



LABORATOIRES

Pierre Fabre

Dermo-Cosmétique
& Personal Care



Université de Lille

École graduée Biologie Santé Lille

Laboratoire PRISM Inserm U1192 | Laboratoires Pierre Fabre Dermocosmétique

Scoring moléculaire de la sévérité des pathologies cutanées par spectrométrie de masse *in vivo* en temps réel par la technologie SpiderMass

Par Lucille DARRAS

Pour le degré de Docteur en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Sous la direction du Pr. Isabelle FOURNIER

Et co-encadré par le Dr. Gwendal JOSSE

Soutenue le 19 juin 2025 à Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, TOULOUSE

Jury de thèse :

Rapporteurs	Ingénieur de Recherche INSERM	Justine BERTRAND-MICHEL	Université Toulouse III
	Directeur de Recherche INSERM	Michel SIMON	Université Toulouse III
Président du jury	Directeur de Recherche CNRS	Marc-Emmanuel DUMAS	Université de Lille
Examineur	Ingénieur de Recherche	Laurent DEBRAUWER	Université Toulouse III
Directeur	Professeure	Isabelle FOURNIER	Université de Lille
Co-encadrant	Docteur	Gwendal JOSSE	Pierre Fabre Dermo-Cosmétique
Membre invité	Professeur	Michel SALZET	Université de Lille

1 Table des matières

1 Table des matières	3
2 Abréviations	7
3 Introduction	11
3.1 Objectifs de la thèse.....	12
4 État de l'art.....	14
4.1 La spectrométrie de masse	14
4.1.1 La spectrométrie de masse : généralités	14
4.1.2 Les sources à pression atmosphérique et les sources ambiantes	18
4.1.2.1 Ionisation chimique à pression atmosphérique : APCI	18
4.1.2.2 Direct Analysis in Real Time : DART	19
4.1.2.3 Desorption electrospray ionization : DESI	20
4.1.2.4 Laser ablation electrospray ionization (LAESI) et Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI).....	21
4.1.2.5 Low-Temperature Plasma : LTP	22
4.1.3 Les sources pour les analyses <i>in vivo</i>	23
4.1.3.1 L'IKnife	23
4.1.3.2 Le SpiderMass	24
4.1.3.3 Le MasSpec Pen	25
4.1.4 La métabolomique et la lipidomique	26
4.2 Structure et fonctions de la peau	27
4.2.1 L'épiderme	28
4.2.2 Le derme	29
4.2.3 L'hypoderme	29
4.3 Les lipides Cutanés.....	29
4.3.1 Les sphingolipides : acteurs principaux de la fonction barrière	30
4.3.2 Le sébum et ses lipides	31
4.3.3 Les métabolites cutanés et les vitamines	33
4.4 Les dermatoses	34
4.4.1 La Dermatite Séborrhéique.....	34
4.4.1.1 <i>Malassezia</i> principal facteur microbiotique de la DS et ses impacts sur les lipides cutanés.....	34
4.4.1.2 Les traitements contre la DS.....	35
4.4.2 La Dermatite Atopique.....	35
4.4.2.1 L'implication du microbiote cutané dans la DA	37
4.4.2.2 Les traitements pour soulager la DA.....	37

4.4.3 Le Psoriasis	38
4.4.3.1 Diminution de la diversité du microbiote cutané et modification du profil lipidique dans la pathogenèse du psoriasis.....	39
4.4.3.2 Les traitements contre le psoriasis vulgaris.....	39
4.4.4 La Rosacée.....	40
4.4.4.1 Demodex principal micro-organisme impliqué dans la rosacée.....	41
4.4.4.2 Traitements de la rosacée.....	42
5 De l'acquisition des données à l'identification moléculaire	43
5.1 Le SpiderMass	43
5.2 Méthodes d'acquisitions.....	45
5.2.1 Optimisation des modes positif et négatif.....	45
5.2.2 Optimisation de méthodes pour l'analyse et la fragmentation de céramides ou de métabolites.....	46
5.3 Workflow d'acquisition : du prélèvement aux résultats.....	49
5.3.1 L'acquisition des données	49
5.3.2 Le prétraitement et l'analyse statistique	53
5.3.3 L'identification des lipides et création d'une base de données	54
6 L'étude de quatre dermatoses inflammatoires par l'étude clinique SMPatho	59
6.1 L'étude de la Dermatite Séborrhéique	60
6.1.1 L'étude SMPathoDS	60
6.1.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoDS	61
6.1.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoDS	62
6.1.4 Discussion sur les résultats de SMPathoDS	63
6.1.5 Conclusion sur SMPathoDS	64
6.2 L'étude de la Dermatite Atopique	65
6.2.1 L'étude SMPathoDA	65
6.2.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoDA.....	66
6.2.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoDA.....	67
6.2.4 Discussion sur SMPathoDA	68
6.2.5 Conclusion sur SMPathoDA	70
6.3 L'étude du Psoriasis	71
6.3.1 L'étude SMPathoPso	71
6.3.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoPso.....	73
6.3.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoPso	75
6.3.4 Discussion sur SMPathoPso	76
6.3.5 Conclusion sur SMPathoPso	78

6.4 L'étude de la Rosacée	78
6.4.1 L'étude SMPathoRosacée	78
6.4.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoRosacée	80
6.4.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoRosacée	81
6.4.4 Discussion sur SMPathoRosacée.....	81
6.4.5 Conclusion de la partie SMPathoRosacée.....	83
6.5 Conclusion et comparaison des quatre dermatoses	83
7 Étudier une dermatose et son traitement : la Dermatite Séborrhéique et l'étude KelualDS	86
7.1 L'étude KelualDS	86
7.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans l'étude KelualDS.....	87
7.3 Identification des molécules modulées dans l'étude KelualDS	88
7.4 Discussion et conclusion sur les résultats de KelualDS.....	89
7.5 Croisement des données acquises par SpiderMass avec une analyse métabolomique.....	92
8 Le SpiderMass : outil d'analyse de la peau saine après application de produit cosmétique	94
8.1 L'étude RetinoSpider.....	94
8.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans l'étude RetinoSpider	95
8.3 Identification des molécules significativement modulées dans la comparaison du RAL vs CTL	96
8.4 Validation des identifications par la méthode du Kendrick's plot.....	97
8.5 Discussion sur les résultats de l'étude RetinoSpider	98
8.6 Conclusion.....	102
9 L'analyse du microbiote cutané par SpiderMass	104
9.1 Différencier 5 souches au SpiderMass.....	104
10 Conclusion.....	108
11 Annexes	112
11.1 Annexe 1 : Matériels et Méthodes pour l'utilisation du SpiderMass	112
11.2 Annexe 2 : Prétraitement des données par MatLab.....	114
11.3 Annexe 3 : Critères d'éligibilité de SMPatho	115
11.4 Annexe 4 : Assignations SMPathoDS	119
11.5 Annexe 5 : Assignations SMPathoDA.....	120
11.6 Annexe 6 : Assignations SMPathoPso	124
11.7 Annexe 7 : Assignations SMPathoRosacée	128
11.8 Annexe 8 : Critères d'éligibilité de KelualDS	130
11.9 Annexe 9 : Assignations KelualDS	132
11.10 Annexe 10 : Article "Lipidomic Insights into Seborrheic Dermatitis: Clinical Evaluation of Sebum Changes Using SpiderMass in a Randomized Controlled Study"	137
11.11 Annexe 11 : Critères d'éligibilité de RetinoSpider	163

11.12 Annexe 12 : Assignations RetinoSpider	165
11.13 Annexe 13 : Protocole de mise en culture des bactéries cutanées : <i>C. acnes</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	168
12 Bibliographie	169
13 Liste des publications et Brevets.....	201
13.1 Publications.....	201
13.2 Brevet.....	201
13.3 Présentations orales et Posters	201
14 Remerciements	202
Résumé	206

2 Abréviations

[ADS]	α -hydroxy dihydrosphingosines
[AH]	α -hydroxy 6-hydroxy sphingosine
[AP]	α -hydroxy phytosphingosine
[AS]	α -hydroxy sphingosine
[ASD]	α -hydroxy 4,14-sphingadiene
[DS]	Dihydrosphingosine
[EODS]	ω -Hydroxy estérifié dihydrosphingosine
[EOH]	ω -Hydroxy estérifié 6-hydroxy sphingosine
[EOP]	ω -Hydroxy estérifié phytosphingosine
[EOS]	ω -Hydroxy estérifié sphingosine
[E OSD]	ω -Hydroxy estérifié 4,14-sphingadiene
[H]	6-hydroxy sphingosine
[NDS]	Non-hydroxy dihydrosphingosine
[NH]	Non-hydroxy 6-hydroxy sphingosine
[NP]	Non-hydroxy phytosphingosine
[NS]	Non-hydroxy sphingosine
[NSD]	Non-hydroxy 4,14-sphingadiene
[P]	Phytosphingosine
[S]	Sphingosine
ACP	Analyses en Composantes Principales
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Adaptative Filtering
AIMS	Ambient Ionization Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à ionisation ambiante)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Ionisation chimique à pression atmosphérique)
APMS	Atmospheric Pressure Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à pression atmosphérique)
BH	Benjamini-Hochberg
C	Carbone
Cer	Céramide
CFM-ID	Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification
CI	Chemical Ionization (Ionisation Chimique)
CID	Collision Induced Dissociation (Dissociation Induite par Collision)
CPP	Comité de Protection des Personnes
CTL	Contrôle
Da	Dalton
DA	Dermatite Atopique
DART	Direct analysis in real time (Analyse Directe en Temps-Réel)
DESI	Desorption Electrospray Ionization (Désorption Ionisation par Electronébulisation)
DG	Diglycéride
DS	Dermatite séborrhéique
EI	Electronic Impact (Impact électronique)
ELOVL	Élongases
ESI	ElectroSpray Ionization (Ionisation par Électronébulisation)
FA	Fatty acid (Acide gras)
FAB	Fast Atom Bombardment (Bombardement par Atome Rapide)
FAHFA	Fatty Acid Esters of Hydroxyl-Fatty Acids ou Fatty acid estolides (Ester d'Acide Gras Ramifié par un Acide Gras Hydroxylé)

FAL	Fatty aldehyde (Aldéhyde Gras)
FC _{abs}	Fold Change absolu
FC	Fold Change
FFAs	Free Fatty Acids (Acides Gras Libres)
FLG	Filaggrine
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclootron Resonance (spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique)
FTIR	Fourier transformation infrarouge (Infrarouge à transformer de Fourier)
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GL	Glycérolipide
HMDB	Human Metabolome Database
IA	Intelligence Artificielle
ICR	Ion Cyclotron Resonance (Résonance d'Ion Cyclotronique)
IFN- γ	Interféron gamma
IGA	Investigator Global Assessment
IH	Indice d'hydratation
IL	Indice Lipidique
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse
IR	Infrarouge
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAESI	Laser Ablation Electrospray Ionization (Ionisation électrospray par ablation laser)
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse
LTP	Low Temperature Plasma
m/z	Ratio masse sur charge
MALDESI	Matrix Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice)
MatLab	MATrix LABoratory
MOLO	MOTion control LOop
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
MS/MS	Fragmentation en tandem
NMF	Natural Moisturising Factors (Facteurs Naturels d'Hydratation)
NOS	Nitric Oxide Synthase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPO	Optical Parametric Oscillator
PA	Pression Atmosphérique
PFDC	Pierre Fabre Dermo-Cosmétique
PFPA	PerFluoroPentanoic Acid (Acide perfluoropentanoïque)
PIE	Perte d'eau transépidermique (= TEWL : Trans Epidermal Water Loss)
PRISM	Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse
Pso	Psoriasis
PTFE	PolyTétraFluoroÉthylène
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid (Acides gras libres polyinsaturés)
QqQ	Triple quadripôle
RAL	Rétinal ou rétinaldéhyde
REIMS	Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry
ROL	Rétinol

ROS	Reactive Oxygen Specie (Espèce réactive de l'oxygène)
RT	Retention time (Temps de rétention)
RXR	Récepteurs aux Rétinoïdes
RYL	Rétinyl Palmitate
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SC	<i>Stratum Corneum</i>
SCORAD	SCORing Atopic Dermatitis
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires)
SNR	Signal to Noise Ratio (Rapport Signal/Bruit)
SPB	Sphingoid base (Base sphingoïde)
SP	Sphingolipide
STD	Déviatiion Standard
TG	Triglycéride
TIC	Total Ion Current (Courant Ionique Total)
TNF- α	Tumour Necrosis Factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)
ToF	Time of Flight (analyseur à temps de vol)
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
VDR	Vitamin D Receptor (récepteur de la vitamine D)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WALDI	Water Assisted Laser Desorption/Ionization
WE	Wax Ester (cérade)
ZL	Zone Lésionnelle
ZPL	Zone Péri-Lésionnelle
ZR	Zone de Référence

3 Introduction

La peau humaine constitue la première barrière entre l'organisme et le monde extérieur. Cet organe, longtemps considéré comme passif, s'est révélé être un système vivant, hautement dynamique, au sein duquel s'opèrent des échanges biologiques, chimiques et microbiens essentiels. Véritable interface entre l'environnement et notre système immunitaire, elle assure des fonctions multiples telles que la protection, la régulation thermique, l'immunité, la perception sensorielle. Elle représente aujourd'hui un sujet central en dermatologie et en biologie des tissus.

Parmi les nombreuses affections touchant cet organe, les dermatoses inflammatoires chroniques telles que l'acné, la dermatite atopique (DA), le psoriasis (Pso) ou encore la dermatite séborrhéique (DS) sont particulièrement prévalentes et invalidantes. Ces pathologies n'impactent pas seulement la santé physique, elles altèrent profondément la qualité de vie des patients, notamment en raison de leur chronicité, de leur visibilité et des douleurs ou démangeaisons qu'elles génèrent. En France comme dans le reste du monde, leur prévalence est en constante augmentation, posant un réel enjeu de santé publique.

La DS est une affection cutanée inflammatoire chronique fréquente, touchant les zones riches en glandes sébacées. Elle présente une prévalence de 5 % dans la population adulte générale, mais peut atteindre 70 % chez les nourrissons de moins de 3 mois et jusqu'à 15% chez les personnes âgées. Elle est souvent associée à des poussées récurrentes, particulièrement en période de stress, de fatigue ou de baisse d'immunité. Cette pathologie est étroitement liée à une dysbiose du microbiote, en particulier une prolifération excessive de champignons du genre *Malassezia*, qui interagissent avec les lipides du sébum pour générer des molécules pro-inflammatoires.

La DA, ou eczéma atopique, est une maladie inflammatoire chronique de la peau, caractérisée par des lésions prurigineuses, une sécheresse cutanée et une altération de la barrière épidermique. Elle affecte 10 à 15 % des nourrissons dès l'âge de 3 mois et environ 4 % des adultes dans les pays industrialisés. En France, on estime que 15 à 20 millions de personnes présentent des signes de DA. Cette dermatose est souvent accompagnée d'une colonisation cutanée massive par *Staphylococcus aureus*, particulièrement dans les phases de poussée, aggravant l'inflammation par des mécanismes immunitaires complexes. La DA représente un fardeau socio-économique important et est aujourd'hui une des premières causes de consultation en dermatologie pédiatrique.

Le psoriasis, quant à lui, touche plus de 60 millions de personnes dans le monde, et présente une prévalence variant entre 1 à 3% selon les populations. Il se manifeste par une hyperprolifération épidermique accompagnée d'une inflammation systémique, et peut atteindre toutes les zones du corps. Sa composante auto-immune en fait une pathologie aux multiples comorbidités, incluant notamment les atteintes articulaires, cardiovasculaires et psychologiques. L'impact sur la qualité de vie est majeur, particulièrement lorsque les lésions atteignent le visage, les mains ou les organes génitaux. Le Pso est également associé à une modification du microbiote cutané et à une altération significative des profils lipidiques, en particulier les céramides (Cer).

Enfin, la rosacée est une affection inflammatoire chronique du visage, touchant environ 5 à 10 % des adultes caucasiens, avec une prédominance chez les femmes de peau claire entre 30 et 50 ans. Cette pathologie, bien que souvent sous-diagnostiquée, est marquée par des rougeurs persistantes, des sensations de brûlure et des épisodes inflammatoires, parfois confondus avec l'acné. La présence excessive du parasite *Demodex folliculorum* au niveau des follicules pileux est de plus en plus reconnue comme un facteur clé dans la physiopathologie de la rosacée.

La compréhension fine des mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces pathologies repose sur l'étude de la peau dans son état natif. C'est dans ce contexte que l'entreprise Pierre Fabre Dermo-Cosmétique (PFDC) s'engage à améliorer la qualité de vie des patients grâce au développement de produits dermo-cosmétiques. L'entreprise allie recherche pharmaceutique et recherche dermo-cosmétique, avec une expertise particulière sur les plantes et une connaissance approfondie des actifs naturels. Or, la majorité des techniques analytiques disponibles nécessitent des échantillons prélevés, souvent traités, rendant difficile, voire impossible, une observation fidèle et en temps réel des processus biologiques en jeu. Ceci freine la compréhension des réponses cutanées aux traitements ou aux perturbations métaboliques. C'est donc dans ce contexte que PFDC cherche à étudier ces mécanismes physiopathologiques au plus près de la zone pathologique afin de mieux comprendre leur genèse et leur réponse aux traitements. Dans un contexte physiologique normal, l'homéostasie cutanée est liée à l'équilibre des voies métaboliques. Les changements physiologiques naturels, tels qu'une modification du cycle hormonal, ou les changements physiopathologiques, entraînent des modifications moléculaires importantes des protéines, des lipides ou des métabolites¹⁻³. Il est possible de suivre ces changements physiologiques ou physiopathologiques cutanés à l'état pur en mesurant les variations des profils moléculaires associés. C'est donc la spectrométrie de masse (MS) qui s'est imposée comme un outil de choix pour l'analyse des biomolécules présentes dans les tissus. Grâce à sa grande sensibilité, sa reproductibilité et sa capacité à analyser des mélanges complexes, elle permet de dresser des profils moléculaires précis. Cependant, l'analyse traditionnelle par MS requiert souvent une étape d'extraction, incompatible avec des mesures *in vivo*.

Ces dernières années, des avancées majeures ont permis de faire évoluer cette technologie vers des approches plus respectueuses de l'intégrité des échantillons, notamment grâce à l'émergence de techniques d'ionisation douce et d'échantillonnage minimalement invasif. Parmi elles, la technologie SpiderMass représente une innovation majeure. Développée par le laboratoire PRISM (Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse, Inserm U1192), elle utilise un laser infrarouge (2940 nm) qui ne pénètre que peu profondément dans les tissus en raison de la grande quantité de molécules d'eau endogènes absorbant à cette longueur d'onde, mais permet en même temps une désorption/ionisation laser assistée par l'eau (Water Assisted Laser Desorption/Ionization, WALDI) efficace. Le choix de cette longueur d'onde excite spécifiquement la bande d'absorption la plus intense (étirement de la liaison O-H) des molécules d'eau⁴⁻⁶. Ce procédé permet une analyse en temps réel, *in vivo*, sans détruire l'échantillon, en exploitant l'eau présente dans les tissus comme une matrice MALDI. L'utilisation de SpiderMass ouvre ainsi la voie à une nouvelle génération d'analyses biomoléculaires *in situ*, puisqu'initialement développé pour fournir une aide à la décision pour la chirurgie guidée du cancer⁷. Mais cette technologie non invasive rapide et efficace possède un potentiel applicatif majeur dans d'autres domaines comme la dermatologie, le diagnostic rapide ou la recherche fondamentale. L'objectif de ce travail est de démontrer la pertinence de cette technologie dans le domaine dermatologique, en particulier pour l'étude et le suivi de pathologies cutanées inflammatoires. En combinant rigueur analytique, innovation technologique et approche translationnelle, ce projet s'inscrit dans une perspective de médecine de précision, visant à améliorer la compréhension des pathologies cutanées et à guider plus finement leur traitement.

3.1 Objectifs de la thèse

La problématique du projet de thèse est de mieux caractériser les états inflammatoires de la peau au travers de la mise en place d'une nouvelle stratégie expérimentale et analytique utilisant la technologie innovante SpiderMass qui offre la possibilité de réaliser des analyses *in vivo* et en temps réel. En particulier, les objectifs sont d'établir un profil moléculaire de 4 dermatoses, la DS, la DA, le Pso et la rosacée et d'en chercher des biomarqueurs pouvant être suivi par SpiderMass afin de mettre une

place un scoring moléculaire de chaque dermatose. Ce scoring physiologique précis a pour but de permettre ensuite une évaluation rapide et robuste des actifs et formules. De plus, les pathologies cutanées sont généralement associées à une perturbation de l'équilibre du microbiote cutané. Aussi, le second objectif était de croiser les données lipidiques et métaboliques acquises en SpiderMass à des données du microbiote. Dans ce but, le projet a été divisé en plusieurs phases spécifiques, tout d'abord l'identification des molécules impliquées dans chacune des dermatoses afin d'établir un scoring. L'identification des biomarqueurs se poursuivra dans le cadre d'études impliquant des produits cosmétiques, afin de déterminer ceux qui sont modifiés par les traitements. Ces travaux permettront, à terme, de construire un système de scoring moléculaire pertinent, applicable à la fois aux études fondamentales sur la peau et à l'évaluation de l'efficacité des produits cosmétiques.

Cette première partie sur l'identification et l'analyse des signatures moléculaires des dermatoses, se base sur une étude clinique (SMPatho) au cours de laquelle des volontaires présentant les 4 dermatoses étudiées ont été reçus pour une analyse *in-vivo* et sur prélèvement de sébum sur papier à cigarettes avec la technologie SpiderMass permettant de collecter des informations moléculaires non ciblées. Sur la base de ces données cette partie est dédiée à l'identification moléculaire des signaux SpiderMass observés de façon significative dans l'étude clinique SMPatho via des fragmentations MS/MS. L'ensemble des identifications a permis d'établir des signatures métaboliques SpiderMass de la peau saine et pathologique. Afin de finaliser cette étape du projet un regroupement des données obtenues est fait sous forme de banques de données des lipides et métabolites cutanés.

Ensuite la sélection des signaux et biomarqueurs SpiderMass est réalisée sur les molécules et signaux les mieux corrélés aux scores cliniques de référence, afin de sélectionner des biomarqueurs de chacune des dermatoses. Cette analyse se fait en parallèle avec des données bibliographiques existantes, comprenant les différentes voies métaboliques observées et connues. Une fois les outils de scoring SpiderMass de sévérité validés, ils sont utilisés pour comparer l'efficacité de différents traitements, dans des études cliniques contrôlées. L'approche SpiderMass permettra aussi de suivre les modifications moléculaires entraînées par ces traitements au niveau de l'épiderme.

Enfin les pathologies tel que la DA ou la DS sont des pathologies associées à de très fortes modifications du microbiote cutané. Par exemple, une forte prolifération de *Malassezia* est connue comme étant un facteur de la DS alors que dans la DA c'est une prolifération de *Staphylococcus aureus* qui est observée. Dans ces contextes physiopathologiques, une analyse croisée entre la signature lipidique et de la colonisation bactérienne pourra être menée sur les mêmes patients et au cours du temps. Cette étude permettra d'évaluer pour chacune de ces trois pathologies si l'amplitude des modifications du métabolisme moléculaire est directement corrélée à l'amplitude de colonisation de la bactérie ou du champignon pathogène.

4 État de l'art

4.1 La spectrométrie de masse

4.1.1 La spectrométrie de masse : généralités

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse qui permet de déterminer le poids moléculaire de composés indirectement au travers de la mesure du rapport masse/charge (m/z) des ions en phase gazeuse. C'est une technique qui apporte aussi bien des informations qualitatives et/ou quantitatives. Elle présente l'avantage de séparer les composés par leur m/z réalisant ainsi à la fois une séparation et une identification. Les échantillons analysés par MS peuvent être des composés d'origines diverses (organiques ou inorganiques), de complexité (composé pur ou mélange complexe) et de tailles diverses (allant de l'atome aux complexes moléculaires). Le spectromètre de masse est séparé en 3 parties principales, tout d'abord la source qui transforme l'échantillon en ions en phase gazeuse, puis la partie centrale, constituée de l'analyseur (ou des analyseurs selon les instruments), qui fonctionnent sous vide poussé et utilisent des champs électriques ou magnétiques pour séparer les ions, et enfin le détecteur qui transforme le courant ionique en courant électronique et amplifie le signal. Il en résulte un spectre de masse qui reporte le courant électronique en fonction du rapport m/z .

La MS est une technique vieille de plus d'un siècle, qui commence en 1897 avec la découverte de l'électron par Joseph John Thomson. S'ensuivent deux prix Nobel, l'un pour Thomson en 1906⁸ sur la conduction de l'électricité par les gaz et le second pour Aston en 1922⁹ sur la découverte d'isotopes d'éléments non radioactifs, et pour son énonciation de la règle du nombre entier, selon laquelle la masse atomique des isotopes stables est très proche d'un nombre entier, lorsque la masse de l'hydrogène est prise comme unité de référence. Cette règle découle de l'observation que la masse d'un noyau atomique est approximativement égale à la somme des masses de ses protons et neutrons, avec une légère diminution due au défaut de masse, elle-même liée à l'énergie de liaison nucléaire. Malgré cette correction, Aston a montré que les masses atomiques des isotopes demeurent proches de valeurs entières, ce qui a permis de confirmer l'existence d'isotopes dans de nombreux éléments non radioactifs et d'apporter un soutien empirique aux modèles nucléaires naissants de l'époque. Les premiers appareils mis au point étaient d'abord appelés des spectrographes de masse, mesurant les ions par une plaque photographique ou des écrans phosphorescents¹⁰, avant de changer de nom aujourd'hui pour spectromètres de masse car ils mesurent les ions au moyen de détecteurs électriques. Sur la base de ces premières expériences un grand nombre d'avancées a été rendu possible et a été nécessaire aussi bien sur les méthodes d'ionisation que sur les analyseurs pour augmenter la variété des échantillons pouvant être analysés et pour arriver à la MS que nous connaissons aujourd'hui, avec des performances analytiques décuplées en termes de pouvoir résolutif, résolution spectrale, sensibilité et gamme dynamique

Les développements de la MS sur plus d'un siècle ont concerné à la fois les analyseurs de masse mais également les sources de production des ions. Sur le plan des sources d'ionisation, les premiers grands développements ont concerné le développement de la source d'ionisation dite d'impact électronique (EI) en 1918 par Dempster. Avec ces premières technologies il a été notamment possible de découvrir les isotopes et de déterminer les ratios de ces différents isotopes, dont ceux de l'uranium, travaux qui vaudront le prix Nobel de Chimie à Aston en 1922. Si l'impact électronique permet une ionisation efficace des petits composés, elle n'est pas adaptée aux composés de poids moléculaires plus élevés (en général >500 u.) et plus polaires. Par ailleurs, l'impact électronique en générant des ions radicaux par bombardement des molécules en phase gazeuse par un faisceau d'électrons, provoque de nombreuses fragmentations rendant difficile l'analyse de mélanges et l'interprétation des spectres MS.

