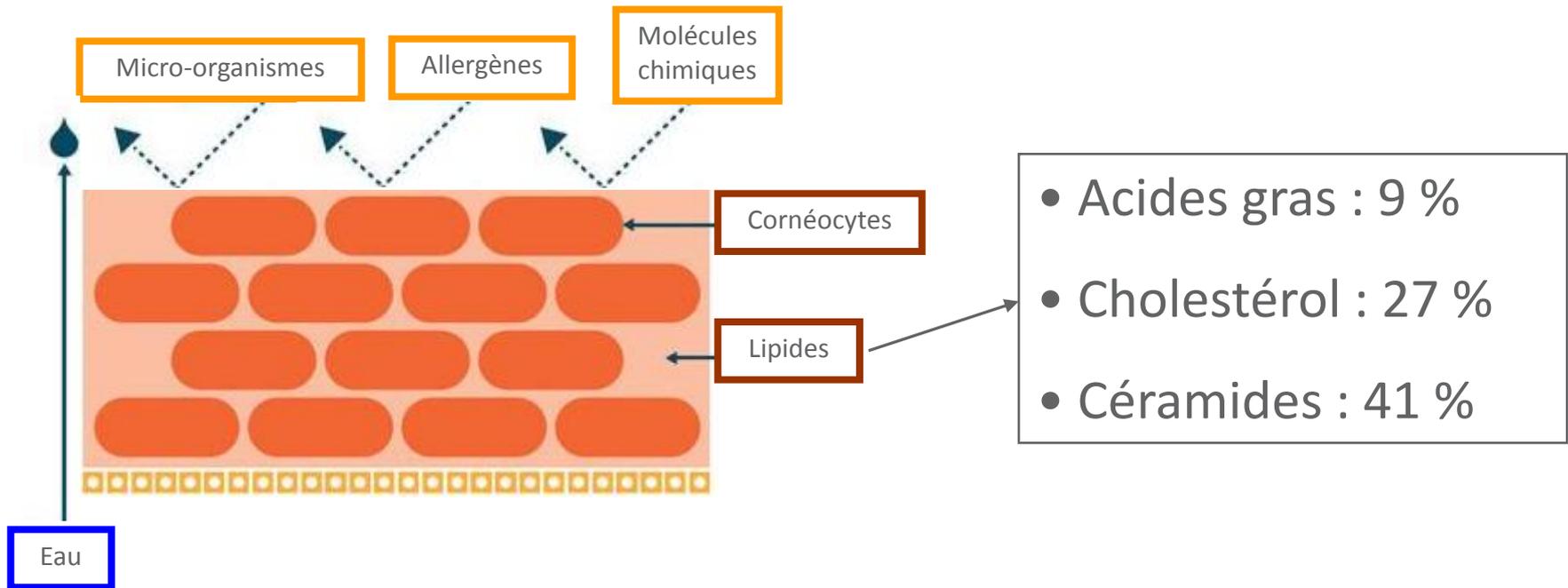
La peau

- **Rôle majeur** : Barrière de protection.
- **Trois couches** : épiderme, derme et hypoderme.
- **Epiderme** :
 - couche basale
 - couche spinieuse
 - couche granuleuse
 - couche cornée

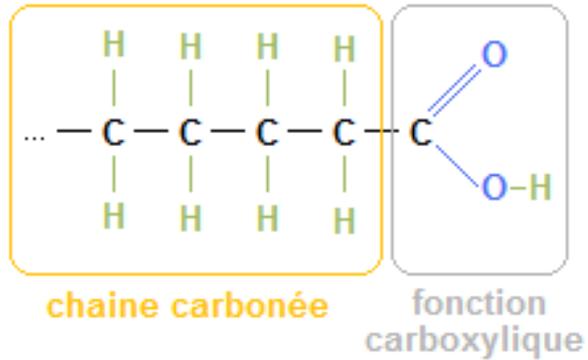
↳ *Stratum corneum*



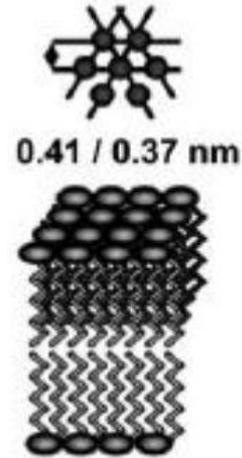
Stratum corneum :



Acide gras : mise en place de l'organisation lipidique.