Ainsi, le développement dans les années 60 de l'ionisation Chimique (CI) par Munson et Field permet un processus d'ionisation plus douce par la mise en jeu d'un transfert de protons entre un gaz réactif et les analytes. Cependant, l'ionisation chimique n'est pas exempte de toute fragmentation, et sa sensibilité parfois moindre que l'EI. De plus, elle présente les mêmes limites analytiques, provenant du fait que l'échantillon est passé à l'état gazeux par simple chauffage, et que les composés de plus haut poids moléculaire et plus polaires ne le sont pas assez. Ainsi rapidement des recherches ont été menées pour trouver des sources de production d'ion alternatives permettant de surpasser les limites rencontrées avec l'EI et même la CI. La source de MS d'ions secondaires (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS) constitue un premier changement de paradigme important puisque cette source est basée sur le bombardement d'échantillons solides déposés sur une surface par un faisceau d'ions primaires fortement accéléré (keV) qui conduit à un mécanisme de pulvérisation assurant une transition rapide du solide vers le gaz et la création d'une proportion d'ions en phase gazeuse. Le SIMS a plusieurs avantages dont celui de pouvoir permettre des analyses de surface, par couche atomique si besoin. Néanmoins, et même si des travaux portent encore actuellement sur l'augmentation des performances de la technologie, le SIMS reste traditionnellement limité à l'analyse atomique ou de composés jusqu'à des poids moléculaires d'environ 1000 u avec des polarités intermédiaires. Fin des années 70 et début des années 80, d'autres méthodes d'ionisation, sont ensuite apparues, telles que la désorption par plasma (PDMS), ou le bombardement atomique rapide (FAB). Elles ont permis l'analyse de composés de plus haut poids moléculaire plus polaires comme des protéines. Cependant les concentrations en échantillons restaient élevées et les molécules de l'ordre de la petite protéine seulement. Finalement, un vrai tournant a été opéré par la MS dans le milieu des années 80 avec le développement quasi concomitant de deux sources d'ionisation de fonctionnement très différent, la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) développé par Karas et Hillenkamp¹¹ et l'ionisation par électrospray (ESI) développé par Fenn¹² et Gall¹³. Elles sont aujourd'hui les deux techniques d'ionisation les plus utilisées en MS et elles ont elles-mêmes été à l'origine d'autres sources d'ions.

Plus récemment, une nouvelle catégorie de sources est apparue avec les sources fonctionnant à pression atmosphérique (PA). En effet, l'analyse MS conventionnelle est à basse pression, et nécessite donc l'introduction de l'échantillon dans un espace confiné où des champs électriques élevés sont appliqués et nécessite une préparation de l'échantillon. Un premier pas avait été franchi avec l'arrivée des sources à pression atmosphérique (AP-MS), comme l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) entre autres ou l'AP-MALDI. Cependant ces sources nécessitent toujours une préparation de l'échantillon. Une nouvelle étape a encore été franchie avec la Spectrométrie de masse à ionisation ambiante (AIMS).

Les AIMS ont été définis en 2006 par le Prof. R. Graham Cooks comme :

« A recent innovation in mass spectrometry is the ability to record mass spectra on ordinary samples, in their native environment, without sample preparation or prepreparation by creating ions outside the instrument »¹⁴

Cette citation peut être interprétée par la faculté d'obtenir des spectres de masse d'échantillons non traités ou minimalement modifiés dans leur environnement natif, par une ionisation de l'échantillon en phase condensée dans l'air à l'extérieur de l'instrument. Les deux premières sources ambiantes développées sont la Désorption Ionisation par ElectroNébulisation (DESI) développée par G. Cooks¹⁵ et l'analyse directe en temps réel (DART) développée par Laramee, Cody et Durst¹⁶, introduites respectivement en 2004 et en 2005. À la suite de ces deux sources AIMS de nombreuses autres technologies opérant en condition ambiante et utilisant différents mécanismes d'ionisation des analytes

ont été développées depuis. Un résumé des grandes étapes avec les grandes découvertes de sources et d'analyseurs ainsi que les prix Nobel est présenté en **Figure 1** sur la frise chronologique^a.

Aujourd'hui la MS est une technique analytique puissante et polyvalente présente dans tous les domaines comme la recherche médicale ou l'industrie pharmaceutique, l'astrophysique, l'art et l'archéologie mais également la pétrochimie ou l'agroalimentaire. Sa versatilité en fait un outil indispensable dans les laboratoires de recherche, de développement ou de contrôle qualité. Les couplages standards sont depuis quelques années mis en parallèle avec des technologies toujours plus innovantes permettant des analyses de terrain en temps-réel.

^a Pour une description de l'histoire de la spectrométrie de masse, voir « A brief History of Mass spectrometry », par Griffiths¹⁷

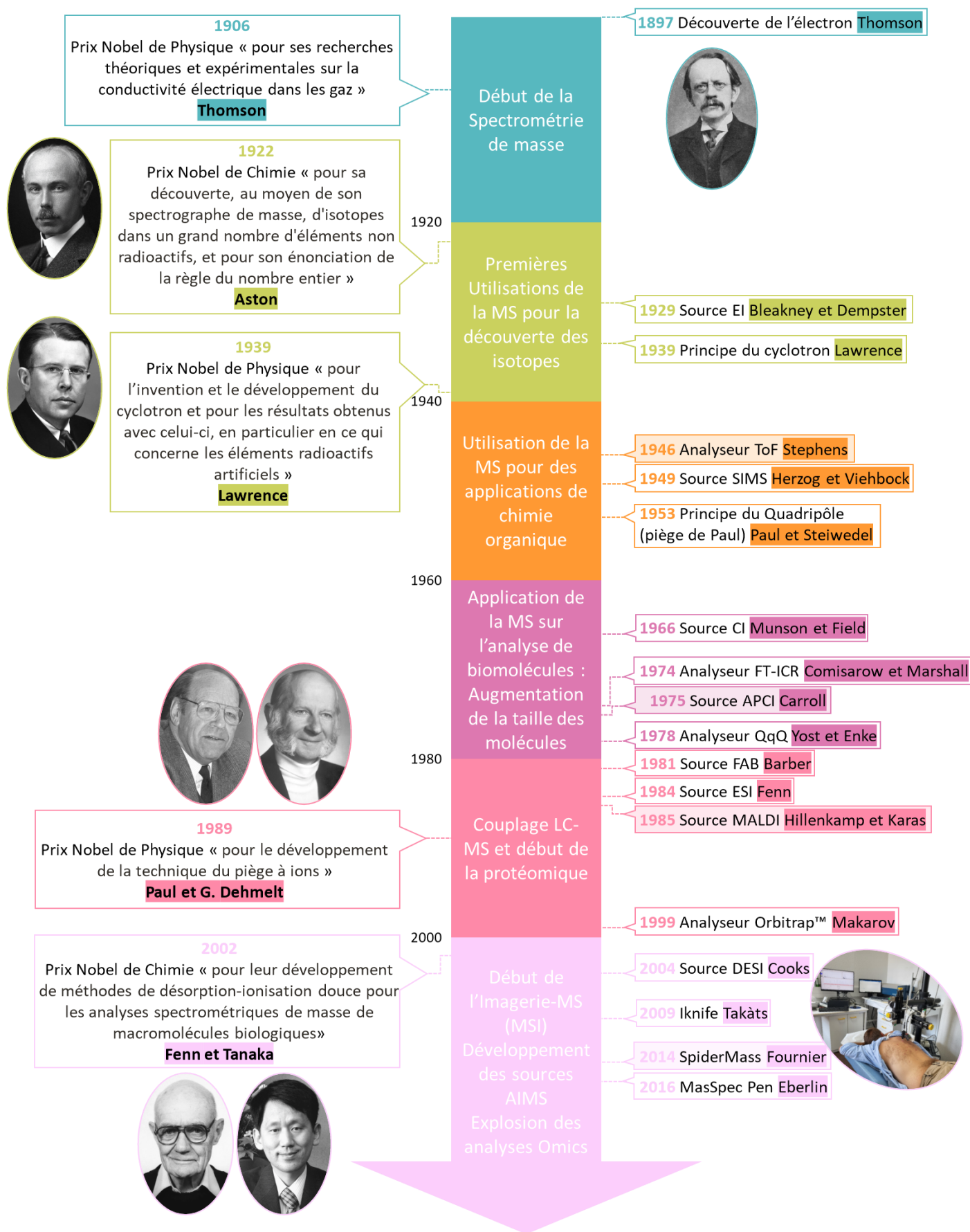


Figure 1 : Frise chronologique des principales avancées en spectrométrie de masse depuis la découverte de l'électron en 1897 par Thomson à nos jours, avec les principales sources ainsi que les principaux analyseurs développés et largement

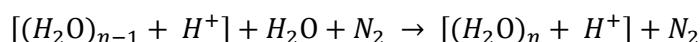
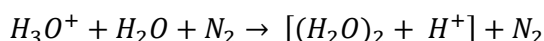
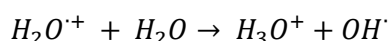
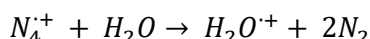
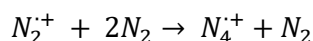
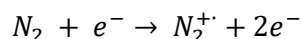
utilisé aujourd'hui. Sur la droite de frise les prix Nobel attribués à la recherche sur la spectrométrie de masse. Photos illustratives de Aston, Lawrence, Paul, Dehmelt, Fenn et Tanaka proviennent des archives de la fondation Nobel avec leur accord. APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Ionisation chimique à pression ; CI : Chemical Ionization (Ionisation Chimique) ; DESI : Desorption Electrospray Ionization (Désorption Ionisation par Électronébulisation) ; EI : Electronic Impact (Impact électronique) ; ESI : ElectroSpray Ionization (Ionisation par Électronébulisation) ; FAB : Fast Atom Bombardment (Bombardement par Atome Rapide) ; FT-ICR : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique) ; MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice) ; QqQ : Triple quadripôle ; SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires) ; ToF : Time of Flight (Analyseur à temps de vol).

4.1.2 Les sources à pression atmosphérique et les sources ambiantes

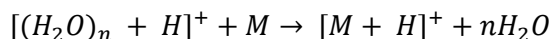
Le développement des sources AP-MS a commencé au milieu des années 1970 avec le développement de l'APCI suivi par d'autres sources utilisant des mécanismes différents et amenant aux AIMS. L'APCI est d'ailleurs toujours utilisée de nos jours et reste une source de référence pour un grand nombre d'applications.

4.1.2.1 Ionisation chimique à pression atmosphérique : APCI

L'APCI est une technique utile pour l'analyse de divers composés jusqu'à des poids moléculaires d'environ 1000 u. et de polarité intermédiaire, comme les lipides de diverses classes. Elle utilise un système de décharge corona. L'échantillon mélangé à du solvant (ou déjà dans le solvant dans le cas du couplage de chromatographie liquide avec un spectromètre de masse (LC-MS) par exemple) est introduit via un gaz nébuliseur vers l'intérieur de la source pour être vaporisé par un système de thermospray. Ce mélange de solvant et d'analytes est ensuite poussé vers une aiguille (**Figure 2**) pour être soumis à des décharges corona formant des ions primaires de type $N_2^{+\cdot}$ en mode d'ion positif ou $O_2^{-\cdot}$ pour le mode négatif. Ces ions vont ensuite réagir avec des molécules de solvant, notamment l'eau, en phase gazeuse afin de former des ions secondaires protonés de solvant¹⁸⁻²⁰. Pour le mode positif :



Finalement ces ions protonés de solvant, (e.g., H_3O^+) vont permettre l'ionisation des analytes par réaction de transfert de protons, très similairement à la CI conventionnelle :



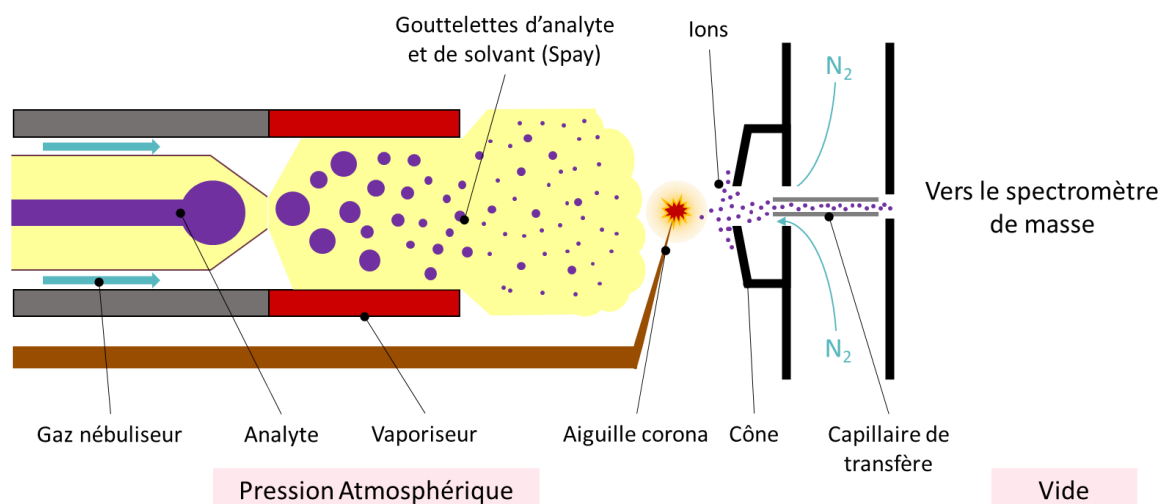
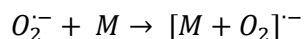
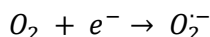


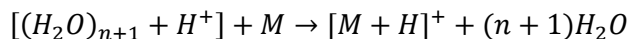
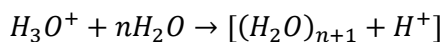
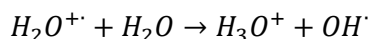
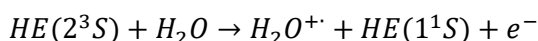
Figure 2 : Schéma d'une source APCI. L'échantillon est mélangé à du solvant puis envoyé par un gaz nébuliseur vers une aiguille corona et va être soumis à des décharges corona formant des ions qui seront ensuite aspirés vers l'intérieur du spectromètre de masse.

À la différence du mode positif, le mode négatif repose sur la présence d'oxygène, un acteur clé du processus d'ionisation. En effet, l'oxygène réagit avec les électrons générés par la décharge corona pour former des espèces réactives capables d'ioniser efficacement les molécules analysées.



4.1.2.2 Direct Analysis in Real Time : DART

La source DART est l'une des sources à ionisation ambiante les plus anciennes, introduite en 2005¹⁶. Dérivée de l'APCI, son mécanisme est basé sur la désorption et/ou ionisation par plasma. Le mécanisme d'ionisation du DART est basé sur l'interaction entre des atomes ou molécules excités, l'échantillon et le gaz atmosphérique. Plus précisément un flux de gaz chauffé généralement de l'hélium ou de l'azote traverse une chambre où une décharge électrique à aiguille corona produit des ions à l'état excités (métastables) qui vont réagir avec l'eau de l'atmosphère pour produire une espèce radicalaire qui pourra ensuite, tout comme en APCI, produire des ions H_3O^+ pour permettre ensuite un transfert de protons à l'analyte^{21,22}(Figure 3) :



Le faisceau d'ions excités est dirigé contre l'échantillon qui peut être solide ou liquide situés devant l'entrée MS afin d'ionisation et désorber les analytes. Si l'échantillon est un gaz ou des vapeurs il sera directement introduit dans la source.

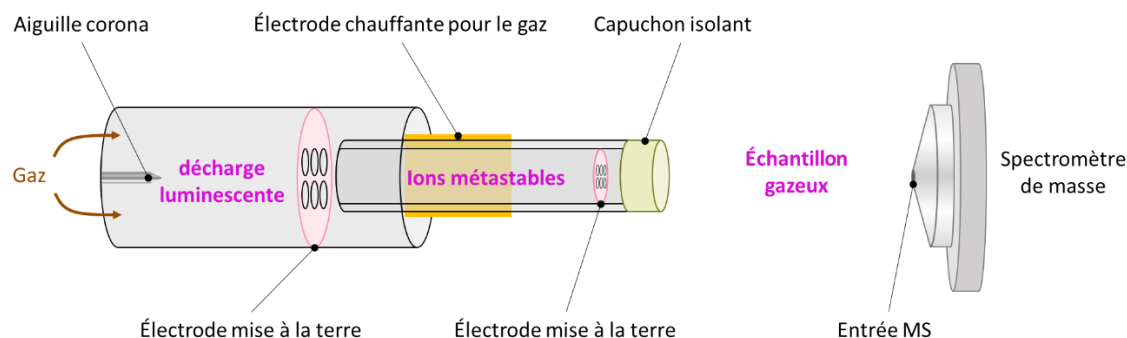


Figure 3 : Schéma d'une source d'ions DART. Un gaz chauffé traverse une décharge électrique à aiguille corona permettant son excitation. Ce gaz est ensuite transporté jusqu'à l'échantillon qui se situe juste devant l'entrée du spectromètre de masse et va l'ioniser.

Grâce à sa capacité à ioniser à pression ambiante des composés thermolabiles et peu volatils, en particulier de petites molécules organiques telles que des composés pharmaceutiques, des pesticides, des explosifs ou des métabolites alimentaires, la source DART s'est imposée comme une méthode de quantification de référence. Elle est largement utilisée non seulement dans le domaine alimentaire²³, mais aussi en criminalistique et en sciences environnementales, notamment pour la détection de traces^{24,25}.

4.1.2.3 Desorption electrospray ionization : DESI

La source DESI est la source AIMS la plus ancienne. Elle a été développée par R.G. Cooks au début des années 2000 avec une publication princeps dans Sciences en 2004¹⁵. Cependant, contrairement à la source DART, la source DESI s'inspire de la méthode d'ionisation de la source ESI et est donc une méthode d'ionisation basée sur un mécanisme d'électrospray généré par application d'une tension entre l'aiguille et la surface (0,5 à 3,5 kV typiquement). Ainsi, le DESI utilise un nébulisateur de gouttelettes de solvant chargées électriquement qui est projeté sur la surface de l'échantillon. Ainsi, le cœur du DESI est son pulvérisateur pneumatique qui est resté relativement inchangé depuis son introduction en 2004. Il est équipé de deux capillaires en silice fondue, le capillaire interne (dimensions typiques : 50 µm de diamètre interne) transportant le solvant et le capillaire extérieur (dimensions typiques : 250 µm de diamètre interne) transportant le gaz nébuliseur. Un tel système permet de diriger le flux des gouttelettes et conduit à une aire analysée d'environ 200 µm. Les gouttelettes de solvant fortement chargées (comme en ESI) atterrissent sur la surface, créent une pellicule de liquide, permettant une extraction des analytes, les gouttelettes suivantes capturant ces analytes avant de rebondir. Afin de capturer les gouttelettes chargées d'analytes, une extension particulière est ajoutée à l'entrée du spectromètre (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Une fois les gouttelettes à l'intérieur de l'instrument, le processus qui s'ensuit est similaire à celui de l'ESI avec une succession de désolvatations des gouttelettes et d'explosions coulombiennes amenant à la production d'ions d'analytes nus en phase gazeuse. Le DESI est très sensible à de nombreux paramètres, non seulement la tension sur l'aiguille comme en ESI pour générer un spray stable, mais également la distance entre l'aiguille, l'angle à la surface ainsi que le design de l'extension à l'entrée de l'instrument pour permettre une récupération efficace des gouttelettes chargées. Cette extension initialement très longue et appelée « The Magic wand » a été redésignée au cours du temps en longueur et en forme. Le DESI présente une ionisation douce, comme l'ESI, sans fragmentation des analytes. Il est possible d'analyser en DESI des molécules de haut poids moléculaire et polaires, telles que des protéines, avec des spectres d'ions multichargés similaires à l'ESI²⁶. Cependant, le DESI est principalement utilisé pour analyser des échantillons biologiques avec un minimum de préparation d'échantillon (simple coupes), et dans ces conditions, seuls les composés tels que des métabolites et lipides, ou des petits composés organiques sont observés^{27,28}. Par ailleurs, depuis longtemps le DESI présente un intérêt certain comme modalité

d'imagerie, car le sprayeur a rapidement permis, avec un minimum de modifications, d'atteindre 100 μm de résolution spatiale. Sur les dernières versions de la source commercialisée par Waters, qui en détient l'exclusivité, des images jusqu'à la cellule unique (5-10 μm de résolution spatiale) ont été obtenues²⁹⁻³¹. Cette augmentation de la résolution est devenue une évolution de la source DESI à part entière le nano-DESI (nanospray Desorption Electrospray Ionization) avec une introduction en 2010. Contrairement au DESI classique qui utilise un jet de microgouttelettes, le nano-DESI repose sur un système de double capillaire formant un minuscule pont liquide entre l'échantillon et la sonde. Cette source est particulièrement adaptée à l'analyse de surfaces hétérogènes ou fragiles, notamment en imagerie moléculaire de tissus biologiques où elle est une technique puissante pour visualiser les distributions spatiales des analytes dans les systèmes biologiques avec peu ou pas de prétraitement des échantillons³².

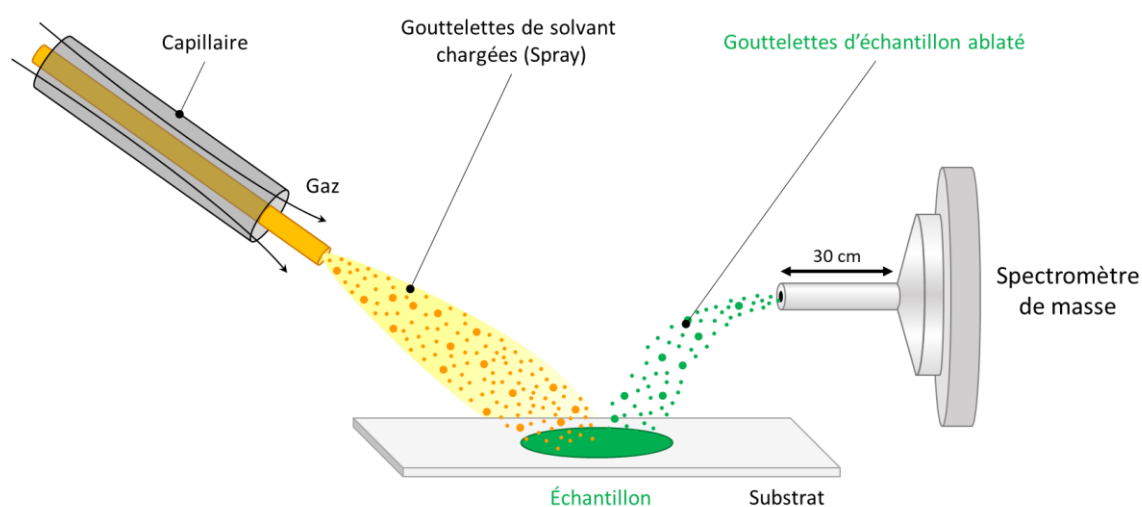


Figure 4 : Schéma d'une source DESI. Un spray de solvant composé de très fines gouttelettes électriquement chargées est projeté sur la surface de l'échantillon avec un angle spécifique. Les analytes se chargent grâce au spray et sont désorbés et aspirés ensuite par le spectromètre de masse.

4.1.2.4 Laser ablation electrospray ionization (LAESI) et Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI)

Les sources LAESI et MALDESI sont deux sources basées sur l'ablation ou la désorption / ionisation par un laser et introduites respectivement en 2007 par Vertes³³ et en 2006 par Muddiman^{34,35}. Dans les deux cas, la plume produite par le mécanisme d'ablation/désorption est capturée par un flux de gouttelettes de solvant chargées perpendiculaire à la surface, produites par ESI conventionnel. Les gouttelettes contenant les analytes entrent ensuite dans l'instrument et subissent le même processus que celui connu en ESI. Ainsi même si le laser contribue à la production d'ions par un mécanisme de désorption/ionisation, l'ESI fournit dans tous les cas une ionisation secondaire (**Figure 5**)³⁶. La source. En LAESI, aucune préparation d'échantillons n'est nécessaire et l'ablation est réalisée dans le midIR à 2,94 μm similairement à ce qui avait été proposé pour certaines source AP-MALDI³⁷. En MALDESI, une matrice MALDI est utilisée pour recréer un processus de désorption/ionisation de type MALDI. Ainsi les premières versions de MALDESI travaillaient avec un laser émettant dans l'ultraviolet (UV, 337 nm, Laser N2) et des matrices MALDI UV typiques (e.g., 2,5-DHB). Cependant, dès 2009³⁸ le MALDESI a aussi été proposé dans le moyen IR, à 2,94 μm , comme le LAESI, avec des matrices MALDI UV puis la glace comme matrice. Dans ce dernier cas, le porte échantillon est refroidi à -10°C pour permettre la formation du film de glace en surface qui joue le rôle de matrice. Ainsi, le MALDESI est une technique très proche du LAESI mais l'échantillon est dans une matrice pour favoriser l'absorption du laser par l'échantillon³⁹. En LAESI tout comme en MALDESI, la fluence du laser est ajustée pour permettre d'éviter la fragmentation

et disposer d'une source d'ionisation douce. Les deux techniques permettent de réaliser de l'imagerie avec une résolution spatiale conditionnée par la taille du faisceau laser incident. Les deux techniques ont démontré pouvoir atteindre la cellule unique pour le LAESI⁴⁰ et environ 20 μm pour le MALDESI⁴¹. Si le MALDESI a montré pouvoir produire des spectres de peptides et protéines présentant de nombreux multichargés, tout comme en ESI, le LAESI est resté très focalisé sur l'analyse des petits composés, métabolites et lipides. Les deux techniques sont principalement utilisées pour le moment pour étudier la distribution de petits composés.

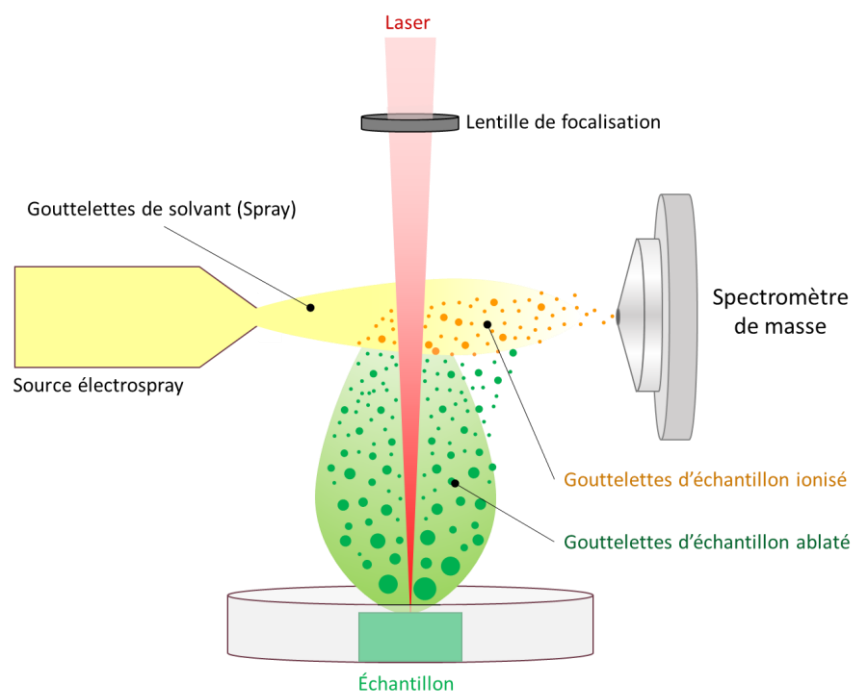


Figure 5 : Schéma d'une source LAESI ou MALDESI. Un laser placé en face de l'échantillon émet dans l'IR moyen générant des particules gazeuses de l'échantillon. Une source ESI est placée orthogonalement au laser et à l'échantillon et en face du spectromètre de masse. La source ESI permet l'ionisation des gouttelettes d'échantillon qui sont ensuite aspirées dans le spectromètre de masse.

4.1.2.5 Low-Temperature Plasma : LTP

La source Low-Temperature Plasma (LTP) est une méthode d'ionisation permettant la désorption et l'ionisation de molécules provenant d'échantillons solides, liquides ou gazeux, directement à pression ambiante. Elle repose sur un plasma froid, généré par l'application d'une décharge électrique entre deux électrodes sur un flux de gaz inerte, généralement de l'hélium ou de l'argon. Ce plasma est riche en espèces ionisées, électrons, photons et radicaux libres mais seules les espèces excitées non ionisées sortent de l'électrode et sont dirigées vers la surface de l'échantillon (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Le plasma a une température d'environ 30 °C. Cette faible température minimise les risques de dégradation thermique, rendant la LTP particulièrement adaptée à l'analyse de molécules thermosensibles. Par ailleurs, la faible température du plasma et le fait que les espèces ionisées ne soient pas envoyées sur la surface, permet d'envisager des applications *in vivo* qui ne sont pas possibles avec le DART. Les analytes de l'échantillon s'ionisent principalement par transfert de charge, suivant des mécanismes similaires au DART, avant d'être aspirés et analysés par le spectromètre de masse⁴². Le LTP est suffisamment doux pour permettre l'observation des ions intacts des analytes. Cependant, des fragmentations des molécules sont fréquemment observées. La gamme du LTP est supérieure à l'EI ou la CI, et permet l'ionisation de composés de polarité intermédiaire, lui conférant une certaine versatilité en matière d'application. Dans le cas de l'analyse de surface, le plasma permet à la fois la désorption puis l'ionisation des espèces. Le LTP a été principalement utilisé dans l'analyse de molécules en bioanalyse, en pharmacie, en criminalistique ou en sécurité alimentaire⁴³⁻⁴⁵. Il présente également un intérêt pour l'analyse des composés organiques volatils et les utilisations *in vivo*⁴⁶.

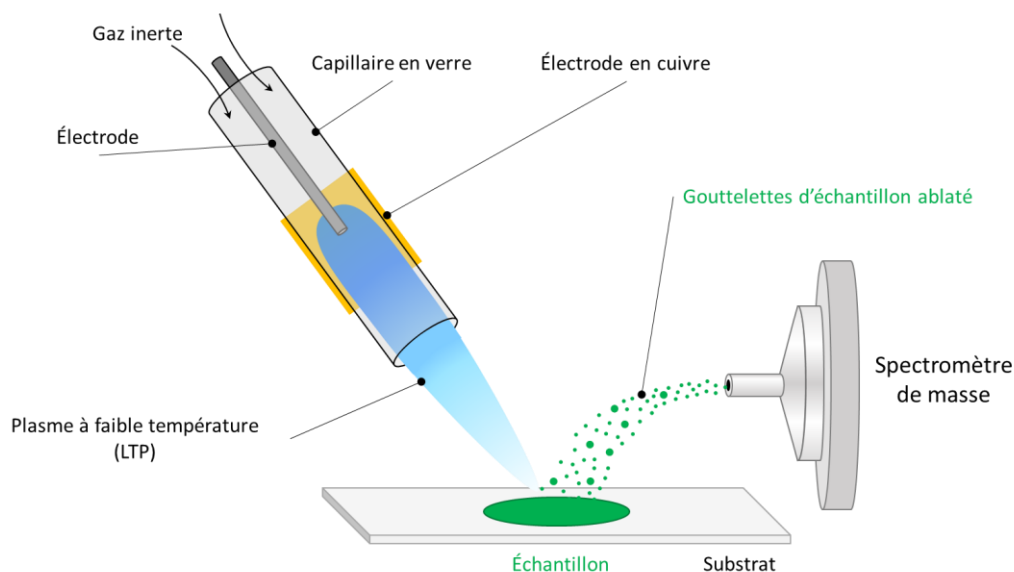


Figure 6 : Schéma d'une source LTP. Un tube en verre avec deux électrodes applique une décharge à un gaz inerte entraînant la formation d'un plasma froid. Ce plasma va ioniser un échantillon et les molécules chargées seront ensuite aspirées par le spectromètre de masse.

4.1.3 Les sources pour les analyses *in vivo*

L'essor des AIMS ont rapproché la MS de l'analyse *in situ* d'organismes vivants comme la détection de pesticides dans les plantes et même la détection directe de résidus de drogues, de fumée ou de poudre à canon dans des échantillons de peau. Même si les applications restent compliquées, il a été montré la possibilité d'utiliser certaines de ces sources comme le DESI ou le LAESI pour l'analyse de plantes *in-vivo*⁴⁷⁻⁴⁹ ou même le DESI pour l'analyse sur les doigts pour détecter, par exemple, la présence d'un médicament administré à la personne⁵⁰. Dans ces conditions, la formation des ions est le plus souvent fait par bombardement de l'échantillon par un faisceau/flux incident. Cependant, ces sources présentent des limitations pour l'utilisation *in-vivo*. En DESI, les contraintes géométriques ainsi que l'application de la tension sur le capillaire de spray limitent l'applicabilité de la technologie chez l'homme ou les animaux, même si un design de source avait été proposé pour l'*in-vivo*⁵¹. Similairement la géométrie des sources LAESI/MALDESI n'est pas compatible avec leur utilisation pour ces mêmes applications. La transposition de la MS à l'analyse chez l'homme en particulier a nécessité différents développements, amenant le développement de nouvelles sources ambiantes. L'essor de ces technologies a été poussé par la volonté de développer la MS comme un outil pour le suivi des interventions au bloc opératoire.

4.1.3.1 L'iKnife

En 2009, Takàts et al. ont développé le premier système d'analyse *in vivo* pour le bloc opératoire, l'iKnife⁵². Cette technologie innovante combine un bistouri électrique chirurgical et un spectromètre de masse. La production des ions repose sur un mécanisme nommé « Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry » (REIMS) où l'évaporation rapide provoquée par le bistouri électrique conduit à la production d'ions en phase gazeuse lorsque ce dernier entre en contact avec le tissu biologique, par l'intermédiaire d'un courant électrique à haute fréquence qui permet l'ablation. Ces ions sont ensuite acheminés jusqu'au spectromètre en passant par l'interface REIMS via un tube souple de faible diamètre, à l'aide d'une pompe Venturi alimentée par de l'azote (Figure 7)^{53,54}. La technologie a été baptisée iKnife. Au fil du temps, l'iKnife s'est révélé compatible avec les outils chirurgicaux courants tels que les électrodes électrochirurgicales, les instruments de diathermie, les pinces bipolaires et les aspirateurs chirurgicaux à ultrasons cavitron. L'iKnife est actuellement développé par Waters et

actuellement le REIMS ne fait plus référence au processus de production d'ions via l'outil chirurgical mais à l'interface qui est attachée à l'avant du spectromètre et qui permet de pré-traiter l'aérosol transmis via un ruban de kanthal chauffé à environ 800°C. Ce pré-traitement permet d'éviter un encrassement trop important de l'instrument et peut conduire à une post-ionisation permettant d'augmenter la sensibilité de la technique. Cependant, cette méthode est intrusive, car elle utilise les fumées produites lors de l'intervention via des instruments utilisés pour couper les tissus, ce qui entraîne la destruction complète de l'échantillon. Par ailleurs, l'analyse est limitée aux molécules de faible poids moléculaire, comme les métabolites et les lipides, et ne peut s'effectuer qu'en mode négatif. Malgré ces limitations, différentes études cliniques réalisées à l'aide du iKnife ont montré l'intérêt de la MS pour la chirurgie, notamment dans l'oncologie^{55,56}.

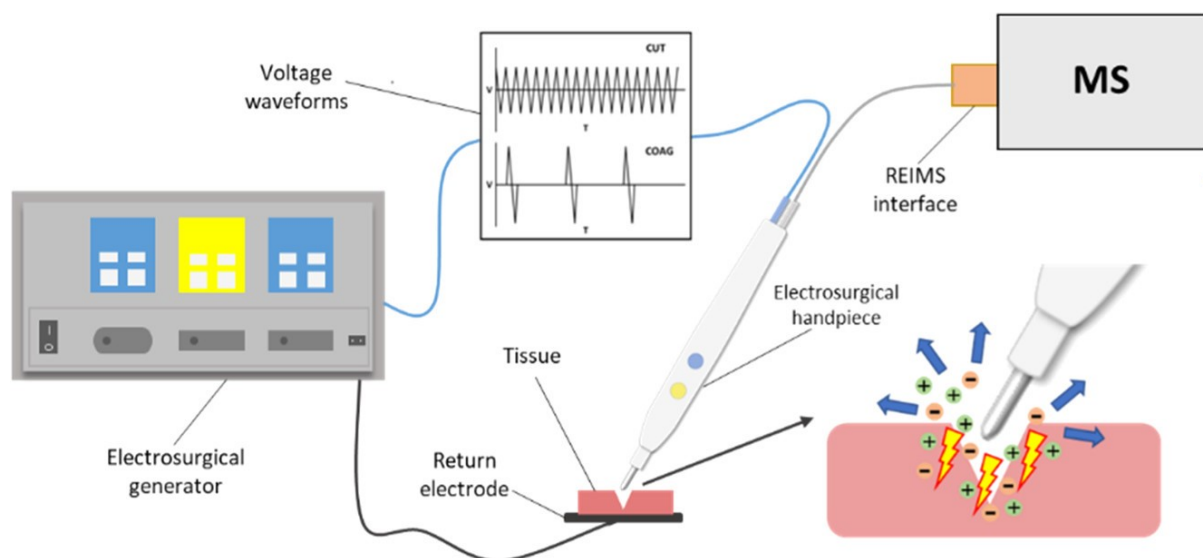


Figure 7 : L'iKnife utilise un scalpel chirurgical qui va au contact avec le tissu produire des fumées et créer des ions qui sont aspirés vers le spectromètre de masse via un tube en Teflon en passant par l'interface REIMS. Adapté de Manoli et al.⁵⁷ sous CC BY-4.0. MS : Mass spectrometer (Spectromètre de masse) ; REIMS : Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry.

4.1.3.2 Le SpiderMass

Le SpiderMass est une seconde source AIMS développée pour les analyses *in-vivo* chez l'homme. Elle a été développée à partir de 2012 au laboratoire PRISM et cette technologie d'analyse des tissus biologiques a été brevetée en 2014⁵⁸. Si la technologie a été développée pour l'analyse au bloc opératoire son principe la rend versatile et utilisable dans beaucoup de contextes. En effet, la technologie est micro-invasive et utilise une sonde laser. Dans son principe elle est très différente de la technologie iKnife puisqu'elle met en œuvre une désorption/ionisation similaire au MALDI en utilisant l'eau des tissus biologiques comme matrice MALDI. En effet, le SpiderMass utilise un laser IR nanoseconde émettant à 2940 nm afin de réaliser une excitation résonnante des molécules d'eau en ciblant la bande d'absorption la plus intense (correspondant au stretching de la liaison O-H). Ceci la rapproche plus de la source LAESI qui utilise elle aussi un laser IR incident. Grâce à la forte absorption de l'eau à cette longueur d'onde et à la durée d'impulsion nanoseconde qui limite les effets thermiques, la pénétration du faisceau dans les tissus reste très limitée, rendant ainsi la technologie micro-invasive. Le système est donc utilisable chez l'homme car il est indolore et le laser ne laisse qu'une trace blanche de déshydratation à la surface des tissus, qui disparaît dans les minutes qui suivent l'expérience. Le mécanisme impliqué dans la technologie SpiderMass a été baptisée WALDI et correspond à un mécanisme de désorption/ionisation. La plume générée dans ce mécanisme est ensuite acheminée vers le spectromètre de masse via un tube de transfert, simplement constitué d'un tube de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou de Tygon, d'un diamètre de moins de 3 mm et dont la longueur peut varier de 1 à plusieurs mètres⁵⁹. Le transfert est assuré simplement par la différence de pression entre

l'intérieur du spectromètre et la pression ambiante créant une dépression dans le tube suffisante pour aspirer la plume et la remonter à l'entrée du spectromètre (**Figure 8**). Au cours des développements, il a été montré l'intérêt de positionner une interface dédiée, en lieu et place de la source ESI habituelle, à l'entrée du spectromètre. Cette interface permet de préparer l'aérosol pour éviter un encrassement trop important du spectromètre mais il permet également de désolvater les agrégats provenant de la plume qui sont transportés et de libérer des charges supplémentaires, augmentant ainsi la sensibilité de la technologie. Plusieurs interfaces reposant sur des principes différents ont été utilisées ou développées par le laboratoire PRISM en fonction des équipements et des besoins analytiques. L'une de ces interfaces a été développée pour le prototype SpiderMass installé à Toulouse et cette interface sera présentée plus en détail dans la suite de ce manuscrit. Le SpiderMass permet l'analyse des métabolites et lipides en mode ion positif aussi bien que négatif. Cependant, il a été montré que des protéines pouvaient être analysées avec la technologie et que les spectres obtenus présentaient un profil d'état de charge similaire à l'ESI⁶⁰. Enfin, outre sa micro-invasivité le SpiderMass présente l'avantage de ne pas nécessiter de mise en contact entre la sonde (laser) et le tissu. Cette particularité lui permet d'être adaptée pour réaliser de l'imagerie. La force de la technologie a été démontrée dans plusieurs études *ex-vivo* à partir de tissus de cancer ou sur des cellules en culture⁶¹⁻⁶³, et une première preuve de concept *in-vivo* a été réalisée au bloc vétérinaire chez des patients chiens présentant un sarcome⁶⁴.

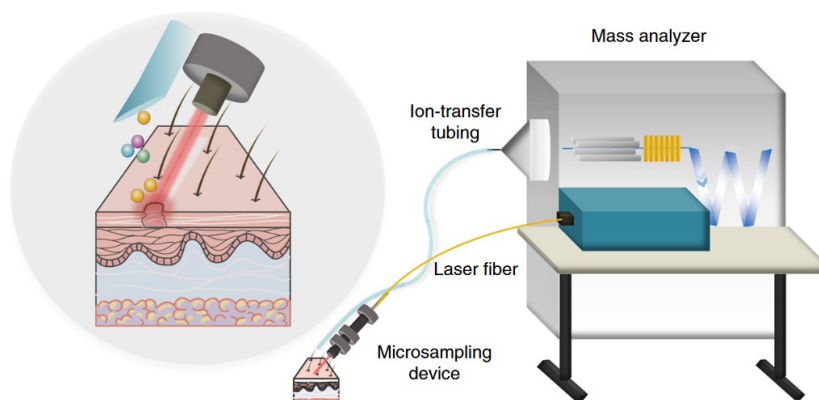


Figure 8 : SpiderMass utilise un laser IR nanoseconde émettant à 2940 nm ce qui lui assure une faible pénétration et une excitation des molécules d'eau du tissu. L'excitation est ensuite transférée aux molécules environnantes, créant un aérosol qui sera acheminé vers un spectromètre de masse via un tube de transfert. Adapté de Ogrinc et al.⁵⁹ sous CC BY-4.0.

4.1.3.3 Le MasSpec Pen

La dernière technologie AIMS d'analyse *in-vivo* développée est le MasSpec Pen, technologie développée par L. Eberlin et introduite en 2016⁶⁵. Ce dispositif est conçu pour ressembler à un stylo (**Figure 9 a**) et fonctionne en mettant en contact une goutte d'eau avec l'échantillon à analyser pendant quelques secondes afin d'extraire les analytes de la surface du tissu (**Figure 9 b**). La goutte est ensuite aspirée à travers un tube en PTFE jusqu'au spectromètre de masse pour analyse. Dans le cas du MasSpec Pen les ions sont formés à l'entrée du spectromètre de masse via une source développée à cet effet. Cette technologie basée sur une méthode d'extraction liquide/solide présente l'avantage d'être aussi non-invasive. Cependant, la technologie possède certaines limitations dont l'usage exclusif de solvants biocompatibles comme l'eau restreint ce qui l'analyse aux molécules polaires et augmente le risque de contamination du système. De plus, la pointe de la sonde, est en contact direct avec le tissu, et doit être remplacée ou nettoyée par rinçage automatique après chaque utilisation. Enfin le transfert d'un liquide au spectromètre via le tube de transfert est plus long dans le cas d'un liquide et peut amener à des effets de carry over entre les expériences. Malgré ces contraintes, le MasSpec Pen a été utilisé avec succès pour l'analyse *ex-vivo* de tissus ovariens et des études *in-vivo* sur modèle murin⁶⁵⁻⁶⁷.

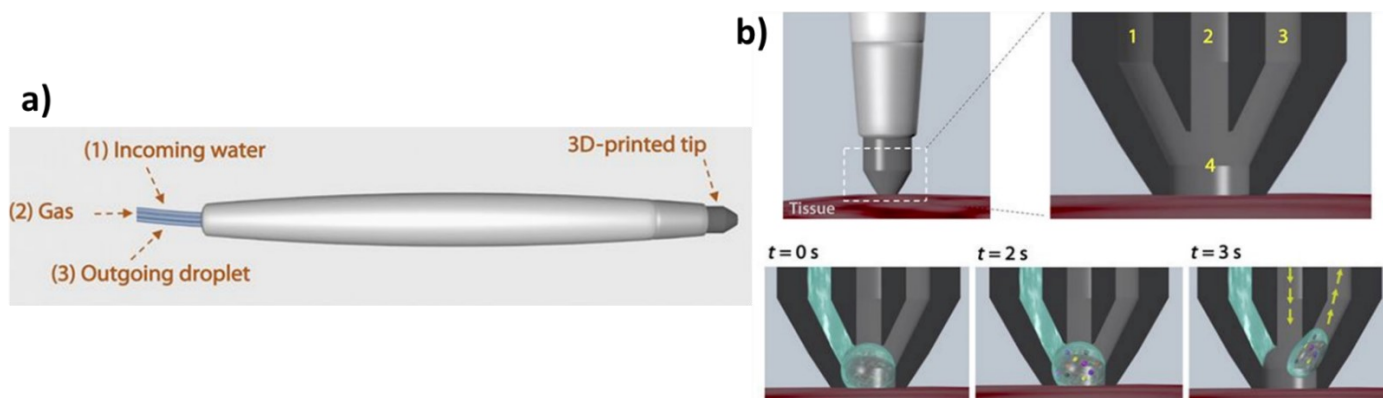


Figure 9 : a) Le MasSpec Pen est conçu avec une pointe imprimée en polydiméthylsiloxane (PDMS) et trois conduits, qui fournissent l'eau entrante (1) et le gaz (2) à la pointe et un conduit sortant pour la goutte d'eau (3). b) La pointe entre en contact avec le tissu permettant de mettre en contact l'eau arrivant en (1) avec le tissu. Après 3 s d'extraction, les conduits de vide et de gaz sont ouverts simultanément afin de transporter la goutte jusqu'au spectromètre de masse. Adapté de Zhang et al.⁶⁵, reproduit avec l'autorisation de l'AAAS.

4.1.4 La métabolomique et la lipidomique

Les métabolites sont des molécules essentielles présentes dans tous les organismes vivants. Ils interviennent dans de nombreuses réactions biochimiques, jouant un rôle clé dans les processus physiologiques. Certains métabolites sont indispensables à la croissance et au développement, tandis que d'autres, participent à des fonctions spécifiques comme la défense ou la communication cellulaire⁶⁸. L'ensemble des métabolites, formant le métabolome, comprend à la fois des composés produits par l'organisme (endogènes) et ceux issus de sources externes comme les micro-organismes ou les xénobiotiques⁶⁹. Aujourd'hui, on distingue deux grandes catégories de métabolites, la fraction hydrosoluble, regroupant les molécules traditionnellement désignées comme métabolites et la fraction insoluble dans l'eau, constituée des lipides, qui forment le lipidome⁷⁰. Les lipides sont des biomolécules hydrophobes ou amphiphiles composées principalement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils remplissent des fonctions essentielles dans l'organisme, notamment en tant que constituants des membranes cellulaires, réserves énergétiques et médiateurs biologiques.

Avec l'essor de la spectrométrie de masse, l'analyse des biomolécules s'est considérablement développée. Initialement axée sur la protéomique, elle s'est élargie depuis les années 1990 pour inclure l'étude des métabolites et des lipides, donnant naissance à la métabolomique et à la lipidomique. Ces disciplines sont aujourd'hui largement utilisées en biomédecine, pharmacologie et contrôle qualité⁷¹⁻⁷³, car elles permettent de caractériser des signatures moléculaires et d'identifier des biomarqueurs essentiels pour le diagnostic précoce et le suivi des traitements thérapeutiques. Toutefois, l'analyse à grande échelle des métabolites et des lipides présente des défis spécifiques, notamment en ce qui concerne la disponibilité et la structuration des bases de données. Contrairement aux protéines, dont les structures peuvent être déduites des séquences génétiques, les métabolites et lipides ne suivent pas une telle relation directe, rendant leur annotation plus complexe. De ce fait, les banques de données dédiées à la métabolomique et à la lipidomique se sont développées plus tardivement, et continue encore de se développer et de grossir (banque de données métabolomique : HMDB (Human Metabolome Database), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et banques de données lipidomique : LipidMaps). En métabolomique, les approches actuelles restent souvent des analyses ciblées à large échelle, reposant sur des chimiothèques de référence permettant d'identifier les composés d'intérêt au sein de matrices biologiques complexes.

De par sa sensibilité, sa rapidité et sa versatilité la spectrométrie de masse est particulièrement prisée dans ces analyses. Couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ou à la LC-MS, elle permet une analyse fine des échantillons complexes. D'autres approches, comme l'imagerie MS ou la lipidomique shotgun⁷⁴, offrent des alternatives complémentaires pour l'étude des lipides et des métabolites. Ces techniques s'appuient sur des stratégies avancées, notamment la fragmentation moléculaire et la mobilité ionique, pour identifier et annoter les composés présents^{75,76}. Cependant, ces méthodes sont principalement adaptées à l'analyse d'échantillons extraits, ou *ex-vivo* avec l'imagerie dans le meilleur des cas, et ne permettent pas encore une exploration *in-vivo* des processus métaboliques.

4.2 Structure et fonctions de la peau

Située à l'interface entre l'organisme et le milieu environnant, la peau et plus précisément sa partie la plus superficielle, l'épiderme, constitue d'abord une barrière physique qui protège l'organisme contre les agressions et les infections venant de l'environnement en empêchant la pénétration d'éléments dangereux, chimiques ou microbiens⁷⁷. La peau est une barrière souple capable d'offrir détection, régulation, protection et d'influer sur l'immunité. Elle est en effet dotée de capacités d'adaptation qui lui permettent de répondre à des perturbations extérieures telles que des troubles de l'équilibre du microbiote ou une forte exposition au soleil (rayonnements UV). D'abord considérée comme un organe immobile et inerte, elle est aujourd'hui perçue comme dynamique et complexe où de nombreuses interactions ont lieu. Cette complexité est un facteur important à prendre en compte surtout quand on sait que la peau est le deuxième organe du corps humain en surface, situé juste après la surface de l'intestin grêle, sa surface chez l'adulte varie de 1,5 à 2 m². Tout cela pour un poids pouvant aller jusqu'à 3 kg. Enfin son épaisseur varie en fonction de la zone mais également de l'âge.

La peau est organisée en trois parties avec des fonctions différentes. On retrouve l'épiderme au-dessus du derme et de l'hypoderme. (**Figure 10**).

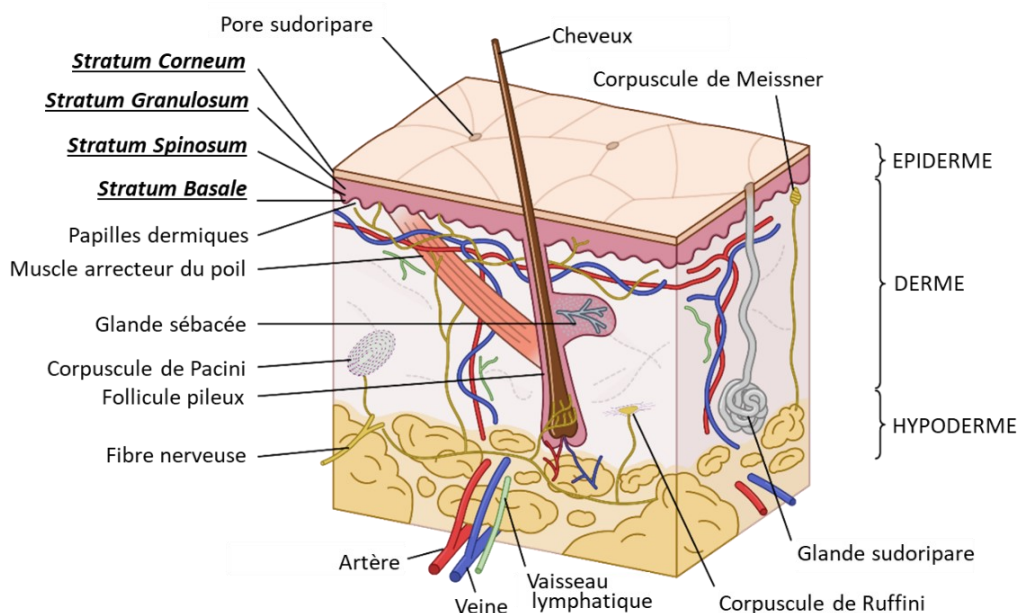


Figure 10 : Schéma de la structure de la peau humaine. Couche la plus superficielle, l'épiderme est constitué de strates : le stratum corneum (SC), granulosum, spinosum et basale ainsi que des poils et des glandes. Le derme, juste en dessous, contient les vaisseaux et les corpuscules sensoriels et est constitué de la zone papillaire au-dessus de la zone réticulaire. L'hypoderme contient l'ensemble des plexus artério-veineux profonds et la graisse sous-cutanée. Adapté de "Human Skin Structure" par Tomáš Keibert, sous CC BY-SA 4.0.

4.2.1 L'épiderme

L'épiderme est la partie la plus superficielle de la peau, elle-même constituée de plusieurs couches distinctes (de la plus externe à la plus interne) : *Stratum corneum* (couche cornée, SC), *stratum granulosum*, *stratum spinosum* et le *stratum basale* qui est directement en contact avec le derme. L'épiderme a une épaisseur d'environ 100 µm, qui varie en fonction de la région du corps ainsi que de l'âge. Bien qu'il soit dépourvu de vaisseaux sanguins, l'épiderme possède plusieurs fonctions dont la principale est la fonction barrière.

L'épiderme est constitué des kératinocytes, des cellules de Merkel (cellules sensorielles), des mélanocytes et des cellules de Langerhans (cellules immunitaires). Les kératinocytes sont produits au niveau du *stratum basale* et sont poussées en direction de la surface, sur leur chemin elles collectent la mélanine produite par les mélanocytes et produisent la matrice extracellulaire constituée de protéines structurales telles que les kératines et la filaggrine (FLG) et de lipides lamellaires, principalement des sphingolipides (SPs), créant une organisation de type « brick and mortar »⁷⁸ au niveau du SC. À la fin de leur migration ils perdent finalement leur noyau et meurent dans la partie supérieure, formant le SC.

Les protéines structurales fibreuses telle que les kératines, participent à ce schéma organisationnel, elles permettent de protéger les cellules épithéliales des stress mécaniques et non mécaniques que la peau rencontre. La deuxième protéine structurale principalement présente dans la peau est la FLG qui possède plusieurs rôles dont un rôle structural et un rôle biochimique. En effet elle va promouvoir l'agrégation des kératines et donc la formation de la matrice fibreuse et elle est progressivement dégradée par des protéases afin de libérer des acides aminés qui seront ensuite pour certains transformés en dérivés tels que l'acide trans-urocanique et l'acide pyroglutamique, qui peuvent être fortement hygroscopiques. Tous deux forment le Natural Moisturizing Factors (NMF) qui régule l'hydratation de la peau en conservant l'intégrité de la barrière épidermique ainsi que le pH. Les deuxièmes constituants de l'organisation du SC, correspondant à la partie « mortar » sont les lipides, qui constituent une partie importante du SC. Sécrétés par les kératinocytes, ils sont principalement constitués de Cer, de cholestérol et d'acides gras libres. Les Cer sont le constituant lipidique majeur du SC puisqu'ils représentent environ 50% de la masse lipidique de cette couche⁷⁹.