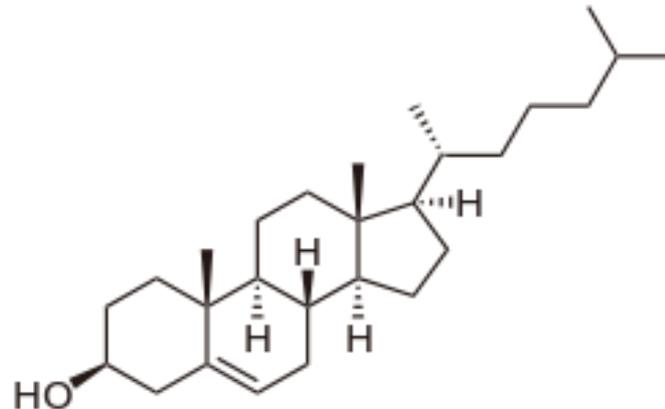


Structure générale d'un acide gras

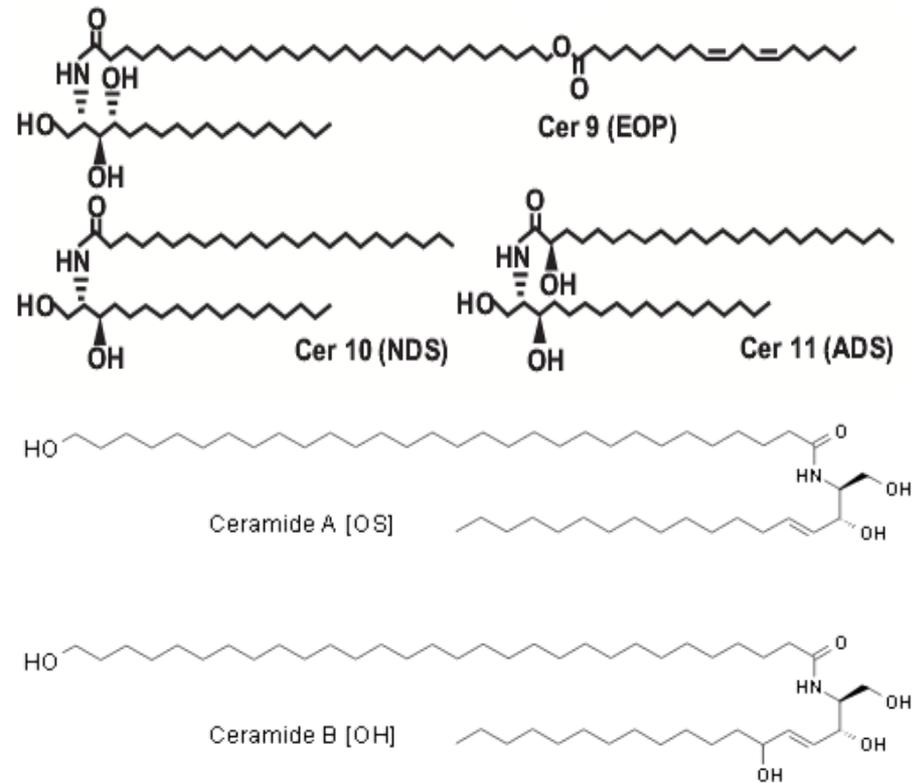
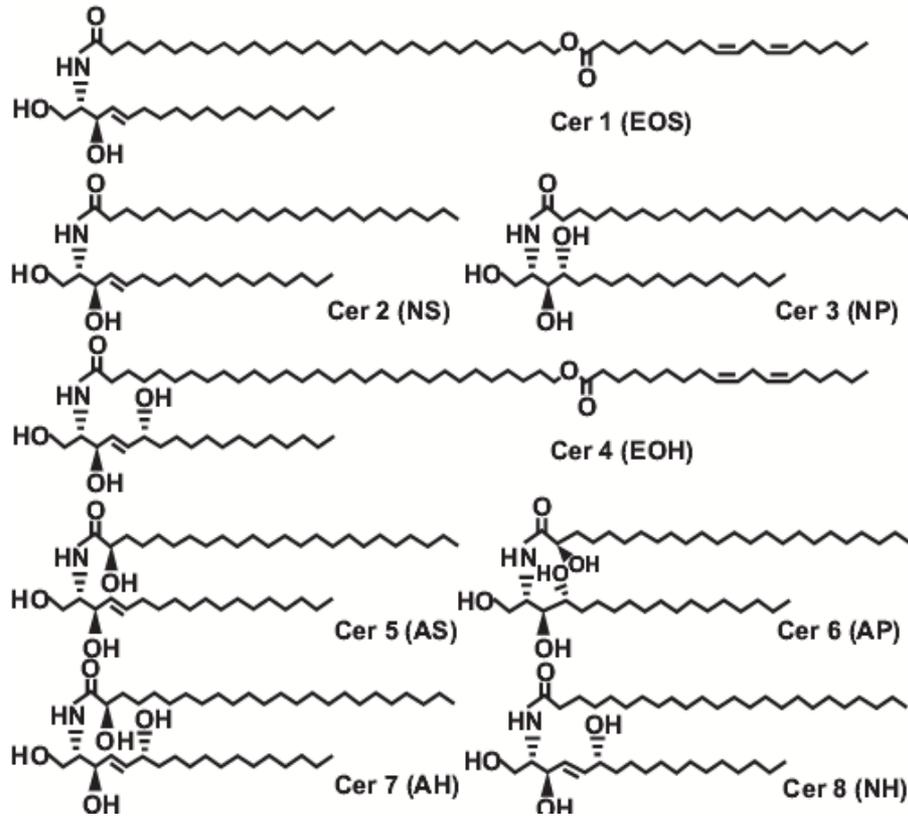