La mécanistique de l'épiderme est régie par plusieurs fonctions dont la mise en place de plusieurs gradients physiologiques considérés comme fonctionnellement importants pour le maintien d'une bonne fonction barrière. Entre le *stratum basal* et le SC la teneur en eau diminue fortement, passant de 70% à 15% à la jonction du SC, cela étant dû à l'augmentation de la proportion de lipide à cette jonction qui permet de retenir l'eau dans la peau. Enfin, le SC contient un grand nombre d'acides gras libres dont la tête polaire acide contribue à abaisser le pH cutané. Cet environnement acide est essentiel au contrôle de la population bactérienne de surface. Par ailleurs, un gradient de calcium (Ca^{2+}) se forme au sein du SC, favorisant son accumulation et induisant la différenciation kératinocytes^{80,81}.

La troisième fonction essentielle de l'épiderme est son rôle immunologique, assuré par des mécanismes innés et adaptatifs. L'immunité innée repose sur des barrières physicochimiques telles que la desquamation, la transpiration, un pH acide et une faible disponibilité en nutriments à la surface de la peau. Dans plusieurs affections cutanées, comme l'acné, la DA et le Pso, cette protection est altérée par une augmentation du pH cutané^{82,83}.

Enfin l'épiderme possède des fonctions endocrines. Pour la fonction endocrine l'épiderme est le seul site de production de la vitamine D3 par transformation du 7-déhydrocholestérol (provitamine D3) en prévitamine D3 et par isomérisation de cette dernière en vitamine D3 par les kératinocytes sous l'action des UV-B. Les micro-organismes cutanés tels que les acariens, les champignons, les virus et les

bactéries en collaboration avec les cellules immunitaires et les kératinocytes, participent au bon fonctionnement de la barrière cutanée⁸⁴. Certaines bactéries comme *Staphylococcus epidermidis* traduit d'une plus grande diversité microbienne et surtout participe à la production de peptides antimicrobiens (AMP) par les kératinocytes contribuant à l'immunité innée de la peau. Ces interactions contribuent à l'équilibre du microbiote cutané et au bon fonctionnement de la barrière cutanée⁸⁵. Pour la partie exocrine elle se fait dans le derme mais l'épiderme est le lieu d'excrétion de la sueur et du sébum, qui assure la souplesse et la lubrification de la peau.

4.2.2 Le derme

Le derme se situe juste sous l'épiderme et est constitué de deux couches : *Derma papilla* en contact étroit avec l'épiderme et composé de tissu conjonctif lâche et le derme réticulaire plus épais est composé d'un tissu conjonctif dense constitué principalement de fibres de collagène. Le derme est principalement composé de fibres de collagène, d'élastine et de fibronectine. Contrairement à l'épiderme le derme possède un large réseau de capillaires sanguins qui assurent la nutrition de la peau et le contrôle de la température corporelle. Le derme permet également l'envoi d'information au cerveau sur la pression (corpuscules de Pacinian et de Meissner) et sur le toucher (corpuscules de Ruffini). Ces derniers sont principalement situés dans le derme superficiel, avec des terminaisons nerveuses pouvant s'étendre à travers l'épiderme jusqu'à la surface de la peau pour détecter la douleur, la chaleur et le froid. Enfin c'est dans l'épiderme que l'on retrouve certaines fonctions exocrines avec la sueur et le sébum qui sont sécrétés respectivement⁸⁶ par les glandes sudoripares et sébacées.

4.2.3 L'hypoderme

L'hypoderme, dernière couche de la peau, est un tissu conjonctif lâche et hautement vascularisé. Il assure la fixation de la peau aux muscles et aux os tout en jouant un rôle clé dans l'amortissement des chocs et l'isolation thermique.

4.3 Les lipides Cutanés

La couche superficielle de l'épiderme, le SC, repose sur une organisation structurale connue sous le nom de modèle « brick and mortar » (briques et mortier). Dans cette architecture, les « brick » sont représentées par les cellules cornées renforcées par des protéines abondantes telles que les kératines et la FLG. Le « mortar », quant à lui, est constitué d'une matrice lipidique lamellaire, principalement composée de Cer, de cholestérol et d'acides gras libres (FFAs)⁸⁷ (**Figure 11 a**). Ces lipides épidermiques jouent un rôle essentiel dans la fonction barrière de la peau. Ils limitent la perte insensible en eau (PIE ou TEWL en anglais) par évaporation transcutanée et contribuent à l'hydratation et à l'intégrité du SC. Au-delà de leur rôle barrière, certains lipides possèdent des propriétés antimicrobiennes. Par exemple, les bases sphingoïdes (Sphingoid base, SPBs), abondantes dans le SC⁸⁸, et l'acide sapiénique, spécifique au sébum humain⁸⁹, participent à la défense cutanée contre les agents pathogènes. Le sébum, film lipidique recouvrant la surface de la peau, est également riche en lipides, bien que sa composition diffère de celle du SC. Il contient majoritairement des glycérolipides (GLs), du squalène ainsi que des cérides (Wax ester, WE), des lipides spécifiques au sébum humain (**Figure 11 b**)).

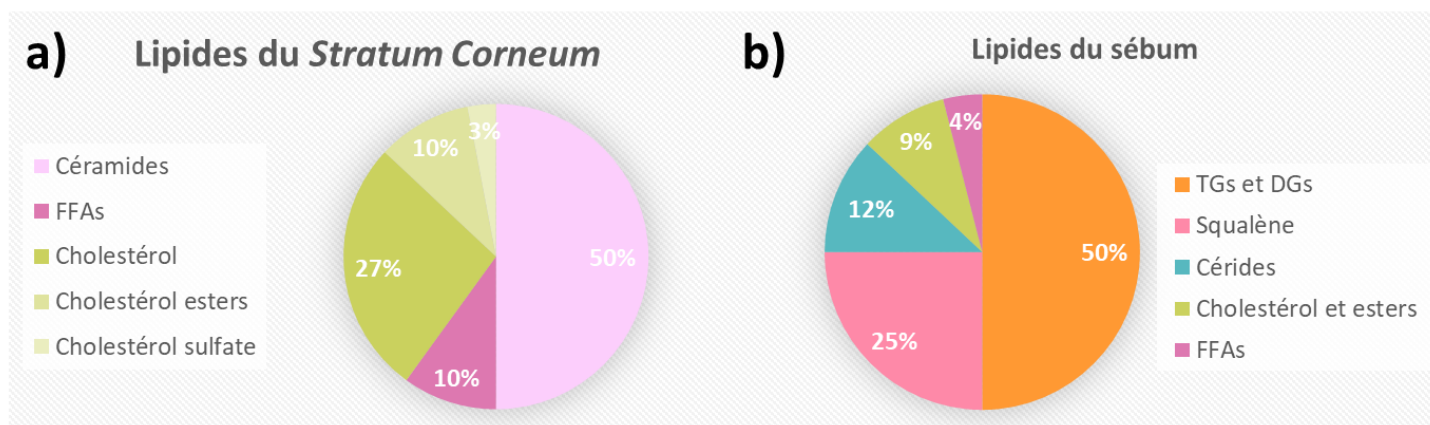
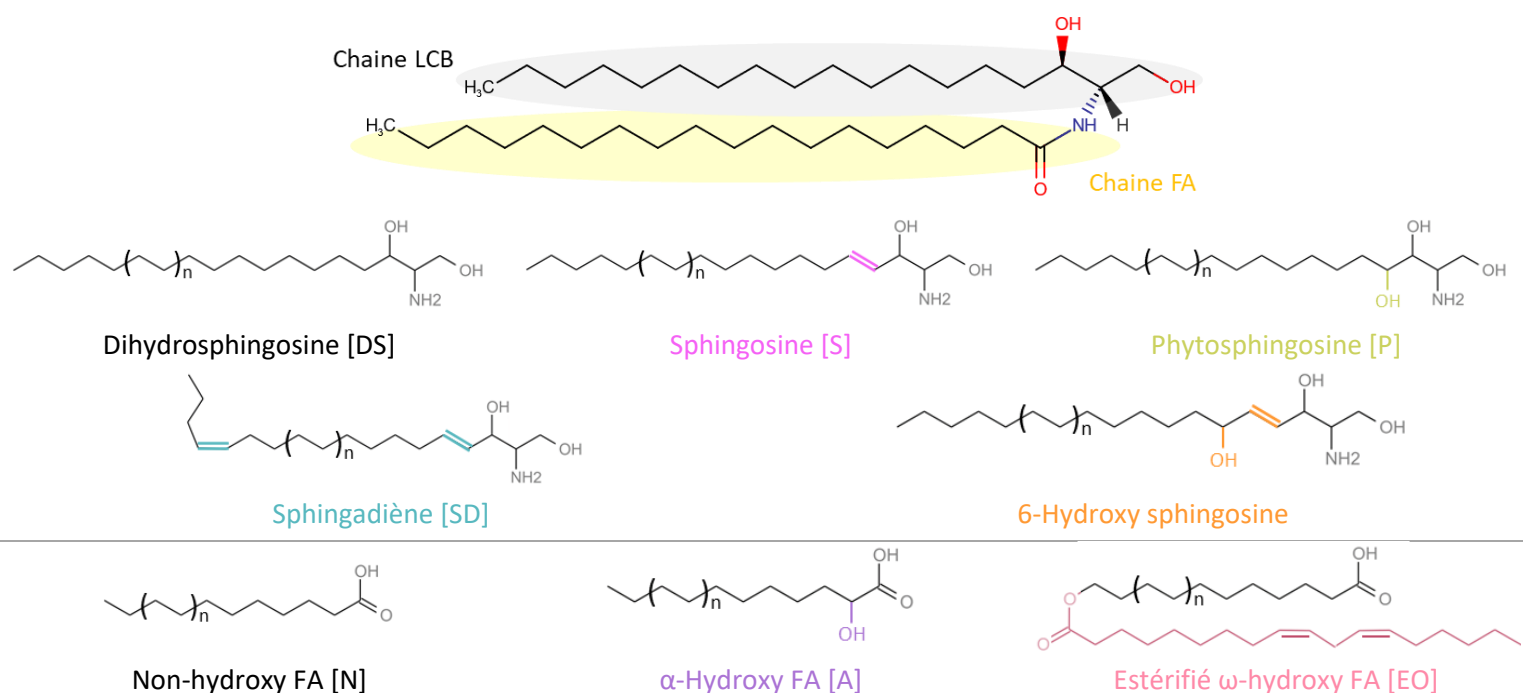


Figure 11 : a) Composition lipidique du SC sain en pourcentage de la teneur totale en lipides. La contribution en pourcentage des Cer (50 %), des acides gras libre (FFAs) (env 10 %), du cholestérol (27 %), des esters de cholestérol (10 %) et du sulfate de cholestérol (env 3 %) ; b) Composition lipidique du sébum humain en pourcentage de la teneur totale en lipides. Contribution (valeurs moyennes) des triacylglycérols et diacylglycérols (TGs et DGs) (50 %), des cérides (25 %), du squalène (12 %), des acides gras non estérifiés (NEFAs ou FFAs) (env 9 %) et de cholestérol et esters de cholestérol et de stérol (env 4 %). Inspiré de « Skin lipids in health and disease: A review » de Sophie Knox et al.⁹⁰. DGs : Diglycérides ; FFAs : Free Fatty Acids (Acides gras Libres) ; TGs : Triglycérides.

Les acides gras libres (FFAs), bien qu'ils ne représentent qu'environ 10 % des lipides du SC, jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité cutanée. À l'instar des Cer et des esters de cholestérol, ils participent à la cohésion et à la fluidité de la barrière lipidique. Parmi eux, les acides gras à très longue chaîne, en particulier le FA 24:0 et le FA 26:0, constituent près de 50 % du poids total des FFAs du SC. On les retrouve également dans le sébum, mais dans des proportions moindres. En plus de leur rôle structural, ces acides gras libres contribuent à l'acidification de la surface cutanée grâce à leur groupe carboxyle (COOH) terminal. Ce pH acide est fondamental pour l'homéostasie de la peau et la régulation du microbiome, en limitant la prolifération de pathogènes opportunistes⁹¹.

4.3.1 Les sphingolipides : acteurs principaux de la fonction barrière

Les SPs regroupent les SPB mais également tous les Cer et leurs dérivés. Comme présenté plus haut les Cer sont le principal constituant du SC et sont constitués d'une chaîne d'acides gras hydrophobes liée à une SPB contenant une amine. Dans le SC humain, les Cer sont classés en 15 sous-classes représentées en **Figure 12** : [NS], [AS], [EOS], [NP], [AP], [EOP], [NH], [AH], [EOH], [NDS], [ADS], [EODS], [NSD], [ASD] et [EOSD]. La première lettre du nom du Cer correspond aux hydroxylations ou aux estérifications que l'on peut observer sur la chaîne d'acide gras, avec [N] pour une chaîne sans hydroxylation, [A] avec une hydroxylation en position alpha et [EO] pour une estérification. Ensuite la ou les dernière(s) lettre(s) de la famille du Cer correspond(ent) à la SPB qui peut être une sphingosine [S], une dihydrophingosine [dS], une phytosphingosine [P], une 6-hydroxysphingosine [H] ou une 4,14-Sphingadiène [SD]. Cette liste est aujourd'hui non exhaustive puisque la sous-classe 4,14-sphingadiène [SD] a été observée pour la première fois en 2020 par Kawana et al.⁹².



	Dihydrosphingosine [DS]	Sphingosine [S]	Sphingadiène [SD]	Phytosphingosine [P]	6-Hydroxy sphingosine [H]
Non-Hydroxy [N]	[NDS]	[NS]	[NSD]	[NP]	[NH]
α -Hydroxy [A]	[ADS]	[AS]	[ASD]	[AP]	[AH]
Estérifié ω -Hydroxy [EO]	[EODS]	[EOS]	[EOSD]	[EOP]	[EOH]

Figure 12 : Structures et nomenclatures des classes de Cer chez les mammifères. Structures des bases sphingoides de mammifères suivi des FA constituant les Cer de mammifères. La connexion entre les LCB et le FA se fait par la fonction NH₂ de la LCB et via le OH du FA, cette réaction entraîne une perte d'eau. Tableau des nomenclatures pour les classes de Cer libres les plus courantes dans le SC. Chaque classe de Cer est représentée par une combinaison des abréviations correspondant à sa structure FA et LCB. Inspiré de Kawana et al.⁹². FA : Fatty acid (Acide Gras).

Bien que tous les Cer jouent un rôle dans le maintien de la fonction barrière, certains possèdent des propriétés biophysiques différentes comme les sphingosines (Cer[NS] et Cer[AS]) et les phytosphingosines (Cer[NP] et Cer[AP])⁹³. En effet les phytosphingosines sont connues pour avoir une fonction de capteurs d'eau et de fort maintien de la structure du SC car possédant plus de fonctions OH sur leur squelette entraînant des liaisons hydrogènes plus fortes⁹⁴⁻⁹⁶.

En ce qui concerne la longueur des chaînes carbonées, on trouve dans le SC des chaînes amines de longueur comprise entre 18 et 22 carbones et des chaînes d'acides gras plutôt entre 20 et 28 carbones même si les plus communes sont les chaînes de 24 et 26 carbones⁹⁷. Cette longueur de chaîne influe sur la perméabilité de la peau, en effet pour une même SPB la diminution des chaînes carbonées diminue le nombre d'interactions possibles avec d'autres chaînes lipidiques qui sont primordiales dans l'architecture lamellaire du SC et donc on observe une diminution de la fonction barrière.

4.3.2 Le sébum et ses lipides

Le sébum est une substance riche en lipides produite par les glandes sébacées contenant des GLs, du squalène (10-15 %) et des WE⁹⁸⁻¹⁰⁰ et ces deux derniers, ne sont actuellement caractérisés que dans le sébum. Le sébum possède une fonction d'hydratation et protège la peau en agissant comme une barrière contre tous types d'agressions extérieures. Dans de nombreuses maladies cutanées, notamment l'acné, la DA et la DS, la composition du sébum subit des changements importants¹⁰¹. Il est

inégalement réparti avec des concentrations élevées au niveau du front, du haut de la poitrine et du dos.

La sous-classe lipidique prédominante dans le sébum est celle des GLs. Ce sont des esters d'acides gras formés à partir d'un glycérol et d'une, deux ou trois chaînes d'acides gras chez les monoglycérides, diglycérides (DGs) et triglycérides (TGs) respectivement (**Figure 13a, b) et c)**). Les TGs qui sont la sous-classe la plus représentés dans le sébum peuvent être simples, ou homogène, si les trois chaînes d'acides gras sont identiques, ou mixtes, aussi appelés hétérogènes, si les trois chaînes d'acides gras diffèrent. Bien que fortement présents dans le sébum, ils constituent également un composant mineur de la matrice lipidique du SC^{74,102}. Bien que mineur, leur métabolisme influence plusieurs fonctions majeures de l'épiderme telles que la différenciation épidermique, la fonction barrière et, leur hydrolyse forme les acides gras nécessaires à la synthèse des oméga-O-acylcéramides, présents dans le SC. L'hydratation de la peau via du sébum proviens en parti des GLs et plus particulièrement des TGs¹⁰³.

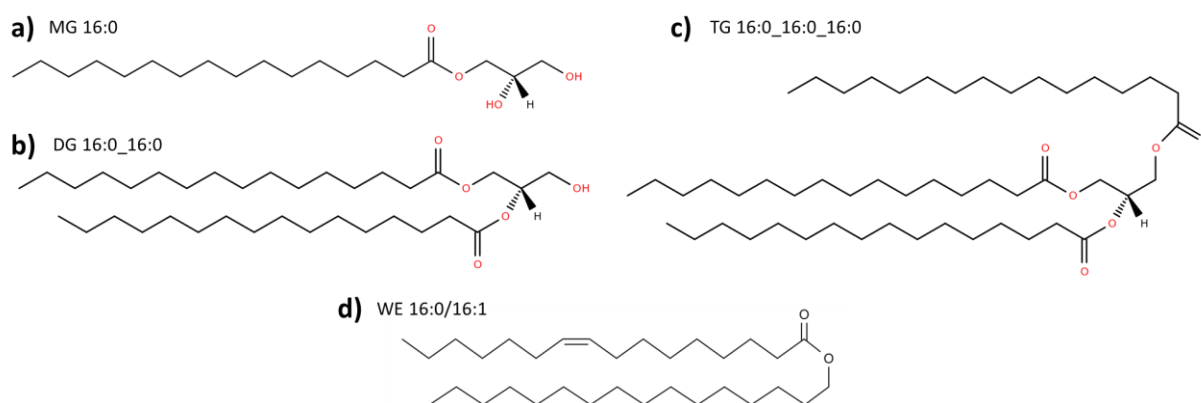


Figure 13 : Structure avec 1, 2 ou 3 acides gras C16:0 sur a) un monoglycéride (MG), b) un diglycéride (DG) et c) un triglycéride (TG) et d) structure d'un WE avec un acide gras 16 :1 estérifié à un C16:0.

Les WEs sont des lipides composés d'un acide gras estérifié à un alcool gras, dont un grand nombre est unique au sébum suggérant que les WEs sont synthétisés dans les glandes sébacées^{104,105}. La majorité de ces WEs contiennent un acide gras C16:1¹⁰⁶ (**Figure 13d)**).

L'autre lipide caractérisé uniquement dans le sébum est l'hydrocarbure polyinsaturé squalène, dont 50 à 125 mg, en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique, sont présents quotidiennement sur le visage¹⁰⁷. Il est formé par la condensation de deux molécules de pyrophosphate de farnésyle, catalysée par la squalène synthase. Le squalène est fortement impliqué dans l'activité antioxydante de la peau exposée aux UVs. En effet le squalène a la capacité de capter et de retenir une grande quantité d'oxygène, environ ¼ de son poids^{108,109}, formant des dérivés de squalène oxydé, afin de protéger l'ADN et les cellules des radicaux libres produits par les UV. Le squalène est également précurseur du cholestérol, lui-même précurseur d'hormones et de vitamines et qui est présent dans le sébum et dans le SC.

Enfin les acides gras libres sont une famille de lipides présents à la fois dans le sébum et le SC, mais avec des caractéristiques distinctes selon leur origine. De manière générale, ces acides gras contribuent à l'acidité de la peau grâce à leur fonction carboxylique, jouant ainsi un rôle clé dans la protection antimicrobienne. Certains d'entre eux possèdent des propriétés antibactériennes particulièrement marquées, comme l'acide sapiénique, un isomère de l'acide palmitoléique, qui représente plus de 20 % de la teneur totale en acides gras du sébum et est exclusivement sébacé⁹⁰.

4.3.3 Les métabolites cutanés et les vitamines

En plus des lipides, la peau contient une quantité significative de métabolites et de vitamines. Parmi ces métabolites, une super-famille essentielle se distingue, les acides aminés et leurs dérivés jouant un rôle fondamental dans la peau. L'acide pyroglutamique, un dérivé de l'acide glutamique formé à partir de la glutamine, fortement hygroscopique et l'acide trans-urocanique, issu de l'histidine, sont des dérivés d'acides aminés et composants du NMF. Ils proviennent tous deux de la dégradation d'une protéine essentielle au maintien de l'épiderme, la FLG. La FLG remplit un double rôle tout d'abord elle contribue à la structure de l'épiderme, composant majeur de la partie « brick » du SC, et à son hydratation. Lorsqu'elle se dégrade, elle libère ses dérivés acides aminés, indispensables à l'intégrité de la barrière épidermique, à l'équilibre du pH et au maintien de l'hydratation de l'épiderme¹¹⁰. Un autre dérivé d'acide aminé crucial pour la peau est la citrulline. Issue de la citrullination, une modification post-traductionnelle des résidus d'arginine par désimination, provenant également en grande partie de la dégradation de la FLG. Enfin, les acides aminés classiques jouent aussi des rôles majeurs dans la peau, certains régulent l'énergie des cellules cutanées et inflammatoires^{111,112}, d'autres stimulent la production de collagène¹¹³ ou participent à la réponse immunitaire¹¹⁴.

De nombreux autres métabolites sont présents sur la peau, enrichissant son écosystème. Parmi eux, on trouve des dérivés du tryptophane, comme les indoles, produits du métabolisme des micro-organismes cutanés^{115,116}. S'ajoutent d'autres composés issus du métabolisme bactérien ou fongique, ainsi que des molécules telles que l'histamine et les polyamines, qui jouent un rôle clé dans l'inflammation et sa régulation¹¹⁷. La peau contient également des bases azotées, des antioxydants puissants comme le glutathion, ainsi que des métabolites spécifiques tels que l'urée, autre composant du NMF.

Le cholestérol, un stérol présent à la fois dans le SC et le sébum, joue un rôle essentiel dans l'équilibre entre rigidité et fluidité du SC. Constituant environ 25 % des membranes cellulaires animales, il préserve leur intégrité et leur flexibilité, tout en jouant un rôle similaire au sein de la matrice extracellulaire, notamment dans la peau. Il régule la fluidité membranaire en augmentant la souplesse à basse température et la stabilité à haute température en s'insérant entre les Cer, renforçant ainsi la structure lamellaire et la fonction barrière de la peau. De plus, il sert de précurseur à plusieurs hormones et vitamines, dont la vitamine D.

Par ailleurs, la peau synthétise et utilise plusieurs vitamines lipidiques, dont la plus connue est la vitamine D. Cette vitamine, essentielle pour ses propriétés antioxydantes, son influence sur la fonction barrière et son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire est directement synthétisée dans la peau. Sous l'effet des rayons UV-B du soleil, le 7-déshydrocholestérol (provitamine D3) par réaction photochimique forme la prévitamine D3, qui se transforme ensuite spontanément en cholécalférol (vitamine D3). Toutefois, cette molécule n'atteint sa forme active qu'après conversion en calcidiol (25-hydroxyvitamine D3) dans le foie, puis en calcitriol (1,25-dihydroxyvitamine D3) au niveau des tissus cibles¹¹⁸. La vitamine E, n'est quant à elle pas synthétisée par le corps humain et nécessite un apport alimentaire. Elle est cependant indispensable à la peau de par ses propriétés antioxydantes importantes qui permettent une défense de la peau contre les radicaux libres (espèce réactives à l'oxygène, ROS). Principaux antioxydants de la peau, les tocophérols et principalement l'alpha-tocophérol, forme la plus active, est amené jusqu'à la peau par l'intermédiaire des lipoprotéines et stocké et étalé sur la peau par les glandes sébacées^{119,120}.

4.4 Les dermatoses

4.4.1 La Dermatitis Séborrhéique

La DS est une dermatose inflammatoire mycotique caractérisée par des plaques folliculocentriques avec une fine squame blanche et une croûte jaunâtre au niveau des zones riches en glandes sébacées telles que le cuir chevelu, le visage avec principalement la barbe, le torse et certains plis du corps¹²¹ (**Figure 14**). La DS est une pathologie chronique qui évolue en poussée. Aujourd'hui la prévalence mondiale est de 1 à 3 % de la population adolescente et adulte¹²² mais augmente tout au long de la vie, jusqu'à 14% dans les populations âgées¹²³⁻¹²⁵, et se développe préférentiellement chez les hommes. Mais elle est particulièrement connue pour sa forme infantile qui a une prévalence d'environ 70 % chez les bébés de 3 mois. Plusieurs facteurs favorisent l'apparition de cette dermatose, comme la maladie de Parkinson ou l'infection au VIH, où la DS va apparaître chez 40% au stade VIH et va même jusqu'à 80% des patients avec une forme de SIDA¹²². Aujourd'hui avec les nombreuses avancées, il est possible de proposer plusieurs mécanismes corrélés ensemble pour la pathogenèse de la DS, avec principalement une perturbation du microbiote via une prolifération accrue de *Malassezia*, déclenchant une réaction inflammatoire et donc une réponse immunitaire. On retrouve également une production de sébum augmentée et/ou modifiée ainsi que la perturbation de certains neurotransmetteurs cutanés, une desquamation anormale des kératinocytes et des troubles de la fonction barrière.

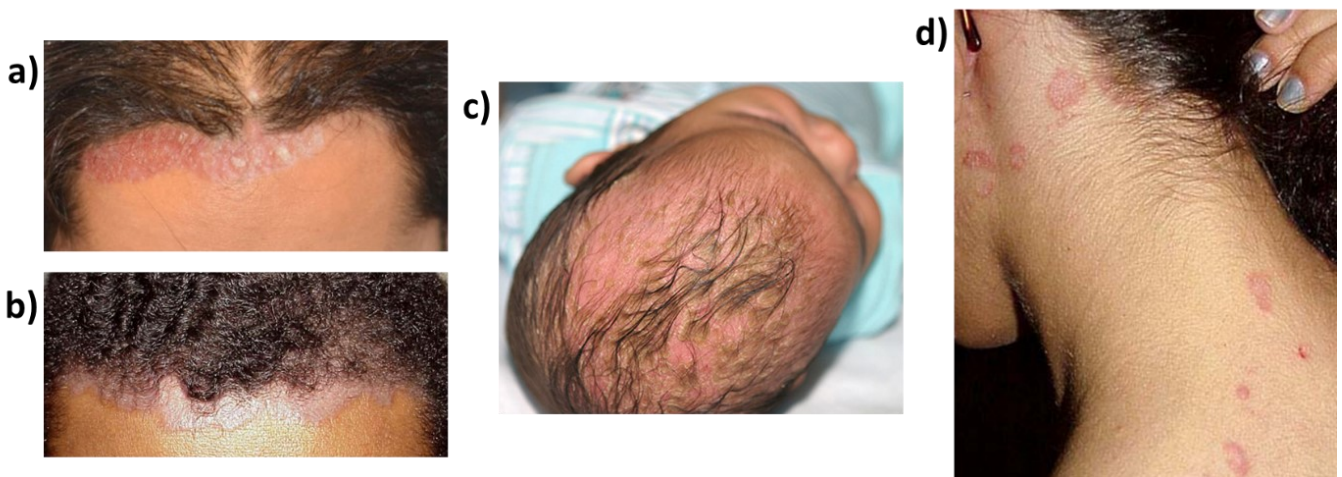


Figure 14 : Photo de patients atteints de dermatite séborrhéique (DS) . a) DS d'un adulte avec peau claire sur le bord des cheveux. b) DS d'un adulte avec peau foncée sur le bord des cheveux .c) DS du nourrisson également appelée croûtes de lait. d) DS classique de l'adulte : lésions érythémateuses du cuir chevelu qui descend dans la nuque. Photo a) par S bhimji, MD via Tucker et al. 2024 ; PMID: 31869171. b) c) & d) obtenue par Samuel Freire Da Silva et contributeurs, en accès libre via [Atlas dermatologico](#).

4.4.1.1 *Malassezia* principal facteur microbiotique de la DS et ses impacts sur les lipides cutanés

La levure *Malassezia* est une levure naturellement présente sur la peau humaine, et est le genre le plus abondant de la flore fongique cutanée. Elle est particulièrement impliquée dans la DS via sa fonction lipasique très forte. Ce mécanisme est d'autant plus important qu'elle évolue dans le sébum qui se trouve être un milieu composé principalement de lipides. Parmi ces lipides, on retrouve un grand nombre de GLs, comprenant les monoglycérols, diglycérols et TGs qui possèdent un glycérol sur lequel il est fixé respectivement 1, 2 ou 3 acides gras. Chez *Malassezia*, ses lipases sont adaptées à la dégradation des GLs^{126,127} afin de fournir à la levure une source de carbone. Cette consommation d'acides gras provenant de GLs dégradés va entraîner la libération et l'accumulation d'acides gras à

chaîne courte et insaturée (**Figure 15**). Ainsi, une diminution des GLs est observée au profit des acides gras libres insaturés à chaîne courte à la surface de la peau des patients DS, ainsi que de certains marqueurs inflammatoires tels que l'histamine ou les oxylipines^{128,129}. Cette altération lipidique du sébum à la surface de la peau entraîne une perturbation de la fonction barrière cutanée du SC, caractérisée par une modification du profil des Cer avec la diminution des Cer[P] et augmentation des Cer[S], rendant la peau plus vulnérable aux irritations et aux infections¹³⁰.

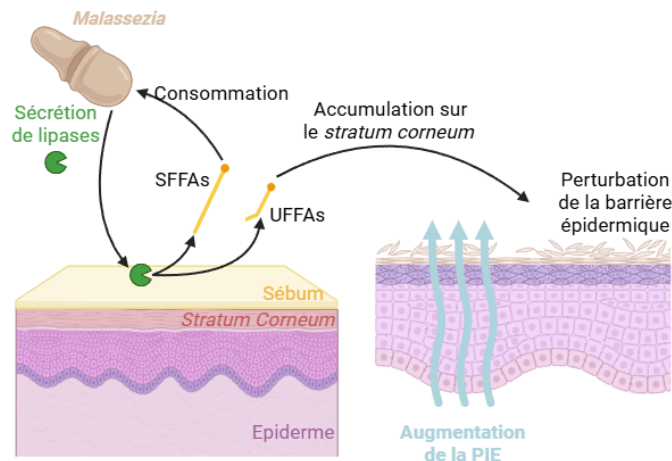


Figure 15 : Les lipases sécrétées par Malassezia décomposent les lipides du sébum du cuir chevelu, principalement les GLs (mono-, di- et triglycérides), en acides gras libres saturés et en acides gras libres insaturés. Les acides gras libres saturés sont consommés par Malassezia comme source de carbone, tandis que les acides gras libres insaturés s'accumulent sur la couche cornée. Cette accumulation entraîne une dysrégulation de la fonction barrière et un érythème de la peau. PIE : Perte d'eau transépidermique ; SFFA : Acides gras libres saturés ; UFFA : Acides gras libres insaturés. Créé avec <https://BioRender.com>

4.4.1.2 Les traitements contre la DS

L'approche varie en fonction de l'âge du patient, de la distribution de la pathologie et de sa sévérité. Une des approches les plus courantes est l'application d'antifongique local afin de réduire l'impact des dérèglements de la flore cutanée, mais lors de poussées plus sévères l'utilisation d'anti-inflammatoire chez l'adulte est ajouté. Pour les traitements du cuir chevelu il y a souvent des associations d'antifongiques, d'anti-inflammatoires ainsi que certains actifs antiprurigineux et/ou kératolytiques. Un traitement oral peut-être envisagé pour les patients avec des atteintes généralisées, avec un traitement aux propriétés antifongiques et anti-inflammatoires comme le kétoconazole, l'itraconazole et le fluconazole¹³¹. Enfin pour les personnes atteintes de VIH-SIDA et de DS le traitement antirétroviral améliore fréquemment les atteintes DS.

4.4.2 La Dermatite Atopique

La DA est également une maladie cutanée inflammatoire chronique. Elle est la principale cause mondiale de dermatose affectant jusqu'à 20 % des enfants et 10 % des adultes dans les pays développés¹³². La DA est caractérisée par une xérose (sécheresse) cutanée généralisée avec des plaques cutanées érythémateuses (rouge), lichénifiées (épaississement de la peau avec hyperpigmentation qui survient en réponse à des grattages répétés et prolongés), gonflées, humides (vésicules) et prurigineuses. Les premiers signes sont généralement observés pendant l'enfance, se manifestant dès l'âge de 3 mois, même si cette affection peut apparaître à tout moment. Le schéma de la zone affectée varie avec l'âge comme le montre la **Figure 16**. Les nourrissons présentent un érythème mal défini, largement réparti recouvrant souvent des grandes surfaces du dos. La localisation des lésions évolue légèrement autour de 8-9 mois où on les retrouve principalement sur le visage. Chez les enfants les lésions se retrouvent au niveau des fléchisseurs comme le pli du coude ou sur les genoux. Enfin chez les adolescents et les adultes les plaques lésionnelles, dominées par la xérose et les lichénifications, sont

situés souvent sur les mains, le pli du coude, les paupières et de cuir chevelu, bien qu'elles restent diffuses sur tout le corps.

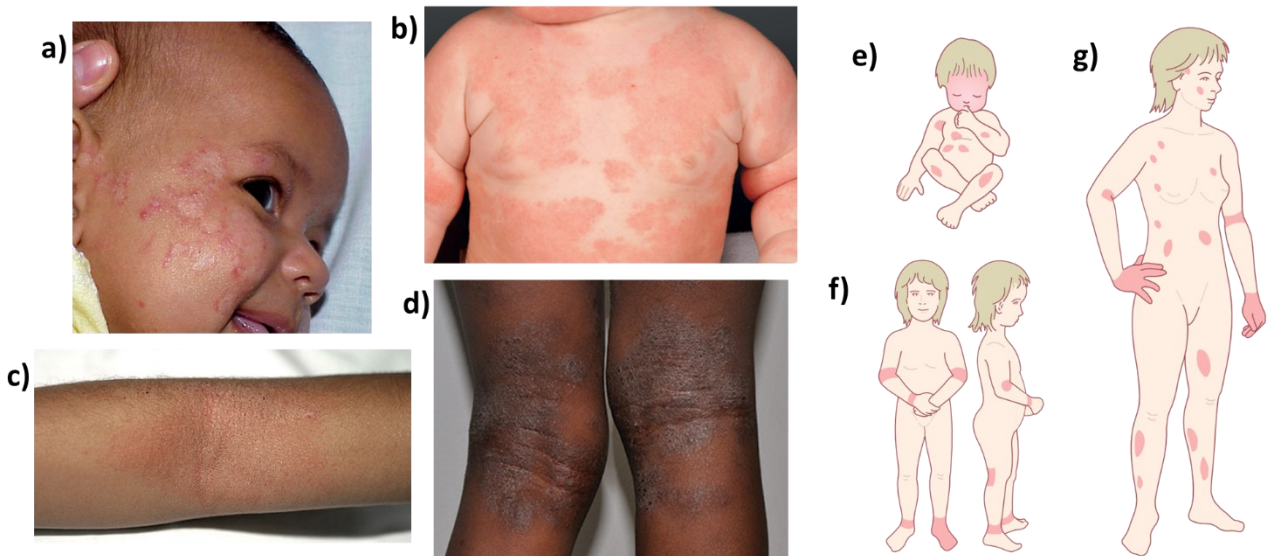


Figure 16 : Photos et illustration de la localisation des signes cliniques de la dermatite atopique. a). Photo d'un érythème sur le visage d'un nourrisson. b) Photo d'une atteinte sur le tronc d'un nourrisson. c) Photo d'une atteinte d'un adulte de type caucasien au niveau du creux du coude. d) Photo d'un adulte avec la peau foncée atteint par la DA au niveau du creux des genoux. e) Les nourrissons présentent un érythème mal défini, largement réparti, recouvrant souvent des grandes surfaces comme au niveau du visage ou du tronc. f) Chez l'enfant les lésions se retrouvent au niveau des fléchisseurs comme le pli du coude ou sur les genoux. g). Adultes les plaques lésionnelles sont situées souvent sur les mains, le pli du coude, les paupières et de cuir chevelu, bien qu'elles restent diffuses sur tout le corps. Photos a) et c) obtenue à partir de Samuel Freire Da Silva et contributeurs en accès libre via [Atlas dermatologico](#). Photos b) et d) obtenues à partir de "Atopic dermatitis" de Langan et al. avec la permission de Elsevier schémas e), f) et g) adapté de « pattern_of_atopic_eczema_varies_with_age » par Madhero88, sous licence [CC BY-SA 3.0](#) via [Wikimedia Commons](#).

La physiopathologie de la DA est complexe et implique des facteurs de prédisposition tels que le dysfonctionnement de la barrière épidermique, le dérèglement du système immunitaire et la dysbiose du microbiote et des facteurs déclenchants comme le stress, les allergènes ou la transpiration. Le déficit de la barrière cutanée est lié à plusieurs facteurs et notamment à des prédispositions génétiques. En effet, il y a environ 75% d'hérédité dans la DA et plus de 30 loci génétiques ont été identifiés comme liés à la pathologie¹³³. La perte de fonction du gène FLG (codant pour la filaggrine (FLG)) est la première et la plus décrite, entraînant une barrière cutanée perturbée et une augmentation de la PIE¹³⁴. Par ailleurs, il a été observé une dérégulation de la flore cutanée avec une corrélation de la sévérité de la DA avec une présence accrue de *Staphylococcus aureus* et une diminution de la diversité microbiologique¹³⁵.

Un large nombre d'études a aujourd'hui confirmé l'implication importante des lipides du SC chez les patients atteints de DA et principalement des SPs. En effet les études rapportent une diminution significative de la teneur totale en Cer dans le SC des patients atteints de DA comparés aux sujets sains¹³⁶, et ce depuis de nombreuses années^{137,138}, ainsi qu'une réduction de la longueur de chaînes des différents lipides du SC comprenant des Cer, des SPB, des acides gras libres et des acides gras hydroxylés^{1,139,140}. Cette diminution des chaînes des lipides présents dans le SC provoque une baisse de la fonction barrière via une perturbation de l'organisation lamellaire de la partie superficielle de l'épiderme et plus les chaînes sont courtes moins les interactions sont possibles pour garder la fonction « mortier » du SC amenant à une augmentation de la perte d'eau transépidermique¹⁴⁰. Ces modifications sur les chaînes lipidiques sont bien connues et sont corrélées avec une expression altérée d'enzymes comme les élongases 1 et 4 (ELOVL1 et ELOVL4)^{141,142}. Les rapports entre les familles de Cer sont eux aussi perturbés chez les sujets DA avec une augmentation des Cer de la famille [NS], de surcroît ces Cer

sont souvent corrélés avec un état inflammatoire augmenté^{143–148}. Cette modification est souvent observée par un rapport entre les Cer [NS] et les Cer [NP], un paramètre qui est fortement corrélé à la PIE et qui augmente chez les personnes atteintes de DA montrant une perturbation importante de l'état de la barrière épidermique¹⁴⁶.

4.4.2.1 L'implication du microbiote cutané dans la DA

La peau humaine possède quatre microenvironnements différents avec un microbiote unique¹⁴⁹ :

- Humide avec *staphylocoques*, *corynebactéries* et *protéobactéries*
- Sec avec *flavobactéries*, *protéobactéries* et *corynebactéries*
- Sébacée avec *cutibacterium* et *staphylocoques*
- Autres regroupant les couches dermiques, les follicules pileux et les glandes sudoripares

Mais ce microbiote cutané change en fonction de l'environnement, de l'âge, de la santé et de l'état nutritionnel. Aujourd'hui nos modes de vie ont changé via une augmentation du mode de vie urbain qui modèle notre microbiome par une diminution de sa diversité provoquant une augmentation des pathologies comme la DA¹⁵⁰. La diversité réduite et une expression déséquilibrée des microbes se manifestent sur la peau DA par un déclin de certains genres comme *Streptococcus*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Prevotella* et *Acinetobacter*, une augmentation considérable de *Staphylococcus*, notamment *S. aureus*¹⁵¹. Étant un pathogène opportuniste, *S. aureus* va proliférer, favorisé par l'augmentation du pH cutané des peaux DA, briser la barrière épithéliale et activer le système immunitaire de l'hôte, entraînant une inflammation de la peau¹⁵². Ce lien entre *S. aureus* et la DA est une spirale perpétuelle où le dysfonctionnement de la barrière cutanée facilite la colonisation de *S. aureus* de par la diminution de la FLG^{153,154} et que *S. aureus* induit la production de protéases et de toxine augmentant la dégradation protéique et l'état inflammatoire qui diminue la fonction barrière^{155,156}.

Plus récemment, des études ont montré que *Staphylococcus epidermidis*, bien que principalement impliqué dans des processus bénéfiques pour la peau grâce à la libération de peptides antimicrobiens ciblant *S. aureus*^{157–161}, peut également avoir une action pro- inflammatoire^{162–164}. Cette action pro-inflammatoire implique la production de phenol-soluble modulin (PSM), qui induit une inflammation cutanée similaire à *S. aureus*^{165,166} et est amplifiée par l'abondance plus importante de *S. epidermidis* dans la peau DA^{162,167,168}, également corrélée à la gravité de la pathologie^{167,169}. Un effet similaire est également suspecté pour une levure surabondante dans la DA et particulièrement pour la DA des mains et du cou, *Malassezia furfur*¹⁷⁰, également bien connue pour avoir un impact négatif dans la DS.

4.4.2.2 Les traitements pour soulager la DA

Il n'existe pas de traitement de fond de la DA mais il est possible de réguler l'inflammation et de traiter les symptômes. Le premier traitement de la DA repose sur des mesures préventives afin de protéger et hydrater la peau avec pour conseil l'application journalière d'émollient permettant de diminuer le besoin en médication et d'espacer les poussées^{171–173}. Ensuite pour les patients atteints de DA légère à modérée le traitement de première intention est basé sur l'application de stéroïdes (inhibiteurs de calcineurine) ou de corticoïdes, qui peuvent être risqués en usage prolongé et souvent inappropriés chez des adolescents et des nourrissons^{171,174,175}. D'autres traitements sont possibles comme la photothérapie et des traitements oraux pour les patients atteints de DA sévère et/ou avec complications. Également ces dernières années, de nouvelles biothérapies ont émergé pour le traitement de la DA, ciblant des voies spécifiques du système immunitaire et offrant des perspectives thérapeutiques prometteuses. Le dupilumab, inhibiteur des interleukines IL-4 et IL-13, a démontré une efficacité remarquable, avec une amélioration significative de la qualité de vie des patients^{176–178}. D'autres molécules ciblent également l'IL-13, comme le tralokinumab et le lebrikizumab¹⁷⁶, tandis que

les inhibiteurs de JAK, notamment l'upadacitinib, apparaissent comme des alternatives pertinentes¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Des recherches récentes s'intéressent à des cibles émergentes, telles que le TSLP ou les cytokines de la famille IL-1, qui pourraient permettre de mieux contrôler des symptômes persistants, comme le prurit¹⁸². Par ailleurs, des thérapies visant à corriger la dysbiose du microbiome cutané se développent, ouvrant la voie à des approches innovantes¹⁸³.

4.4.3 Le Psoriasis

Il y a un peu moins de 10 ans, en 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait déjà reconnu le Pso comme une « maladie chronique, non transmissible, douloureuse, défigurante et invalidante pour laquelle il n'existe aucun remède et qui a un impact négatif important sur la qualité de vie des patients »¹⁸⁴ en raison du fardeau émotionnel, social et économique que représente la maladie. En effet elle affecte diverses zones visibles et/ou socialement cruciales comme le visage, les mains, les pieds ou les organes génitaux externes. Aujourd'hui encore cette maladie inflammatoire chronique avec une pathogenèse complexe et multifactorielle qui n'est pas encore entièrement comprise ne peut être soignée, seuls les symptômes sont soulagés. Le Pso touche tous les âges et tous les pays, bien que plus fréquent chez les personnes à peau claire et de pays développés¹⁸⁵ mais avec des prévalences variant entre les pays entre 0,09 % et 11,43 %, représentant au total au moins 100 millions de personnes dans le monde et ce chiffre ne cesse d'augmenter¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Le Pso le plus courant est le Pso en plaques, qui sera le Pso traité dans cette thèse, il semble impliquer une activité excessive des lymphocytes T¹⁸⁹⁻¹⁹¹ ainsi qu'une combinaison de facteurs génétiques, de perturbations immunologiques et de stimuli environnementaux¹⁹². Ce Pso se caractérise par une inflammation cutanée et une hyperprolifération des kératinocytes, qui entraînent la formation de plaques squameuses et prurigineuses, de couleur pâle sur peau blanche et grise argentée sur peau noire, que l'on retrouve préférentiellement sur les mains, les coudes et les genoux (**Figure 17**). Elle évolue par poussées dont la fréquence et l'intensité sont imprévisibles et possède un certain nombre de déclencheurs externes et des comorbidités importantes, comme l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et la dépression.¹⁸⁴



Figure 17 : Photo de patients atteints de Psoriasis . a) Plaque squameuse d'un adulte avec peau claire sur l'avant-bras. b) Plaque prurigineuse et squameuse d'un adulte avec peau claire sur l'avant-bras. c) Plaque squameuse et prurigineuse, de couleur grise argentée sur un patient avec la peau noire. Photo a) obtenue à partir de Samuel Freire Da Silva et contributeurs, en accès libre via [Atlas dermatológico](#). Photos b) photos libres de droit obtenue sur [Adobe Stock](#) c) Reproduit partiellement avec les autorisations respectives de [Griffiths et al.](#) et d'Elsevier

4.4.3.1 Diminution de la diversité du microbiote cutané et modification du profil lipidique dans la pathogenèse du psoriasis

Le microbiote cutané et plus particulièrement sa diversité est d'une importance capitale dans le maintien de la santé de la peau et une dysbiose de ce microbiote est liée à diverses affections cutanées comme ce qui est observé dans la DA et la DS. Pour le Pso les recherches sont moins importantes et surtout plus récentes donc avec moins de conclusions que pour la DA par exemple. Malgré cela, certaines familles de microorganismes et plus particulièrement de bactéries semblent être corrélées ou négativement corrélées aux plaques psoriasiques. C'est le cas des *Bacteroides* qui leur présence dans les peaux permettent de prévenir le Pso via un effet anti-inflammatoire chez les patients atteints de Pso¹⁹³. Une autre bactérie modifiée dans le microbiote du Pso est la bactérie *C. acnes* qui est retrouvée diminuée, or cela pourrait être le reflet d'un microenvironnement inhospitalier à ces micro-organismes et joue probablement un rôle central dans la pathogenèse du psoriasis ou pourrait être impliqué dans l'aggravation de la maladie¹⁹⁴. Cette fois plusieurs études ont montré une augmentation de *Streptococcus spp* chez les sujets psoriasiques et était liée à la pathogenèse du Pso^{195,196}. Bien que certaines modifications du microbiote soient observées dans les peaux psoriasiques, il est important de noter que Drago et al. en 2016 observent une diversité bactérienne très faible¹⁹⁷. Cependant toutes ces études ont parfois des résultats incohérents ce qui suggère que le mécanisme que joue le microbiote cutané sur la pathogenèse du Pso est encore complexe¹⁹⁸.

Les peaux psoriasiques présentent non seulement une diminution de la diversité bactérienne, mais aussi des altérations profondes du profil moléculaire cutané. La littérature rapporte une altération de la fonction barrière du SC, avec un profil des Cer similaire à celui observé dans la DA et la DS avec diminution des Cer[P] et une augmentation des Cer[S]¹⁹⁹. De plus, le Pso est marqué par une forte composante inflammatoire, se traduisant par une élévation de biomarqueurs tels que l'histamine et certaines oxylipines²⁰⁰. Enfin, ce déséquilibre lipidique s'observe également avec une réduction des acides gras libres et une augmentation du cholestérol, soulignant l'impact global de la pathologie sur l'homéostasie cutanée^{201,202}.

4.4.3.2 Les traitements contre le psoriasis vulgaris

Le traitement de base du Pso sont des produits topiques qui permettent de réduire les démangeaisons, le prurit et favorisent la desquamation afin de diminuer les plaques. En première intention il est souvent recommandé d'appliquer en local des topiques avec de l'acide salicylique ou de l'urée qui ont des actions exfoliantes et hydratantes. Il est également nécessaire de réparer la fonction barrière avec l'application de Cer, de niacinamide ou de glycérine. Ensuite les corticoïdes sont une famille de traitements dermatologiques très utilisés dans les différentes dermatoses comme dans la DA mais également pour le traitement du Pso avec une diminution des plaques. Les autres traitements pour le Pso modéré sont l'application d'analogues à la vitamine D3, jouant un rôle sur la prolifération des kératinocytes, les inhibiteurs de la calcineurine ou le dithranol un extrait d'un arbre brésilien²⁰³. Enfin la photothérapie est possible pour les patients présentant un Pso modéré à sévère et est généralement mise en place dans l'attente d'un relais avec un traitement de fond et repose sur l'effet thérapeutique de la lumière UV²⁰⁴. Enfin pour les personnes avec un Pso sévère des traitements oraux sont possibles. Les biothérapies, ont comme pour la DA changées ces dernières années la prise en charge des patients mais sont seulement mises en place si les autres traitements n'ont montré aucune amélioration sur les symptômes du patient. Les anti-TNF α (comme l'infliximab ou l'adalimumab) ont été les premiers à démontrer leur efficacité, mais les biothérapies de nouvelle génération, ciblant l'IL-17 (secukinumab, ixekizumab, brodalumab) ou l'IL-23 (guselkumab, risankizumab, tildrakizumab), offrent des résultats plus durables et une meilleure tolérance. Les inhibiteurs d'IL-17 agissent rapidement mais peuvent être associés à un risque accru de candidose, tandis que les inhibiteurs d'IL-23, plus récents, permettent un contrôle prolongé de la maladie avec des injections espacées²⁰⁵. Par ailleurs, des approches innovantes

comme les inhibiteurs oraux de TYK2 (ex. : deucravacitinib) élargissent les options thérapeutiques avec une administration simplifiée et une efficacité prometteuse²⁰⁶. Ces avancées permettent une prise en charge personnalisée et améliorent significativement la qualité de vie des patients atteints de psoriasis modéré à sévère.

4.4.4 La Rosacée

La rosacée est une dermatose inflammatoire chronique du visage qui affecte environ 5,5 % de la population²⁰⁷, avec une prévalence égalitaire entre les hommes et les femmes mais avec des disparités dans les formes. Cette maladie se manifeste sous diverses formes cliniques^{208,209}. La forme la plus courante, appelée érythémato-télangiectasique (**Figure 18 a**)), se caractérise par des bouffées vasomotrices et un érythème persistant au centre du visage, parfois associé à des télangiectasies (dilatation de petits vaisseaux sanguins situés près de la surface de la peau). Une autre forme, dite papulo-pustuleuse (**Figure 18 b**) et **c**)), forme étudiée dans cette thèse, combine un érythème facial central persistant avec l'apparition transitoire de papules ou de pustules, lésions pouvant ressembler à celle de l'acné. Chez certains patients, principalement des hommes, la rosacée prend une forme phymateuse (**Figure 18 d**)), entraînant un épaissement de la peau, des irrégularités nodulaires en surface et une augmentation du volume de certaines zones comme le nez, le menton, le front, les joues ou les oreilles. Enfin, la rosacée peut aussi se manifester au niveau des yeux, forme oculaire (**Figure 18 e**)), provoquant une sensation de corps étranger, des brûlures, une sécheresse oculaire, des démangeaisons, une photosensibilité, une vision floue ou encore un œdème périorbitaire, souvent accompagné de télangiectasies de la sclère ou d'autres structures oculaires. La forme érythémato-télangiectasique représente souvent le stade initial de la rosacée, pouvant évoluer vers des formes plus sévères, marquées par l'apparition de papules et pustules, voire par la forme phymateuse. Bien que principalement localisée sur le visage, la rosacée peut également s'étendre à d'autres zones du corps, notamment le cuir chevelu et la partie antérieure de la poitrine²¹⁰.

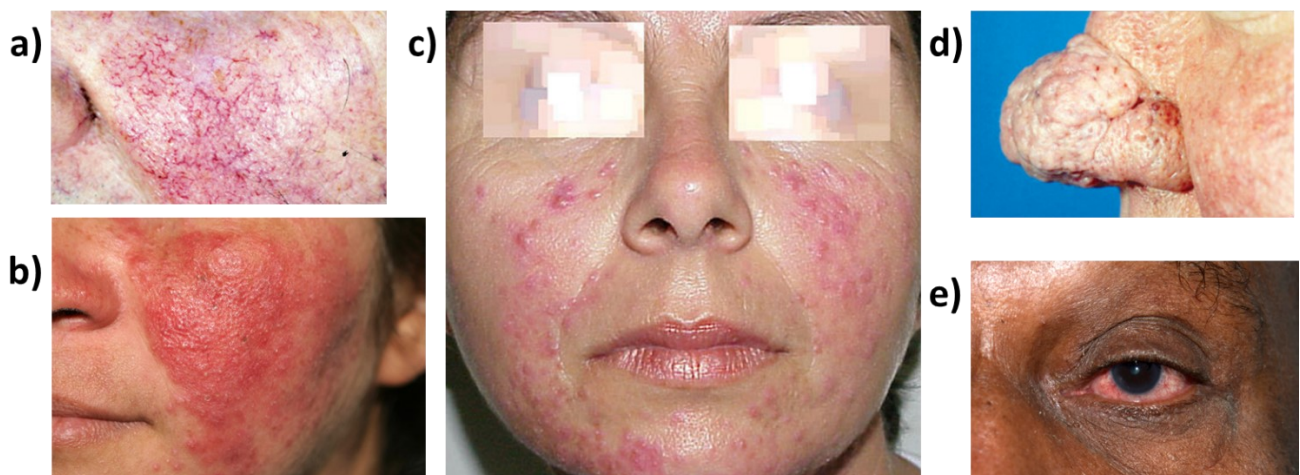


Figure 18 : Photos illustratives des 4 formes de la rosacée avec a) une forme érythémato-télangiectasique sur la joue avec beaucoup de télangiectasies, b) la forme papulo-pustuleuse avec un fort érythème facial situé sur la joue et c) l'apparition de papules et pustules sur les joues et le menton. d) La forme phymateuse au niveau du nez traduit par un épaissement de la peau et des irrégularités nodulaires très marquées et enfin e) la forme oculaire avec des télangiectasies dans l'œil. Photos a), b) et c) obtenues à partir de Samuel Freire Da Silva et contributeurs en accès libre via [Atlas dermatologico](#). Photos d) et e) obtenues à partir de « [Rosacea](#) » avec les autorisations respectives de Frank C. Powell et New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society.