Organisation orthorhombique

Cholestérol : impliqué dans la desquamation.



Céramides : régulent la perte en eau et acteur majeur de l'effet barrière.



Identifier et quantifier les lipides du *stratum corneum* (SC) humain.



- Pathologie
 - Effet d'une crème
 - Composition en lipides de modèles reconstruits
-
- Extraction lipides du SC
 - Développement d'une méthode analytique en HPTLC .



- Extraction liquide/liquide :

- SC isolé puis broyé au cryo-broyeur ou au Potter-Elvehjem

- 7 protocoles d'extraction



SC isolé



Cryo-broyeur



Potter-Elvehjem

- Masse de SC identique et $V_{\text{final}} = 1 \text{ mL}$



Système HPTLC

Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4)



Automated Multiple Development 2 (AMD2)



Chromatogram Immersion Device III



TLC Plate Heater



TLC Scanner



TLC Visualizer



TLC-MS Interface



Couplage interface TLC-MS et Triple quadrupole



TLC-MS Interface



TSQ Quantum Ultra
Thermo Scientific

Extraction des composés avec 100% méthanol

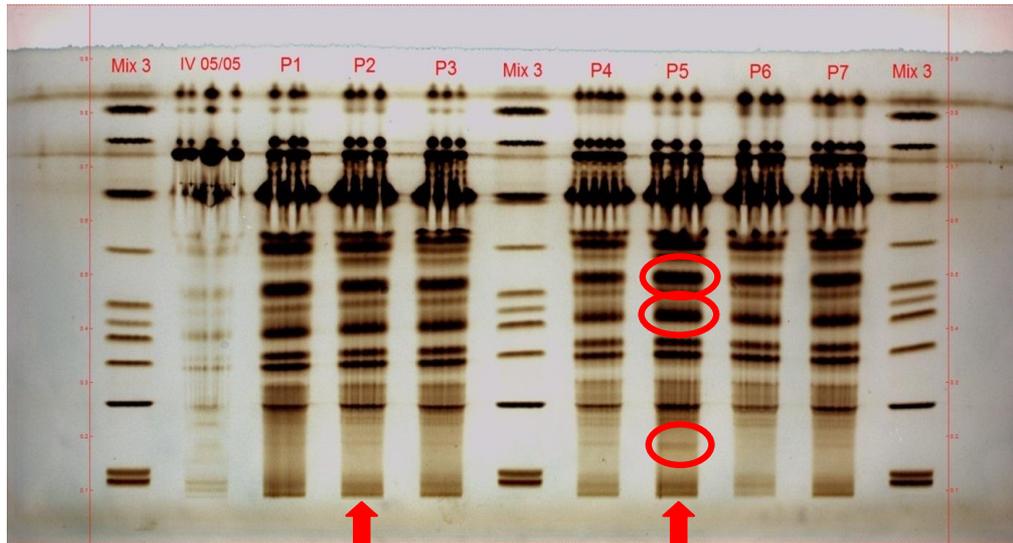
Injection directe dans le spectromètre de masse

Analyse en ESI négatif



Extraction des lipides

- 7 protocoles d'extraction liquide/liquide testés
- 2 modes de broyage testés



Extraction liquide/liquide sur SC broyé
au cryo-broyeur



Extraction liquide/liquide sur SC broyé
au Potter-Elvehjem

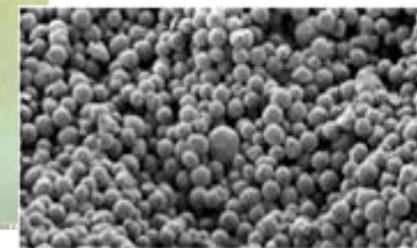
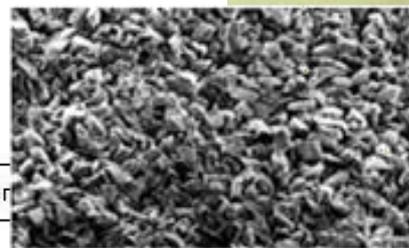
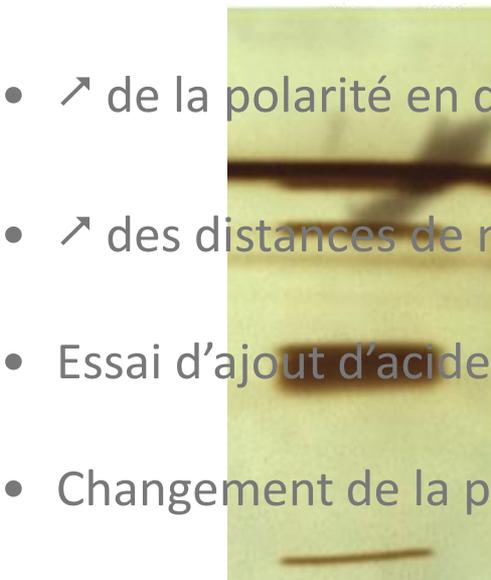
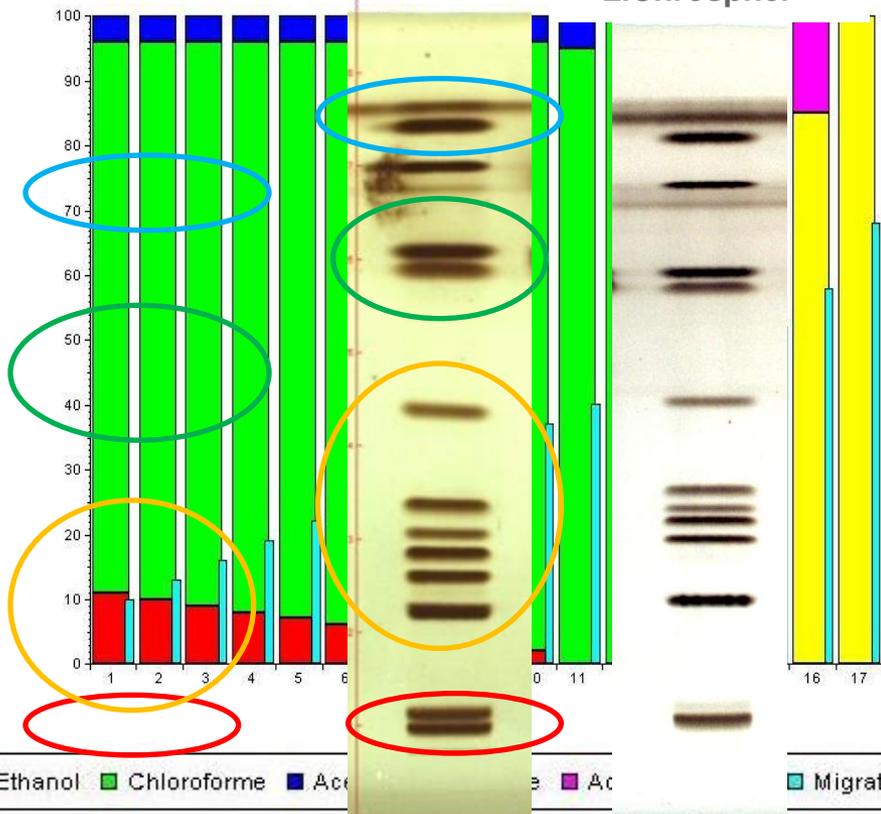
Gradient optimisé