La rosacée affecte principalement les personnes à peau claire (phototypes I et II), apparaissant généralement au début de l'âge adulte avec un pic de fréquence entre 40 et 50 ans²¹¹. Chez les individus à peau foncée (phototypes III à V), la prévalence semble sous-estimée, probablement en raison d'un

diagnostic moins fréquent. De plus, les questions liées aux causes, aux associations possibles et aux différences selon le sexe demeurent encore aujourd'hui insuffisamment explorées et nécessitent des études approfondies. Bien qu'il s'agisse d'une dermatose reconnue depuis de nombreuses années, la physiopathologie exacte et la biologie moléculaire de cette maladie sont encore débattues. Les théories actuelles mettent en évidence le rôle du microbiome cutané et de ses effets inflammatoires avec une implication des systèmes immunitaires innés et adaptatifs ainsi qu'une dysrégulation neurovasculaire²¹². Il existe également des dommages induits par les ROS sécrétés par la libération d'interleukine-1 (IL-1) et de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).

Contrairement aux trois autres pathologies étudiées dans cette thèse, la rosacée reste une dermatose encore mal comprise, tant sur le plan physiopathologique que sur les aspects moléculaires et métaboliques. Les études sur la lipidomique cutanée de la rosacée sont extrêmement rares. L'une des seules disponibles remonte à 1976, menée sur un petit groupe de patients, sans révéler de différences significatives entre le groupe témoin et les patients atteints de rosacée²¹³. Ce manque criant de recherches en métabolomique et lipidomique limite notre compréhension des mécanismes moléculaires et métaboliques impliqués dans la maladie. En comparant le volume de publications sur la DA et la rosacée, y compris celles portant sur les analyses "omiques" et les autres approches, on constate un écart considérable (**Figure 19**), soulignant l'important retard scientifique sur cette pathologie.

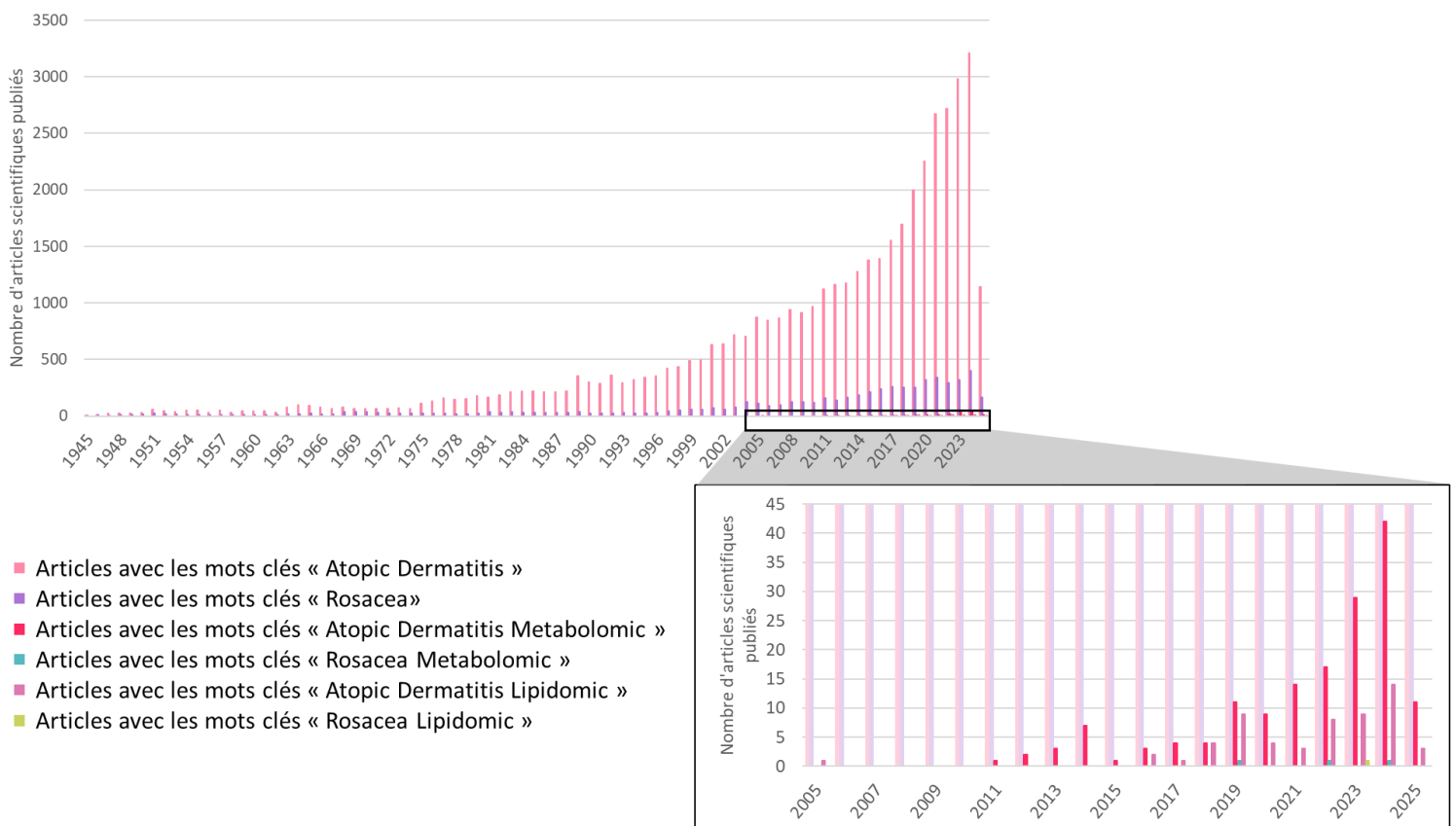


Figure 19 : Nombre d'articles référencé dans PubMed entre 1945 et 2025 sur les mots clés « Atopic Dermatitis », « Rosacea », « Atopic Dermatitis Metabolomic », « Rosacea Metabolomic », « Atopic Dermatitis Lipidomic » et « Rosacea Lipidomic ».

4.4.4.1 *Demodex principal micro-organisme impliqué dans la rosacée*

Le rôle des microorganismes dans la rosacée, longtemps centré sur *Demodex*, s'élargit avec l'implication d'autres agents comme *Bacillus oleronius*, *Staphylococcus epidermidis* et *Cutibacterium acnes*. Depuis une dizaine d'années, des études ont, en effet, confirmé une population accrue d'acariens *Demodex* (*D. brevis* et *D. folliculorum*) dans la peau des patients atteints de rosacée, comparée à celle

de sujets sains²¹⁴. Cette prolifération de *Demodex* semble stimuler la production de marqueurs inflammatoires, tels que l'interleukine-8 (IL-8), IL-1 β et le TNF- α , qui favorisent l'angiogenèse mais également la prostaglandines E2²⁰⁷. Ce mécanisme pourrait expliquer les télangiectasies, caractéristiques marquantes de la rosacée.

Ensuite, *Bacillus oleronius*, une bactérie Gram-négative associée à *Demodex*, jouerait également un rôle important dans la physiopathologie de la rosacée en produisant des protéines antigéniques susceptibles de contribuer à l'inflammation observée dans cette pathologie²¹⁵.

En outre, une étude menée par Holmes et al. a révélé une augmentation de la présence de *Staphylococcus epidermidis* dans les lésions pustuleuses des patients atteints de rosacée²¹⁴. Ce phénomène pourrait être lié à l'augmentation du flux sanguin facial, qui élève la température cutanée. Or, à des températures plus élevées, *S. epidermidis* modifie son comportement, produisant des facteurs de virulence, qui sont absents chez les sujets sains²¹⁶. Il est probable que le micro-environnement perturbé par la rosacée favorise cette prolifération, aggravant ainsi les symptômes de la maladie.

4.4.4.2 Traitements de la rosacée

En raison de la complexité de la rosacée et des connaissances encore à approfondir, diverses approches thérapeutiques sont utilisées pour son traitement. Dès le diagnostic, comme pour la DA, la première étape consiste à éduquer le patient afin de l'aider à identifier et à minimiser les facteurs environnementaux qui aggravent les symptômes ou déclenchent des poussées. L'établissement d'une routine de soins adaptée est également essentiel pour réduire les risques de récurrence. Si ces mesures préventives ne suffisent pas, des traitements médicamenteux, qu'ils soient topiques ou systémiques, sont introduits pour contrôler les poussées et en espacer leur survenue. Ces traitements sont souvent hautement personnalisés, combinant différentes approches pour cibler les multiples manifestations de la rosacée et améliorer la qualité de vie du patient.

Les traitements topiques offrent plusieurs options pour la prise en charge de la rosacée. Parmi eux, on retrouve des anti-inflammatoires tels que l'acide azélaïque ou les rétinoïdes comme l'adapalène ou des antiparasitaires ou antibactériens, tels que l'ivermectine et le métronidazole^{207,209}.

5 De l'acquisition des données à l'identification moléculaire

5.1 Le SpiderMass

Depuis 2012, le laboratoire PRISM développe un outil novateur appelé SpiderMass permettant de réaliser des analyses *in-vivo* en temps réel de façon non-invasive^{58,60,217} (**Figure 20a**). Cette technologie repose sur la réalisation d'un micro-échantillonnage des tissus biologiques via un laser nanoseconde émettant à une longueur d'onde de 2940 nm (moyen-infrarouge) qui permet d'exciter spécifiquement les bandes d'absorption des liaisons O-H présentes notamment dans les molécules d'eau⁴⁻⁶. L'excitation des molécules d'eau présentes dans la peau entraîne un phénomène de désorption/ionisation des molécules environnantes par un processus d'excitation résonante, créant un aérosol. Enfin cet aérosol est transporté jusqu'au spectromètre de masse via un tube qui peut être long de plusieurs mètres. Cette méthode d'excitation permet une ablation très courte avec un transfert thermique très limité aux tissus environnants, ce qui limite son invasivité. En effet le laser a une profondeur de pénétration faible des tissus estimé à moins de 5 μm par tir laser sur des tissus et dépend de l'énergie laser choisie pour l'analyse. Ainsi, l'eau endogène des tissus devient une matrice permettant de réaliser un processus MALDI. Le processus de désorption/ionisation généré dans ce contexte a été appelé WALDI pour le différencier du MALDI traditionnel réalisé *ex-vivo*. Les spectres MS acquis présentent des caractéristiques similaires à celles observées lors du processus MALDI avec, comme l'effet collectif, une faible fragmentation (si l'énergie laser utilisée est juste au-dessus du seuil d'énergie pour la production d'ions) et la capacité de détecter à la fois des ions positifs et négatifs et d'analyser des molécules polaires mais également apolaires sur une même analyse. Le système SpiderMass est très polyvalent, développé au départ pour apporter une aide à la décision pour la chirurgie guidée des cancers⁵⁸, il s'est avéré être un outil de choix pour l'étude de la peau par sa faible pénétration. En effet il est connu pour sa facilité à analyser les lipides ce qui apporte un point positif supplémentaire à son utilisation sur la peau où ils sont les composants majeurs. Toutes ces caractéristiques en font un outil de choix pour l'analyse des pathologies de la peau comme les dermatoses qui sont des pathologies avec une forte prévalence dans nos pays.

Plus précisément le SpiderMass est composé d'un système d'oscillateur paramétrique optique (OPO) couplé à une pompe à grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd:YAG), avec une longueur d'onde définie à 2,94 μm , fournissant une impulsion laser d'une durée d'environ 6 ns. Ce laser est un Radiant de chez Opotek et est utilisé comme source du système. Notre système à cette longueur d'onde fournit la puissance d'énergie laser de 1,5 mJ/impulsion après la fibre, permettant de limiter la fragmentation. L'analyse des volontaires dans les études cliniques nécessite une automatisation de l'échantillonnage pour mieux contrôler la distance focale et donc la reproductibilité et pour cela la fin de la fibre optique est placée sur un bras motorisé automatique avec un détecteur de distance. Ce bras permet un déplacement dans les axes X, Y et Z afin de reproduire des formes tout en suivant les aspérités de la surface à prélever. Avec le logiciel MOLO qui dirige le bras il est possible de choisir la forme, les dimensions ainsi que le pas et la vitesse comme paramètres d'entrée.

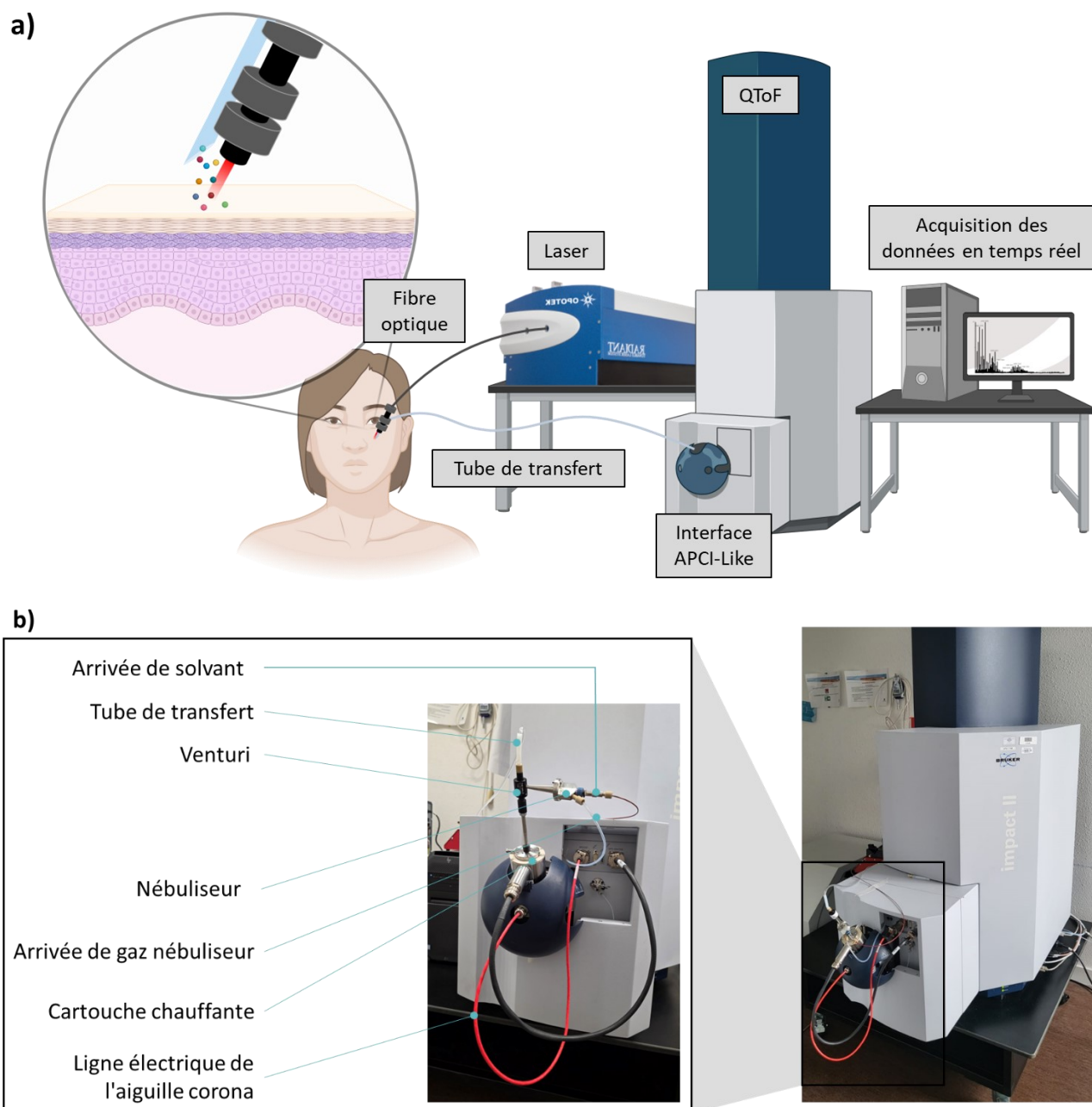


Figure 20 : a) Représentation schématique de la configuration SpiderMass pour des expériences in-vivo. La configuration SpiderMass est équipée du dispositif de micro-échantillonnage laser à fibre optique Radiant de chez Opoteck, d'un tube de transfert d'ions et d'un spectromètre de masse Q-ToF (IMPACT II) de Bruker qui possède à son entrée une interface APCI-Like ; b) Interface APCI-like pour l'analyse SpiderMass. Les molécules sont aspirées par le tube de transfert, puis mélangées à un solvant pulvérisé pour ensuite être chauffées par la cartouche chauffante, puis pénètrent dans la source et traversent la décharge de l'aiguille corona. QToF : Analyseur composé d'un quadripôle et d'un Temps de vol ; APCI : Ambient Ionization Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse à ionisation ambiante)

Après le tir laser, les molécules désorbées sont aspirées et transportées jusqu'au spectromètre de masse par un tube en polymère de 4 mètres de long, positionné juste au-dessus du tissu analysé. Dans le cas du prototype SpiderMass reproduit dans les locaux de PFDC à l'Hôtel Dieu, le système est un spectromètre de masse de type Q-ToF (IMPACT II) de Bruker Daltonics. Le spectromètre est également équipé d'une interface dédiée qui a été développée en collaboration entre PRISM et PFDC. Cette interface repose sur un mécanisme APCI-like. Cette interface, basée sur une source APCI commerciale, a été adaptée aux spécificités du SpiderMass grâce à l'ajout d'un système d'aspiration Venturi (**Figure 20b**). Ce système améliore l'efficacité en mélangeant l'aérosol aspiré à un solvant

composé d'isopropanol et d'eau (50/50), auquel est ajouté de l'azote. Ce mélange est ensuite soumis à une aiguille corona qui génère une décharge électrique. Cette décharge ionise le solvant, permettant ensuite des réactions de transfert de protons. Les ions en phase gazeuse sont ensuite dirigés dans le spectromètre par les champs électriques autour du capillaire de transfert. Ce processus réalise une ionisation chimique sous pression atmosphérique, optimisant l'analyse des molécules. Le spectromètre de masse est quant à lui un Q-ToF composé d'un quadripôle, utilisé pour la sélection de l'ion parent en MS/MS, suivi d'une cellule de collision qui permet de fragmenter l'ion parent par « Collision Induced Dissociation » (CID) et enfin d'un analyseur ToF. En mode MS simple, les deux quadripôles sont en mode transparent et les ions directement analysés par le ToF. Le ToF est en configuration orthogonale et les ions arrivant dans le ToF sont accélérés orthogonalement (afin d'éviter une dispersion spatiale trop importante des ions au moment de l'accélération) et le ToF comprend un réflecteur, dans lequel les ions opéreront un demi-tour avant d'être réaccélérés vers le détecteur. Le réflecteur permet d'augmenter le pouvoir résolutif (en augmentant le trajet des ions) et la résolution spatiale en jouant le rôle de filtre en énergie cinétique, permettant ainsi une compensation des dispersions spatiales et temporelles des ions au moment de l'accélération.

5.2 Méthodes d'acquisitions

La méthode d'acquisition a principalement été optimisée lors de la thèse du Dr Saudemont aussi bien sur l'acquisition des données en mode positif qu'en mode négatif. Cette optimisation est faite pour disposer d'une méthode qui permet aussi bien d'observer les petits que les plus grands m/z , jusqu'à environ 1000 u. afin de couvrir la plus grande plage de m/z possible pour les études cliniques.

5.2.1 Optimisation des modes positif et négatif

La totalité des études cliniques a initialement été réalisée en mode positif, ce mode ayant offert une excellente réponse des échantillons et une intensité de signal nettement supérieure à celle du mode négatif, comme illustré dans la **Figure 21a**), qui compare les spectres obtenus en mode positif et en mode négatif, lors des premières optimisations. La méthode d'acquisition MS optimisée pour les études cliniques par le Dr. Saudemont scanne entre les m/z 50 et m/z 1600 avec des paramètres de source et de transfert adaptés à une vue globale du spectre obtenu sur des échantillons de sébum et de peau.

Bien que le mode négatif n'ait pas été utilisé dans les études cliniques menées au cours de cette thèse, une optimisation préliminaire de la méthode analytique a tout de même été réalisée dans ce mode. Un changement de solvant a notamment permis d'améliorer la sensibilité d'analyse, en utilisant un mélange Chloroforme/Méthanol/Isopropanol (1:2:4, v/v/v) avec 7,5 mM d'acétate d'ammonium, selon le protocole établi par l'équipe de Sadowski et al. pour leurs analyses lipidomiques cutanées en shotgun lipidomics⁷⁴. Ce nouvel ajustement a significativement amélioré la qualité des spectres MS en mode négatif, comme l'illustre le spectre bleu présenté dans la **Figure 21b**). Cette modification du solvant d'infusion permet d'avoir un solvant plus apolaire légèrement basique favorisant la déprotonation des groupements COOH que l'on peut par exemple retrouver dans les FFAs et la désolvatation des GLs et Cer.

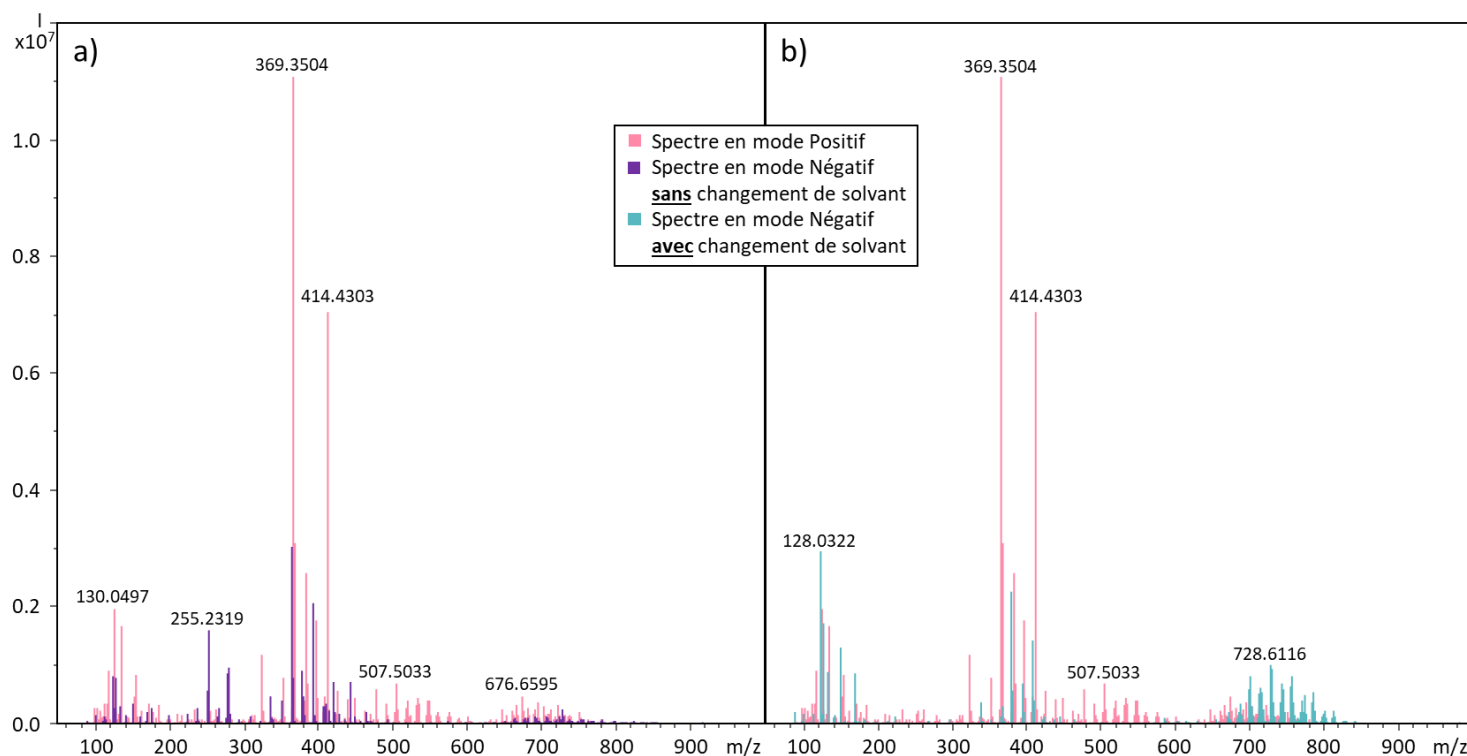


Figure 21 : a) Spectre MS acquis au SpiderMass en mode positif (spectre rose) et en mode négatif (spectre violet), avec le solvant utilisé lors des études cliniques (Isopropanol/Eau (50%/50%)) ; b) Spectres MS acquis au SpiderMass en mode positif (spectre rose) et en négatif avec le changement de solvant (Chloroforme : Méthanol : Isopropanol (1:2:4, vol))(spectre bleu).

Une comparaison entre les méthodes en mode négatif et en mode positif a été effectuée en utilisant les paramètres sources optimisés pour la détection des Cer (ces optimisations sont décrites par la suite). Avec cette configuration, le mode négatif permet la détection de 19 600 m/z , contre 12 200 en mode positif. Toutefois, malgré cette meilleure couverture, le mode négatif présente une intensité maximale plus faible ($2,9 \times 10^6$) que celle observée en mode positif ($1,0 \times 10^7$). Enfin, en appliquant un seuil d'intensité à 10 000, correspondant au minimum requis pour obtenir un spectre de fragmentation suffisamment informatif, le mode positif permet la détection de 904 masses exploitables contre seulement 481 en mode négatif. Ces résultats confirment que, malgré une couverture plus large en mode négatif, le mode positif reste plus performant pour les analyses nécessitant une fragmentation fiable, grâce à une intensité de signal plus élevée sur les ions détectés.

5.2.2 Optimisation de méthodes pour l'analyse et la fragmentation de céramides ou de métabolites

La méthode développée et optimisée pour les études cliniques offre une vue d'ensemble du spectre de la peau et du sébum. Cependant, pour fragmenter efficacement certaines molécules, il a été nécessaire d'ajuster les paramètres de la source et de transfert du spectromètre de masse afin de mieux cibler certaines familles de molécules à analyser. Dans cette optique, deux méthodes de fragmentation ont été mises au point et optimisées, l'une dédiée aux métabolites, caractérisée par de faibles m/z , et l'autre spécifiquement conçue pour les Cer. Ces dernières, bien que fortement présentes dans la peau et particulièrement affectées en cas de dermatoses, présentaient parfois des intensités trop faibles pour permettre leur fragmentation.

L'optimisation de la méthode dédiée aux Cer a été réalisée directement sur la peau, en l'absence de standards de Cer disponibles. Chaque paramètre a été testé individuellement, en prenant comme point de départ la méthode utilisée lors des études cliniques. Le premier paramètre de la source APCI-

Like, ajusté fut la température de vaporisation, initialement fixée à 350°C, qui a été augmentée à 450°C. Cette modification a permis une amélioration notable du profil des Cer. Ensuite, le voltage de l'aiguille corona a également été augmenté afin d'optimiser leur détection. Comme pour la température de vaporisation, cette augmentation du voltage n'est pas recommandée pour les analyses de routine en raison de l'usure accrue du matériel, mais reste pertinente pour des méthodes de fragmentation ponctuelles. En revanche, les autres paramètres testés, la pression du gaz nébuliseur, le débit du dry gaz et la fréquence de l'Hexapôle RF, n'ont pas montré d'impact significatif sur le signal des Cer et n'ont donc pas été modifiés.

En conclusion, l'optimisation de la méthode dédiée à l'analyse et à la fragmentation des Cer a nécessité une augmentation de la température de vaporisation ainsi que du voltage de l'aiguille corona. Ces ajustements ont considérablement amélioré le profil des Cer, comme l'illustre la **Figure 22 a**), où le profil vert se distingue par une intensité accrue par rapport au profil rose dans la zone des Cer du spectre MS.