Gradient optimisé avec plaque LiChrospher®

Optimisation du gradient :

Farwanah et al

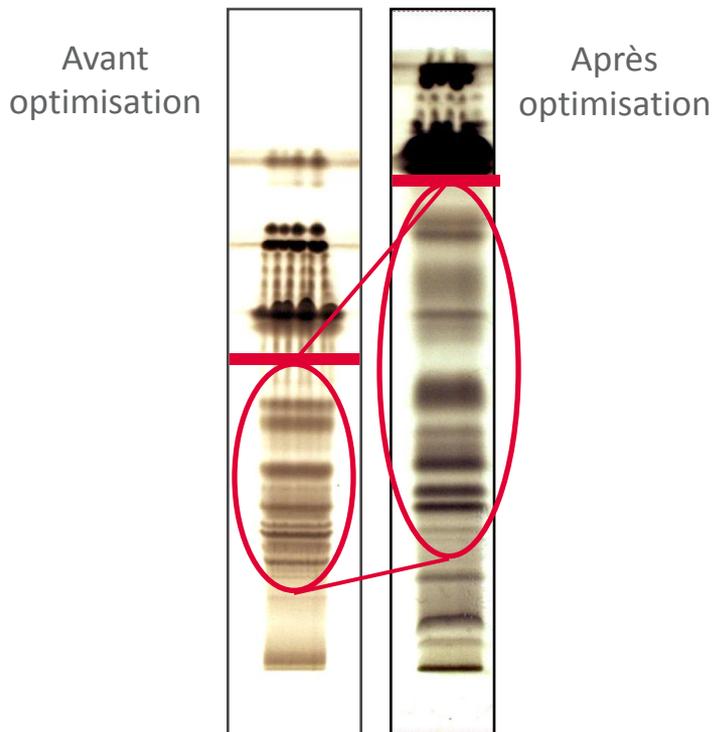
- ↗ de la polarité en début de gradient
- ↗ des distances de migration
- Essai d'ajout d'acide
- Changement de la phase stationnaire:



Plaque HPTLC Silice gel → Plaque HPTLC LiChrospher®



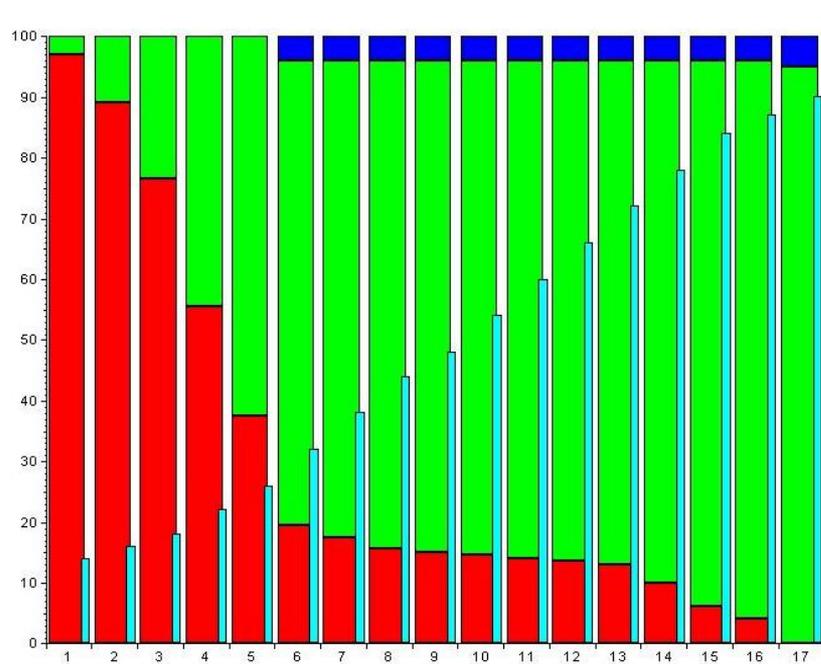
Optimisation de la séparation des céramides :



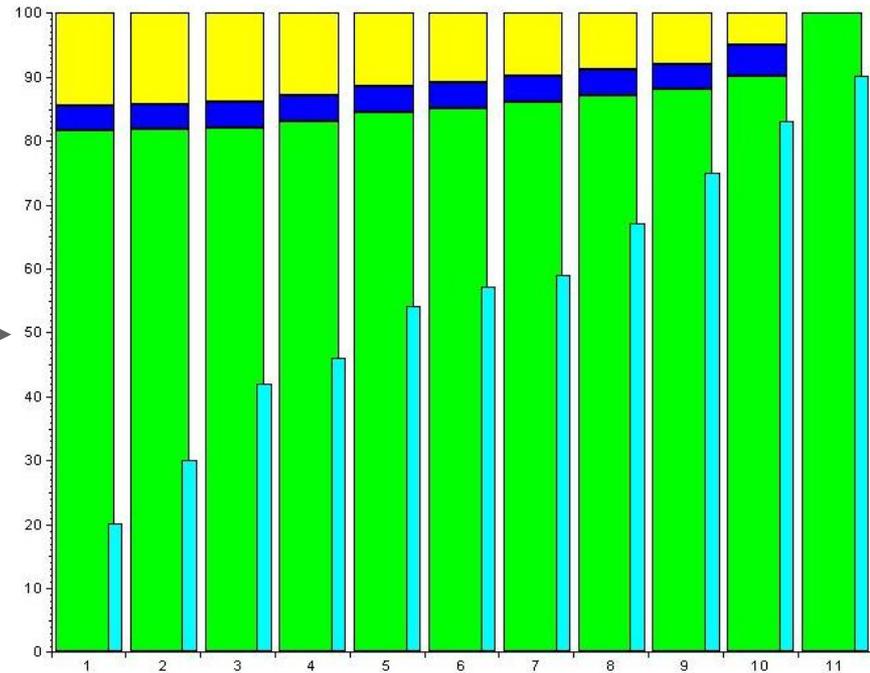
- Gradient spécifique à 4 solvants
- ↗ des distances de migration
- Ajout d'acide avec les solvants



Optimisation de la séparation des céramides :



Durée: **3h33**



Durée : **2h31**



Couplage TLC-MS



TLC-Interface

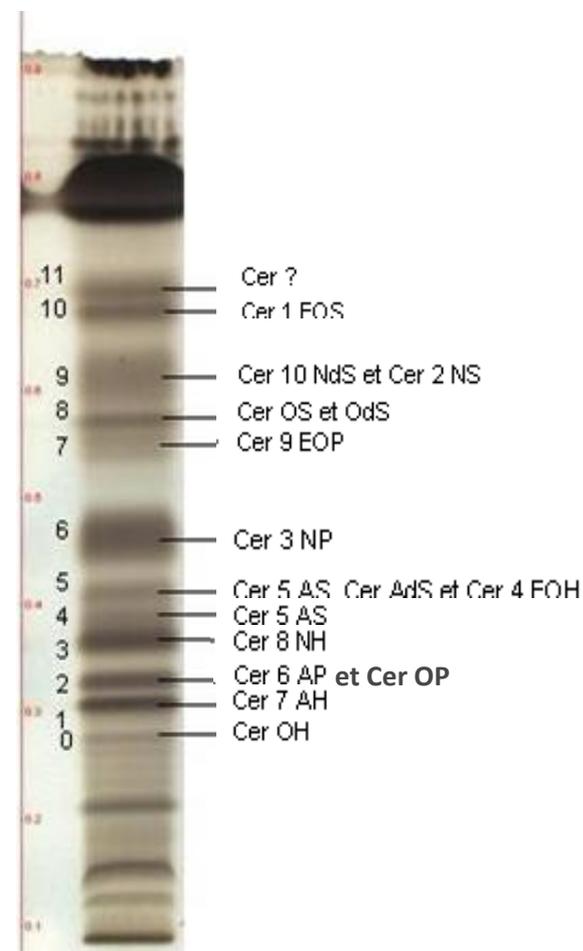


TSQ Quantum Ultra,
Thermo Scientific.

- Identification grâce aux standards et aux schémas de fragmentation issus de publications.
- Confirmation avec la HR-MS



Identification par spectrométrie de masse



Bande sur plaque HPTLC	Céramide	Désignation	Longueur de chaîne
Bande 0	Cer OH	ω -hydroxyacyl- β -hydroxysphingosine	C ₁₂ à C ₃₂ sauf C ₁₃ et C ₁₄
Bande 1	Cer 7 AH	α -OH-acyl- β -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- β -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
Bande 11	Cer ?	?	?



Quantification

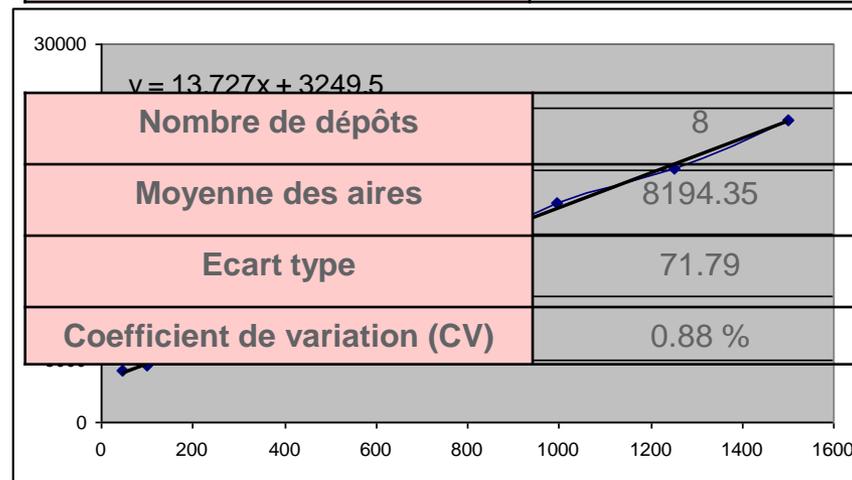
- LOD = 13.29 ng/bande
- LOQ = 44.35 ng/bande