Ensuite l'optimisation de la méthode dédiée aux métabolites s'appuie sur l'ajustement de deux paramètres clés de l'interface APCI-like, l'augmentation de la température de vaporisation de 350°C à 450°C et l'élévation du voltage de l'aiguille corona à 6000 A, suivant la même approche que pour la méthode des Cer. Cependant, la modification la plus déterminante pour l'analyse et la fragmentation des petites molécules, telles que les métabolites, a été la réduction de la fréquence de la tension de la cellule de collision avec une diminution de 900 à 500 Vpp. Cet ajustement a permis une meilleure transmission des ions de faible masse en mode MS et une fragmentation plus efficace en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), (**Figure 22 b**)). La **Figure 22 a**) illustre clairement que ces ajustements ont permis d'augmenter considérablement le nombre de petites molécules détectées, comme en témoigne le spectre bleu, bien plus riche en signaux de faible m/z que les spectres roses et verts.

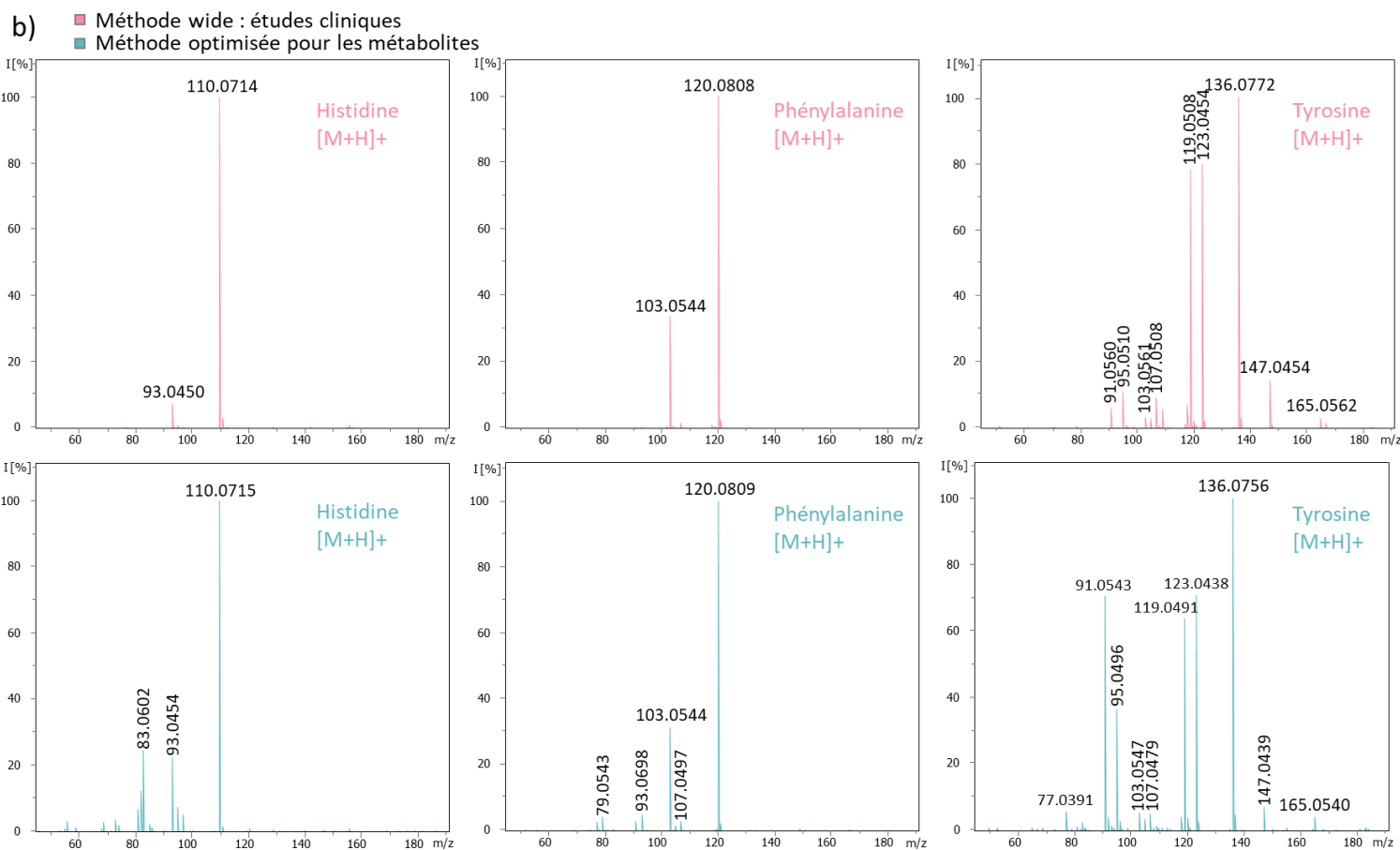
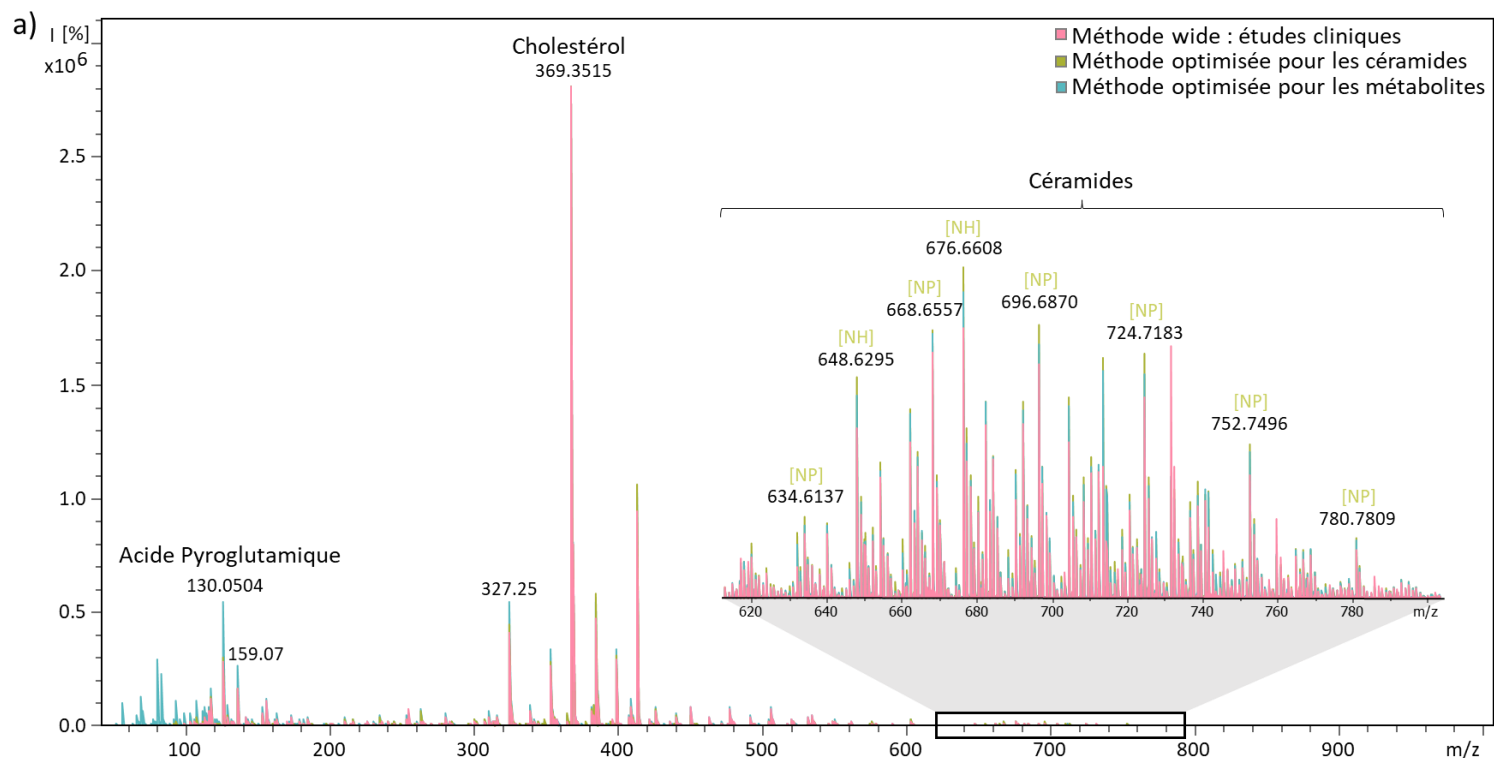


Figure 22 : a) Spectre MS de la peau obtenu en analyse in-vivo avec la méthode optimisée pour les études cliniques (spectre MS rose), pour l'analyse et la fragmentation des Cer (spectre MS vert) et pour l'analyse et la fragmentation des métabolites (spectre MS bleu) ; b) Spectres de fragmentation de trois acides aminés (Histidine, Phénylalanine et Tyrosine) avec la méthode Wide (Rose), qui est la méthode développée pour les études cliniques, et avec la méthode Métabo (Bleu), optimisée pour l'analyse et la fragmentation des petites molécules telles que les métabolites.

Comme pour le mode positif, le mode négatif a également fait l'objet de plusieurs optimisations afin d'obtenir une visualisation et une fragmentation optimales des Cer et des métabolites. Tout d'abord, le changement de solvant a significativement amélioré la qualité du spectre, passant d'un spectre peu informatif (en rose) à un spectre beaucoup plus riche (en bleu foncé), comme illustré sur la **Figure 23**. Ensuite, en s'appuyant sur les ajustements réalisés en mode positif, la température de vaporisation, un paramètre clé pour la détection des Cer, a été augmentée de 350 °C à 450 °C. Ce réglage a permis d'enrichir le spectre MS, représenté en vert sur la **Figure 23**. Enfin, comme en mode positif, la détection des petites molécules telles que les métabolites, a été améliorée en réduisant la fréquence de la tension appliquée à la cellule de collision. Ce réglage optimise le transfert des ions, offrant ainsi une meilleure visualisation des métabolites, comme en témoigne le spectre bleu clair de la **Figure 23** également.

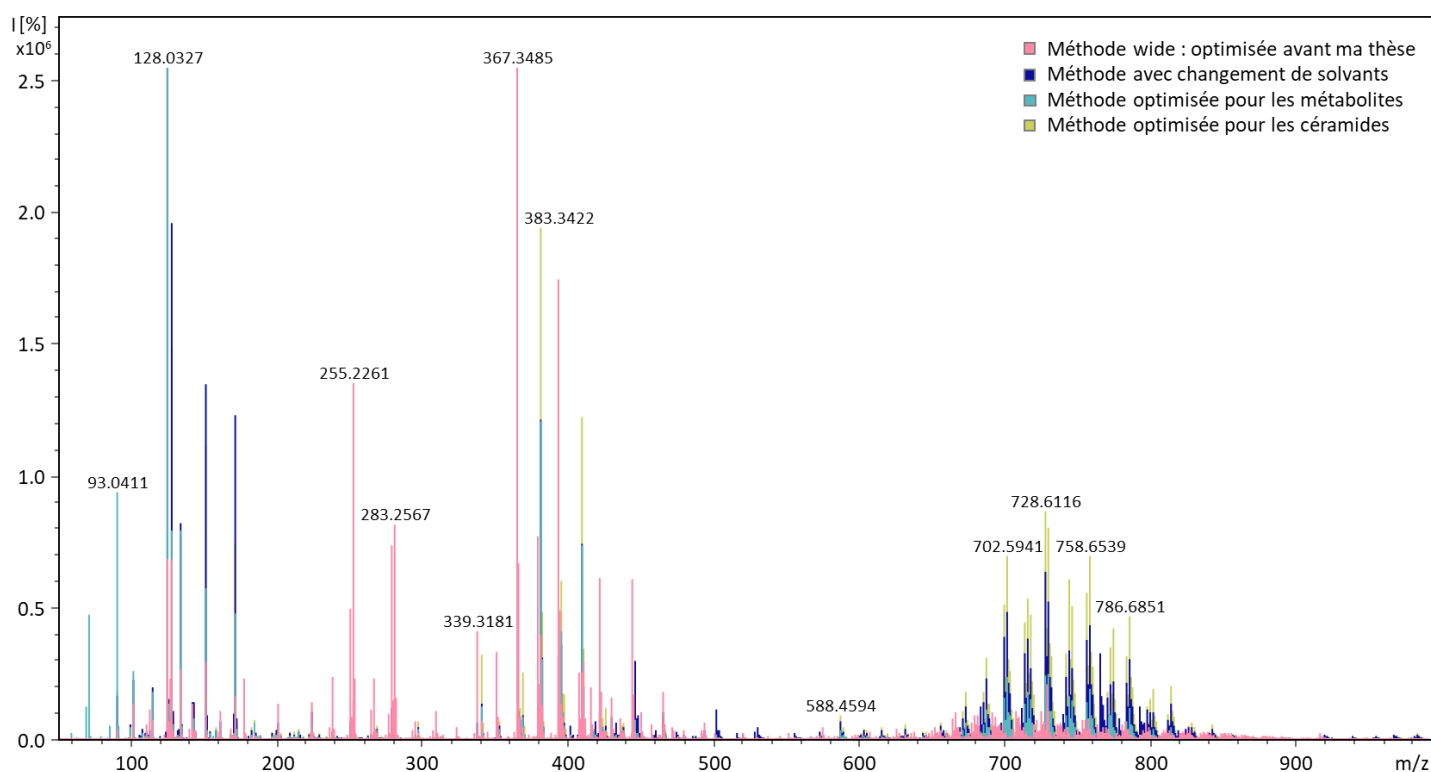


Figure 23 : Spectre MS de la peau obtenu en analyse in-vivo avec la méthode optimisée pour les étude cliniques (spectre MS rose), après changement du solvant d'infusion passant d'un solvant composé d'Eau/Isopropanol (50%/50%) à un solvant composé de Chloroforme/Méthanol/Isopropanol (1/2/4, vol) + 7,5mM d'acétate d'ammonium, pour l'analyse et la fragmentation des Cer (spectre MS vert) et pour l'analyse et la fragmentation des métabolites (spectre MS bleu)

5.3 Workflow d'acquisition : du prélèvement aux résultats

De par l'absence de chromatographie liquide ou de toute autre méthode séparative en amont du spectromètre de masse, et de par la nature du prélèvement d'échantillon *in-vivo* sur la peau des patients et donc sans aucune préparation, le workflow d'acquisition et de retraitement de données a été bâti spécifiquement pour répondre aux besoins du projet.

5.3.1 L'acquisition des données

Les données acquises *in-vivo* sont obtenues pour une énergie en sortie de la fibre optique du laser de 0,8 mJ/pulse permettant d'obtenir une désorption/ionisation suffisante du matériel pour avoir un TIC (Total Ion Current, Courant Ionique Total) exploitable, tout en restant non invasif et en sécurité pour le patient, notamment lorsque le prélèvement est réalisé sur le visage. En effet, les mesures SpiderMass

peuvent être effectuées aussi bien sur les bras, ce qui est courant pour les mesures contrôle (CTL) ou pour des pathologies comme la DA ou le Pso, que sur le visage, comme c'est le cas pour l'analyse de l'acné ou de la rosacée. Selon la zone à mesurer, le patient est placé sous l'extrémité de la fibre optique du laser, via un positionnement adéquat du bras motorisé, dans une position confortable afin de limiter les micromouvements. Cette position peut être assise, couchée sur le dos ou couchée sur le ventre pour des cas d'acné du dos comme sur la **Figure 24 a), b) et c)**. Le bras motorisé permet un ajustement précis de la distance focale du laser tout au long du prélèvement, afin de suivre les irrégularités de la surface à analyser et de compenser au mieux les micromouvements du patient. Pour aider les patients à rester aussi immobiles que possible pendant la mesure, une gouttière a été conçue pour maintenir leur avant-bras, la zone du corps la plus fréquemment utilisée pour les études (**Figure 24 d) et e)**). Toutes les mesures réalisées lors des études cliniques ont été acquises en mode positif.



Figure 24 : Photos illustratives des acquisitions possibles lors d'une étude clinique sur a) l'avant-bras du patient qui est placé dans une gouttière pour favoriser au maximum son immobilité ; b) le visage, où le patient porte des coques de protection pour les yeux ; c) le dos. Photos illustratives du placement de l'avant-bras dans la gouttière avec l'extrémité de la fibre optique centrée sur la zone de mesure ou d) l'avant-bras placé dans la gouttière avec le numéro de sujet placé juste au-dessus de la zone de mesure afin de reconnaître et d'anonymiser la mesure.

Le bras motorisé dispose d'une seconde fonction : la création de formes, rendue possible grâce à un logiciel sur-mesure développé pour répondre aux besoins de PFDC. Ce logiciel assure une communication fluide entre le laser, le bras motorisé et le spectromètre de masse, permettant de centraliser les commandes sur une seule interface et garantissant ainsi une meilleure reproductibilité des processus. Conçu par le Dr Saudemont lors de la thèse précédente, il offre également la possibilité de générer diverses figures tout en contrôlant précisément leurs paramètres, tels que la taille, le nombre et la fréquence des tirs ou encore l'espacement entre les lignes composant la forme. (**Figure 25**).

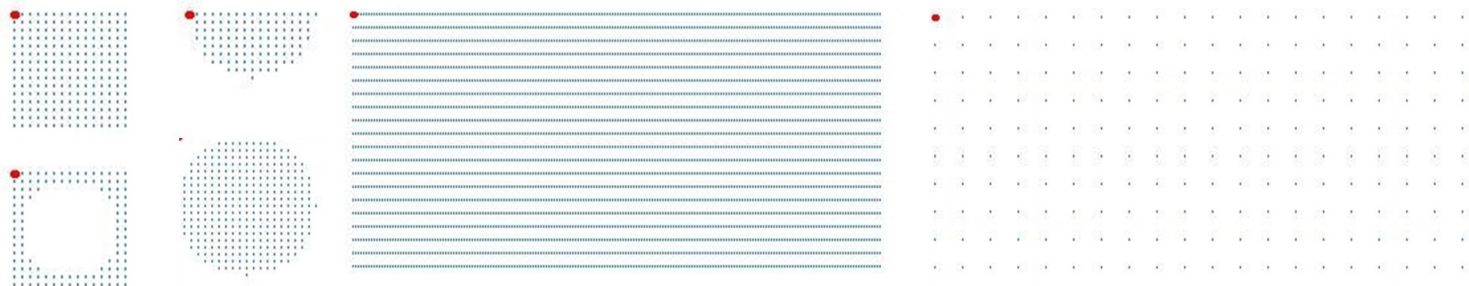


Figure 25 : Exemple de motif pouvant être fait au SpiderMass grâce au logiciel MOLO

Bien que les acquisitions *in-vivo* soient privilégiées lors des études cliniques, certaines contraintes, telles que la collaboration entre plusieurs centres d'investigation cliniques localisés dans plusieurs villes ou un temps limité pour la présence du sujet, peuvent rendre ces mesures impossibles. Dans ces cas, des prélèvements alternatifs peuvent être envisagés. Pour les pathologies du visage et du cuir chevelu, le prélèvement à l'aide de papier à cigarettes est recommandé, car il est totalement non-invasif et permet d'analyser le sébum. Ce papier (papier à cigarettes, JOB), dépourvu de gomme et d'additifs, offre l'avantage d'un signal de fond lié au support lui-même très faible lors des analyses SpiderMass. La méthode est simple, il suffit de plier le papier à cigarettes en deux, en laissant une partie non exposée aux lipides pour effectuer une mesure de blanc lors de chaque acquisition et le technicien frotte délicatement l'autre côté sur la zone à l'étude (**Figure 26 a) et b)**). L'autre méthode est le prélèvement par D-Squame®, conçue pour analyser le SC. Cette approche permet de collecter des squames superficielles. Contrairement au papier à cigarettes, le D-Squame® ne génère aucun signal lors de l'analyse SpiderMass. L'acquisition du blanc repose donc exclusivement sur la mesure du blanc environnant. Le prélèvement D-Squame® est également très simple à réaliser : le D-Squame® est appliqué côté adhésif sur la peau du sujet, puis fixé uniformément grâce à un applicateur qui exerce une pression homogène sur toute sa surface. Enfin, il est délicatement retiré de la peau grâce à une pince (**Figure 26 c) et d)**). Les analyses SpiderMass réalisées sur des prélèvements type papier à cigarettes ou D-Squame sont non destructives, comme l'illustre la **Figure 26e)** : après les tirs laser, le support reste intact, seuls de légers points blancs indiquent une simple déshydratation.

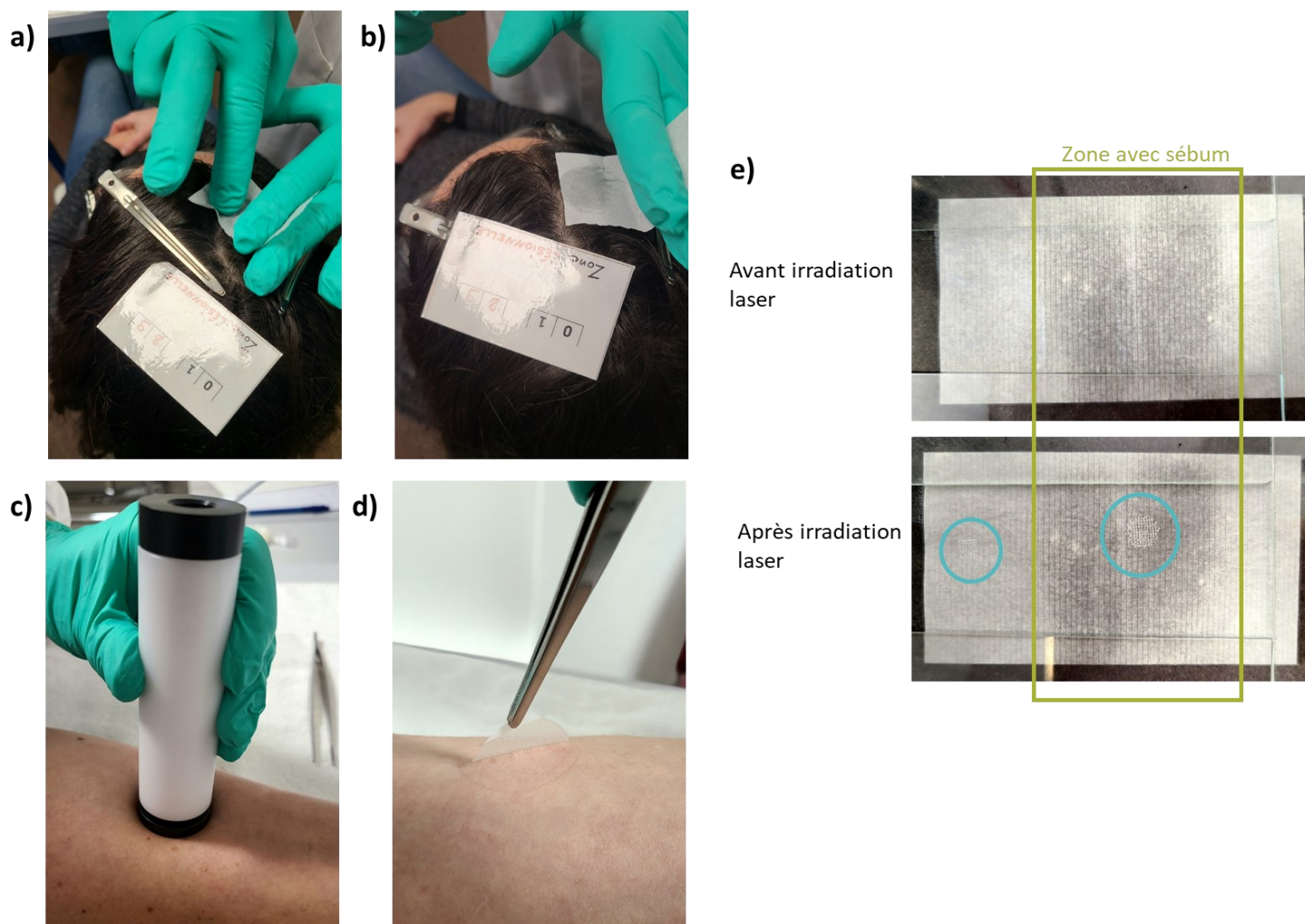


Figure 26 : Photos illustratives du prélèvement de sébum grâce à un papier à cigarettes. a) Le technicien après avoir identifié la zone, applique sur cette zone, un côté du papier à cigarettes afin de l'imprégner de lipide tout en gardant un côté intact. b) L'imprégnation de lipide se voit par transparence du papier à cigarettes. Photo illustrative du prélèvement du SC grâce à un D-Squame®. c) Le technicien place le D-Squame® côté adhésif sur la peau du sujet et place un applicateur dessus afin d'exercer une pression homogène sur toute sa surface, puis d) le D-Squame® est enlevé de la peau délicatement à l'aide d'une pince. e) L'analyse du papier à cigarettes ou du D-Squame® par SpiderMass est non destructive, après les tirs laser une déshydratation est observée par des points blancs sur le papier à cigarettes.

Après prélèvement, les échantillons de sébum sur papier à cigarettes et de SC sur D-Squame® sont conservés au congélateur à -80°C . Tous les échantillons d'une étude sont analysés en même temps afin de limiter les variations inter-jour et liés aux changements de température ambiants.

L'acquisition des données, qu'elle soit réalisée *in vivo* sur une zone riche en sébum ou à partir d'un prélèvement papier à cigarettes, fournit des informations globalement similaires. En comparant les spectres MS obtenus par SpiderMass *in vivo* sur le visage, une zone à forte production sébacée, avec ceux issus d'un prélèvement de sébum sur papier à cigarettes, ainsi qu'avec ceux acquis *in vivo* sur l'avant-bras, cette fois une zone pauvre en glandes sébacées, on observe que le profil MS obtenu *in vivo* sur le visage correspond à un mélange des spectres issus du sébum (papier à cigarettes) et de ceux du SC (in vivo avant-bras) (**Figure 27 spectres vert, noir et rose**). Les acquisitions *in vivo* révèlent donc des signaux supplémentaires par rapport aux prélèvements papier à cigarettes, provenant directement de la peau. Ainsi, les spectres obtenus à partir du papier à cigarettes reflètent principalement la composition du sébum, tandis que ceux réalisés *in vivo* sur le visage captent majoritairement les molécules lipidiques sébacées, tout en incluant des composés d'origine cutanée. Une observation similaire est faite en comparant les spectres MS obtenus à partir de prélèvements D-Squame sur l'avant-

bras (zone pauvre en sébum) avec ceux acquis *in vivo* au même endroit (**Figure 27 spectre rose et bleu**). Dans ce cas, les profils moléculaires sont équivalents, à l'exception notable d'une intensité et d'un nombre de signaux plus élevés lors de l'analyse *in vivo*.