- **Linéarité:**

Intervalle (ng/bande)	47 à 1500
Equation de la droite	$y = 13.727x + 3249.5$
Ordonnée à l'origine	3249.5
Pente	13.727
Coefficient de corrélation (r^2)	0.9979

$r^2 > 0.98 =$ Linéaire

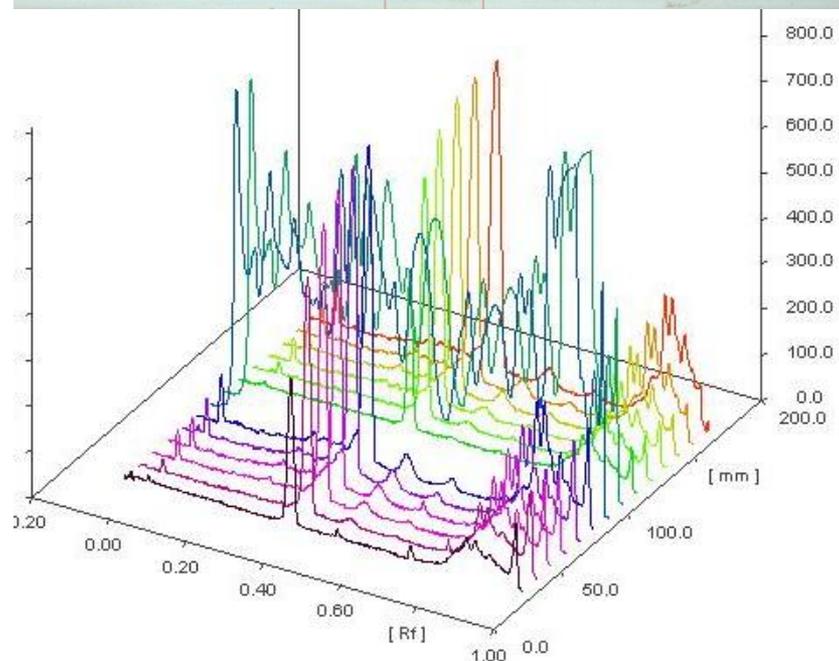
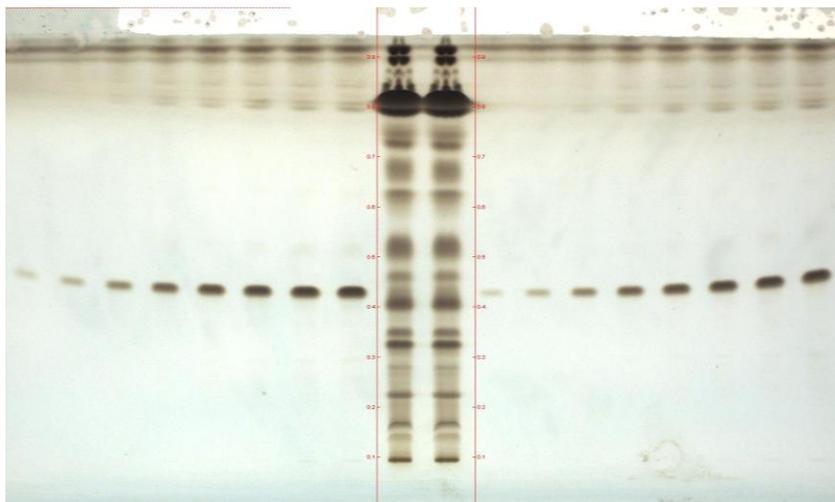
- **Répétabilité:**



$CV < 2 \% =$ Répétable



Quantification



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

- **Séparation** des différentes classes de lipides.
- **Identification** des céramides par spectrométrie de masse.
- **Quantification** des céramides.
- Méthode adaptée à la quantification des lipides dans des échantillons biologiques (peau humaine, modèles reconstruits)





Remerciements

Merci aux équipes de l'INRA



Merci à l'équipe de chez CHROMACIM