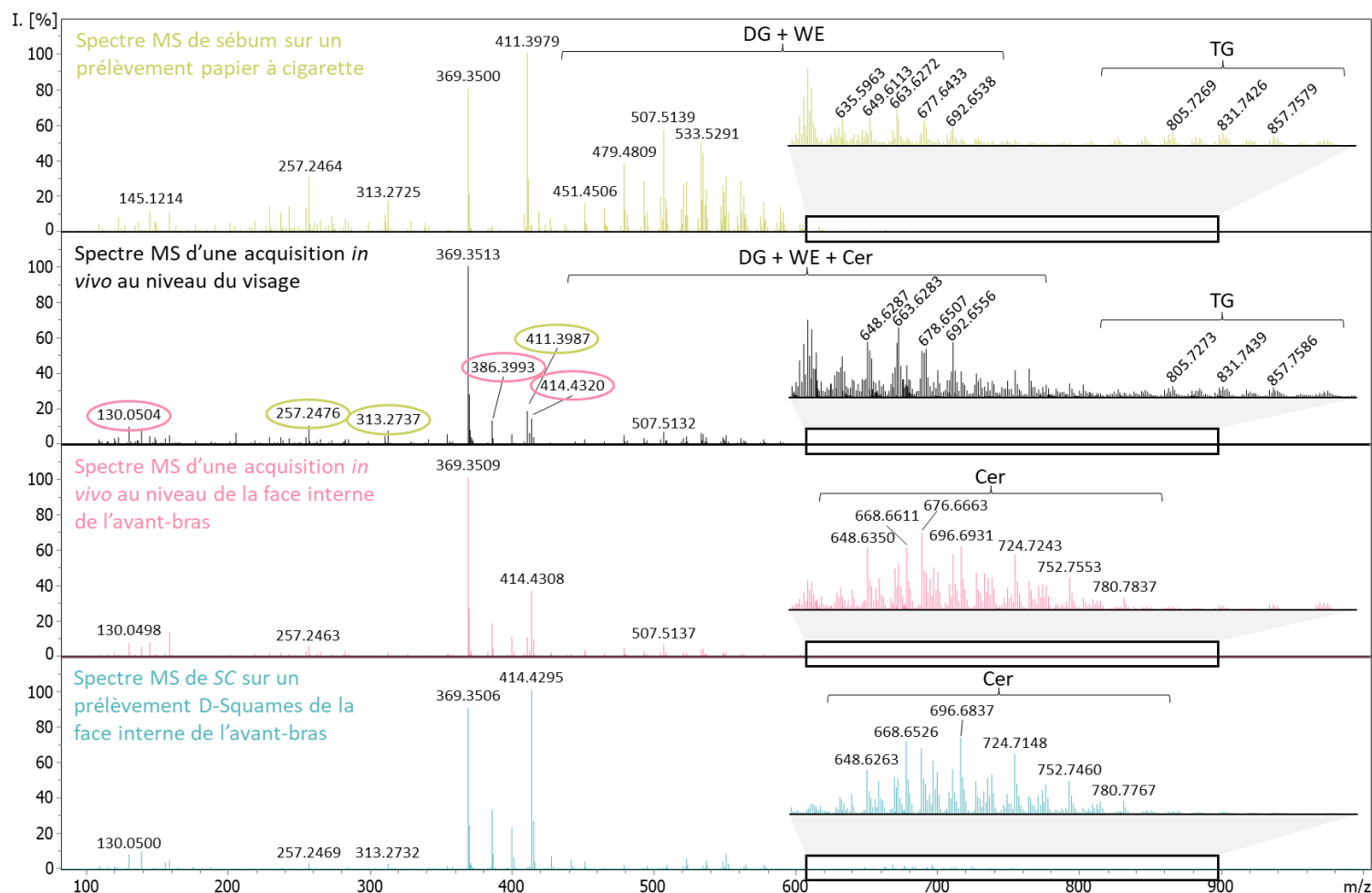


Figure 27 : Spectres MS issus d'un même sujet du sébum prélevé à l'aide d'un papier à cigarettes (spectre vert), acquisition *in vivo* sur le visage (spectre noir), zone à forte production sébacée, acquisition *in vivo* sur la face interne de l'avant-bras (spectre rose) et du SC prélevé à l'aide d'un D-Squame sur la face interne de l'avant-bras. Le spectre du visage (noir) présente un profil intermédiaire, combinant des ions retrouvés à la fois dans le spectre du sébum prélevé (vert) et dans celui de l'avant-bras (rose), illustrant ainsi la double origine des signaux observés en *in vivo* sur une zone à forte concentration en glandes sébacées. Les spectres MS du SC, obtenus par acquisition *in vivo* et par prélèvement D-Squame, présentent cette fois une similarité quasi identique.

Un matériels et méthodes des différentes acquisitions est disponible en **Annexe 1 : Matériels et Méthodes pour l'utilisation du SpiderMass**.

5.3.2 Le prétraitement et l'analyse statistique

Pour comparer les spectres MS obtenus avec le SpiderMass, un prétraitement des données est effectué par un logiciel développé en interne sur MatLab (MATrix LABORatory)(**Annexe 2 : Prétraitement des données par MatLab**). Ce prétraitement débute par le moyennage des spectres enregistrés durant la période d'irradiation ainsi que des signaux du blanc, qui correspondent soit aux 30 premières secondes d'acquisition, lorsque le spectromètre capte le blanc environnant, soit à l'enregistrement de la partie du papier à cigarettes sans lipides. Une fois ces moyennes établies, le signal moyen du blanc est soustrait de celui de l'irradiation. Chaque masse est ensuite normalisée par le TIC de son échantillon puis

par le spectre moyen de l'ensemble des échantillons, avant d'appliquer un filtrage des m/z basé sur différents seuils tel que l'intensité et le rapport signal/bruit (Signal to Noise Ratio, SNR). Bien que les seuils puissent être ajustés en fonction des objectifs spécifiques de chaque étude, des valeurs couramment utilisées incluent un seuil minimal d'intensité à 100, un SNR supérieur à 2, ainsi qu'un seuil du blanc fixé à 1×10^5 . Pour finaliser ce prétraitement, nous appliquons une transformation $\log_2$ afin d'obtenir une distribution plus symétrique, facilitant ainsi l'utilisation ultérieure de méthodes statistiques telles que le modèle linéaire en analyse différentielle.

Après le prétraitement, les données sont transmises aux statisticiens pour une analyse préliminaire dite « Data Quality » destinée à contrôler leur fiabilité. Cette vérification permet d'identifier et d'éliminer les pics contaminants, tels que ceux liés aux produits, tout en évaluant des indicateurs clés comme le nombre de zéros par masse (Cela correspond au nombre d'occurrences où un m/z présente une intensité nulle (valeur égale à zéro) dans l'un des échantillons de l'étude) et par sujet, le R600 (somme des masses supérieures à m/z 600 normalisé par le TIC), le SNR et le TIC. Ce contrôle est essentiel pour détecter d'éventuels effets liés aux batchs techniques, qu'ils soient liés au spectromètre de masse, au SpiderMass, ou à l'expérimentateur, ainsi que pour repérer les échantillons aberrants (outliers) pouvant résulter d'un non-respect du protocole d'un sujet ou d'un prélèvement insuffisant (par exemple en cas d'encrassement ou de peau très sèche). Les outliers, tels que tout échantillon contenant plus de 10 % de zéros (nombre de masse avec une intensité à 0), sont alors inexploitable et exclus des analyses.

Une fois la qualité des données validée, l'analyse statistique est réalisée en deux temps. L'analyse exploratoire consiste à visualiser et comprendre les données grâce à des outils d'analyses statistiques multivariées non supervisées tels que l'analyse en composantes principales (ACP), les boxplots, le clustering ou les heatmaps, permettant ainsi de repérer les effets batch techniques et biologiques, c'est-à-dire l'influence de facteurs extérieurs comme l'âge ou le sexe ou la calibration, qui seront pris en compte ultérieurement. L'analyse différentielle, quant à elle, repose sur un modèle linéaire mixte ajusté selon ses effets biologiques découverts afin d'identifier les masses exprimées différemment entre les groupes d'intérêt, avec une correction des tests multiples par la méthode de Benjamini-Hochberg (BH) pour limiter le risque de faux positifs. Selon les besoins de l'étude, un filtrage adaptatif (Adaptive Filtering, AF) peut également être appliqué pour ajuster la sévérité de cette correction BH, en filtrant les masses en fonction d'un critère tel que la moyenne, le maximum, le minimum, la variance ou le SNR, en déterminant pour chaque comparaison le filtre optimal.

5.3.3 L'identification des lipides et création d'une base de données

Une fois l'analyse statistique réalisée, seules les masses modulées et leurs Fold Change (FC) sont listés, sans aucune assignation moléculaire. Pour donner une interprétation biologique à ces résultats, il est donc indispensable d'identifier chaque pic de cette liste. Contrairement aux approches classiques de métabolomique et lipidomique, l'absence de séparation chromatographique avant l'analyse par spectrométrie de masse prive le processus de la notion de temps de rétention (RT). Pour pallier cette particularité, un processus spécifique aux analyses SpiderMass a été développé.

La première étape de ce processus consiste tout d'abord à filtrer les masses en fonction de leur FC_{abs} . En effet, les analyses génèrent souvent plusieurs centaines, voire milliers de m/z significativement modulés. Or, l'assignation des pics étant encore en grande partie manuelle, il est irréaliste d'en traiter un nombre aussi élevé. Pour cette raison, un filtre sur le FC_{abs} est appliqué. Le seuil varie selon les études, en fonction du nombre de masses à retraiter. Par exemple, si un seuil initial conduit à plus de 900 m/z à annoter, un seuil plus strict sera retenu afin de maintenir un volume de travail compatible avec une analyse manuelle dans les délais impartis. Une fois ce filtrage effectué, ces m/z sont croisées avec des bases de données comme HMDB²¹⁸ et LipidMaps^{®219,220}. Ce croisement se fait avec un delta de masse

de 0,01 Da. Ensuite, une sélection des annotations les plus probables est effectuée en s'appuyant sur la littérature scientifique.

Dans une seconde étape, chaque pic est ensuite fragmenté, et la fragmentation obtenue est analysée à l'aide de différents outils. CFM-ID génère des fragmentations *in-silico* pour une molécule donnée²²¹, mais pour ce faire il a besoin, soit du format InChI, soit du format SMILES de la molécule en question, tandis que MetFrag compare le spectre de fragmentation expérimental à des fragmentations *in silico* de molécules correspondant à la masse de l'ion parent²²². Concrètement, MetFrag fonctionne en deux étapes, d'abord, il compare la masse de l'ion parent aux masses théoriques des molécules présentes dans une base de données sélectionnée ensuite les molécules correspondantes sont fragmentées *in silico*, et ces fragmentations sont confrontées à celles de l'analyte obtenue expérimentale. En plus de CFM-ID et de MetFrag d'autres bases de données peuvent être utilisées à cette étape telles que qui, en plus des fragmentations *in silico*, peuvent contenir des données de fragmentation expérimentales. Enfin, il est également possible de comparer les fragmentations des masses inconnues à celles de standards analysés en amont.

Les fragmentations sont également analysées manuellement pour identifier précisément chaque molécule. Certaines familles de composés suivent des schémas de fragmentation spécifiques. Par exemple, les GLs se caractérisent par la perte successive de leurs chaînes lipidiques, comme illustré sur la **Figure 28**.

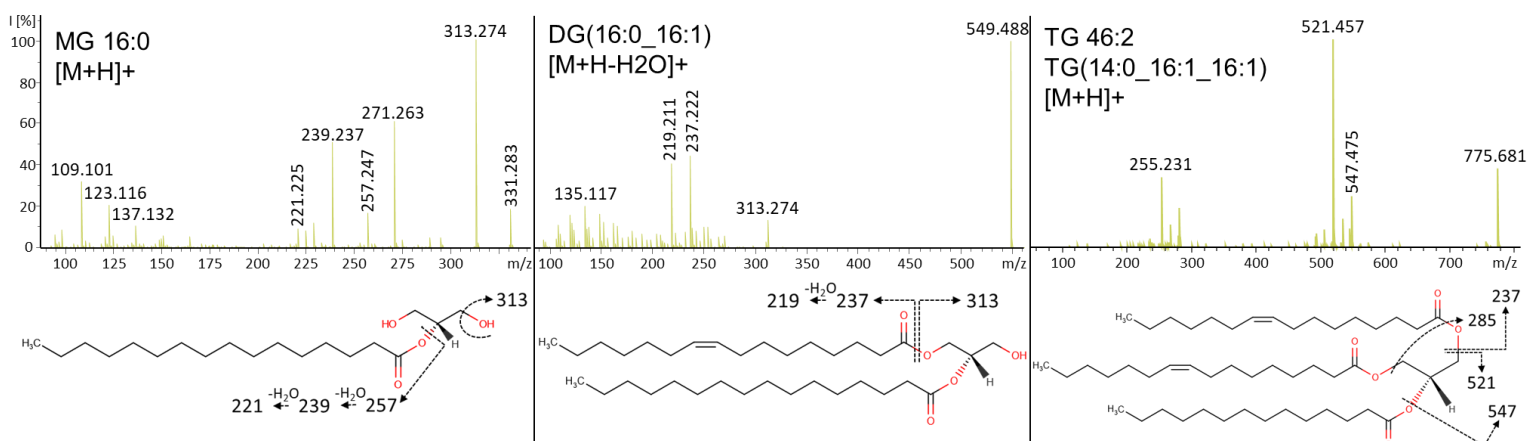


Figure 28 : Spectres et processus de fragmentation d'un monoglycéride, d'un diglycéride et d'un triglycéride présents sur la peau. La fragmentation des glycérolipides en SpiderMass se distingue par la perte successive de leurs chaînes lipidiques, accompagnée de pertes d'eau successives sur ces chaînes d'acides gras. DG : Diglycéride, MG : Monoglycéride, TG : Triglycéride.

Ce schéma de fragmentation s'applique également aux Cer, dont les spectres varient en fonction de la tête polaire et de la famille, comme montré par Kawana et al.⁹² Les analyses que nous avons réalisées sur la peau confirment ces observations, où deux Cer appartenant à la même famille présentent des fragments identiques à ceux de l'article lorsqu'ils possèdent une SPB de même taille (**Figure 29 a) et b)**). Une autre observation clé est que, quelle que soit la taille de la chaîne sphingoïde, la fragmentation suit le modèle décrit par Kawana et al. Pour les Cer[S], trois ions fils sont observés, avec un ion central d'intensité très élevée (**Figure 29 b)**). Les Cer[P] affichent un massif de quatre ions fils aux intensités similaires (**Figure 29 c)**). Les Cer[H] présentent également trois ions fils, avec une forte intensité pour l'ion central (**Figure 29 d)**). Enfin, les Cer[DS] montrent un profil légèrement différent : seuls deux ions fils majeurs sont visibles en SpiderMass, contrairement aux trois ions plus petits identifiés par Kawana et al. (**Figure 29 e) et f)**).

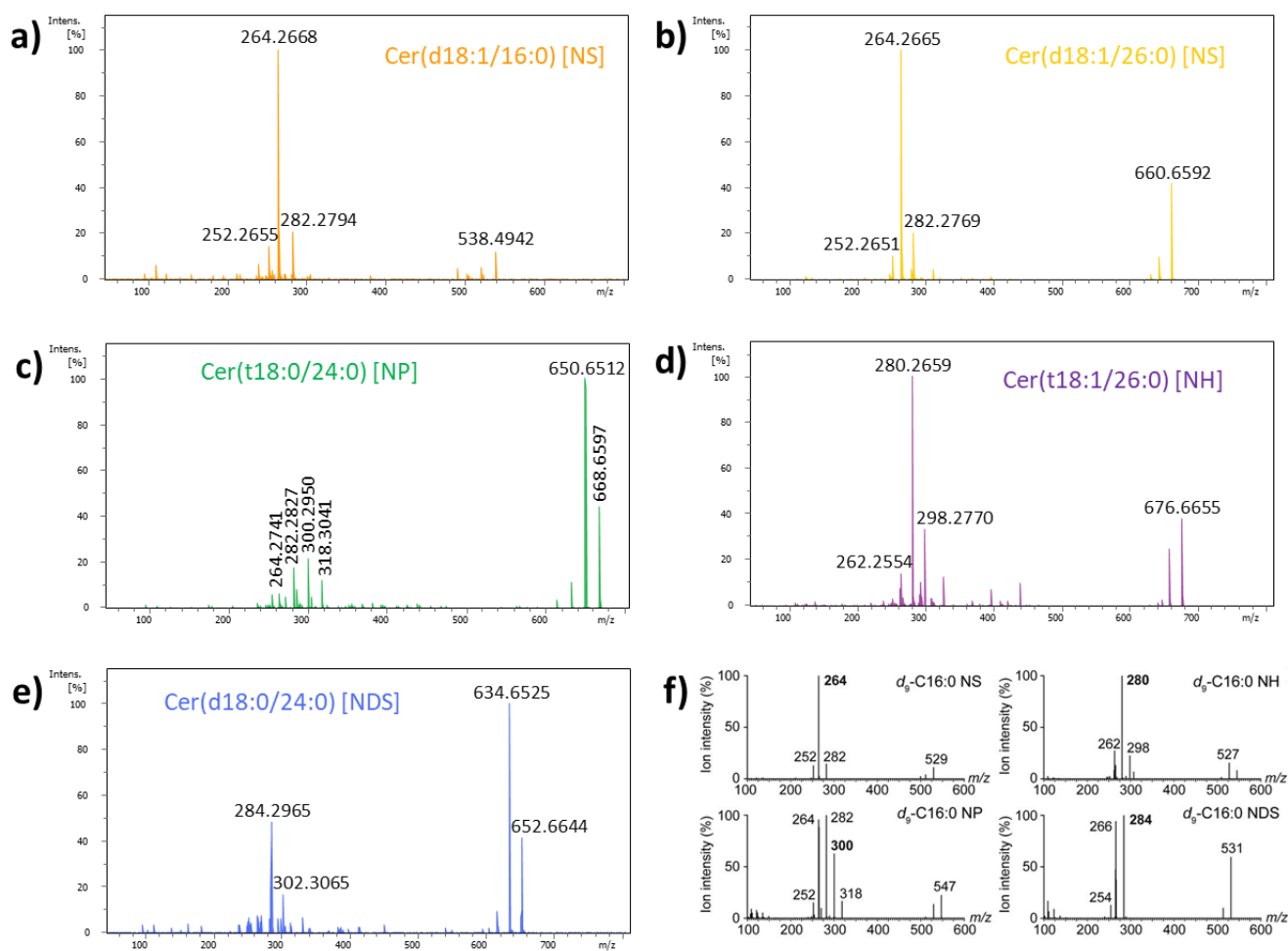


Figure 29 : Exemple de fragmentation a) de la Cer (d18:1/16:0) pour la famille de Cer[NS] ; b) de la Cer (d18:1/16:0) pour la famille de Cer[NS] montrant que la longueur de la chaîne d'acide gras n'influe pas sur les ions fils, c) de la Cer(t18:0/24:0) pour la famille de Cer[NP], d) de la Cer(t18:1/26:0) pour la famille de Cer [NH] et de la Cer(d18:0/24:0) pour la famille de Cer[NDS]. f) Spectre de fragmentation des standards de Cer des familles [NS], [NP], [NH] et [NDS] avec la Cer(d18:1/16:0) pour la famille [NS], la Cer(t18:0/16:0) pour la Cer[NP], la Cer(t18:1/16:0) pour la Cer[NH] et la Cer(d18:0/16:0) pour la Cer[NDS] adapté de Kawana et al.

Toutes ces données issues des différentes études cliniques ont été consolidées dans une base de données regroupant les molécules identifiées ainsi que leurs spectres de fragmentation. Aujourd'hui, cette base comprend plus de 1200 molécules, dont celles détectées par SpiderMass avec leurs spectres de fragmentation. Elle intègre également des molécules identifiées dans la peau grâce à des analyses LC-MS classiques, réalisées lors d'études au sein de PFDC ou par des prestataires externes. La banque de données a été créée sur le logiciel Bruker LibraryEditor. Grâce à la création de cette banque de données de molécules, un nouveau logiciel développé en interne sur MatLab permet désormais de comparer la liste des ions modulés dans une étude avec cette base de données. Ainsi le logiciel interne développé sous MatLab, génère des spectres *in silico* des ions parents qui peuvent être comparés aux données expérimentales. Concrètement, pour chaque ion de chaque molécule ajoutée, le logiciel crée un spectre théorique incluant l'ion parent avec sa masse monoisotopique ainsi que celles des deux premiers pics du massif isotopique. Après cette première comparaison basée uniquement sur la masse des ions parents, une seconde analyse est réalisée en confrontant les spectres de fragmentation expérimentaux à ceux enregistrés dans notre base de données, via le logiciel DataAnalysis. Cette approche utilisant la base de données créée spécifiquement pour le SpiderMass a significativement accéléré l'annotation des masses dans les études.

Grâce à la création de la Library SpiderMass, l'analyse des études réalisées avec SpiderMass suit désormais un processus structuré en plusieurs étapes. Tout d'abord, la liste des ions modulés dans une étude est croisée avec cette base de données, en comparant d'abord les ions parents, puis leurs spectres de fragmentation, comme décrit précédemment. Les m/z restant sans annotation passent ensuite par le workflow initial, impliquant une comparaison des masses des ions parents avec les bases de données en ligne HMDB et LipidMaps®. Chaque pic non annoté est ensuite fragmenté, et sa fragmentation est analysée à l'aide des outils CFM-ID, HMDB, MetFrag ou MassBank. Enfin, toutes les molécules nouvellement identifiées sont ajoutées à la Library SpiderMass pour enrichir continuellement la base de données. Ce processus est résumé en **Figure 30**.

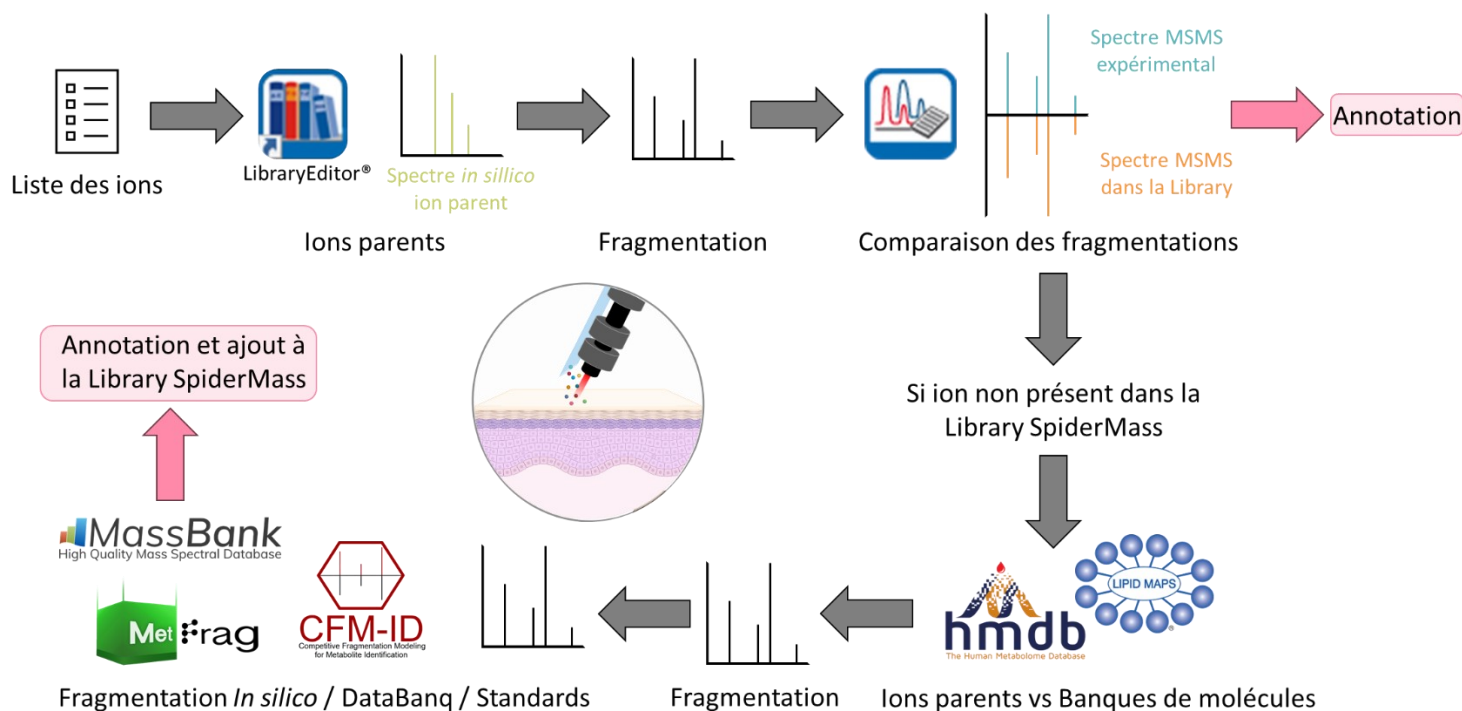


Figure 30 : Workflow des annotations des m/z des études cliniques faites au SpiderMass. Première étape : la liste des ions modulés dans une étude est croisée avec la base de données « Library SpiderMass », en comparant premièrement les ions parents via un logiciel interne fait sous MatLab, deuxième étape : leurs spectres de fragmentation sont comparés à ceux dans la « Library SpiderMass », via DataAnalysis. Troisième étape : Les m/z restant sans annotation passent par le workflow initial avec en quatrième étape : une comparaison des masses des ions parents avec les bases de données en ligne HMDB et LipidMaps®. Cinquième étape : Chaque pic non annoté est ensuite fragmenté, et sa fragmentation est analysée à l'aide des outils CFM-ID, HMDB, MetFrag ou MassBank. Enfin Sixième étape : toutes les molécules nouvellement identifiées sont ajoutées à la « Library SpiderMass » pour enrichir continuellement la base de données.

Malgré ce processus certains signaux observés en SpiderMass n'ont pas pu être annotés et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, leur intensité trop faible, notamment pour les masses supérieures à 850 Da, rendant les spectres de fragmentation trop peu riches pour avoir un intérêt. De plus, l'absence de méthode séparative en amont du SpiderMass entraîne l'arrivée simultanée de tous les ions dans le spectromètre de masse, avec plusieurs espèces isobariques à chaque m/z . La fenêtre de sélection du quadripôle étant de 1 u. ces différentes espèces sont alors sélectionnées en même temps en mode MS/MS. Les spectres MS/MS générés sont donc souvent des composites correspondants à la fragmentation de plusieurs lipides simultanément. Ainsi, si le pic d'intérêt n'est pas le plus intense des ions isobariques, sa fragmentation reste d'intérêt, à condition que son intensité soit suffisante, mais elle est souvent noyée dans celle de l'ion majoritaire. Pour contourner cette limitation, il aurait été nécessaire d'émettre une hypothèse sur l'identité de la molécule correspondant à ce pic, puis de fragmenter un standard de cette molécule. Une fois le spectre de fragmentation du standard obtenu, des algorithmes permettraient d'identifier la présence de cette molécule en comparant ses ions fils à

ceux du massif observé. Alternativement, l'utilisation d'un équipement disposant d'une cellule de mobilité ionique (IMS) offrirait un avantage important. Cependant, le spectromètre actuel n'est pas équipé d'une telle technologie.

Grâce à ces procédures, nous avons pu établir trois niveaux de confiance pour nos annotations. Le niveau 1 correspond à une identification confirmée par fragmentation MS/MS, où le spectre obtenu est identique à celui du standard de la molécule. Le niveau 2 repose également sur une identification par fragmentation MS/MS, mais sans disponibilité du standard pour validation directe. Enfin, le niveau 3 s'appuie uniquement sur la masse de l'ion parent, avec une annotation putative basée sur des logiciels, des bases de données et la littérature, sans recours à la fragmentation.

6 L'étude de quatre dermatoses inflammatoires par l'étude clinique SMPatho

Pour évaluer la pertinence du SpiderMass dans l'analyse de la peau, et son intérêt pour suivre les modifications moléculaires cutanées, il est essentiel de l'appliquer à des profils présentant de fortes différences. Ces variations marquées sont particulièrement visibles dans les dermatoses, qui entraînent d'importants bouleversements métaboliques. Afin de déterminer si le SpiderMass permettrait de détecter ces différences, le Dr Saudemont, qui a mis en place cette technologie au Centre de Recherches sur la Peau Pierre Fabre à Toulouse lors de sa thèse, a conçu l'étude SMPatho dédiée à l'analyse des dermatoses.

L'étude SMPatho était intitulée « Étude exploratoire, utilisant la spectrométrie de masse *in-vivo* en temps réel pour l'analyse des profils moléculaires de l'épiderme (notamment lipidique) de sujets atteints de dermatose inflammatoire chronique versus groupe contrôle ». Cette étude d'envergure a été soumise au Comité de Protection des Personnes (CPP) et a fait l'objet d'une étude clinique enregistrée ([NCT04472546](#)). Elle a inclus un total de 210 sujets répartis en 5 groupes selon la dermatose (acné, DA, Pso, DS et la rosacée). Chaque groupe était divisé en deux sous-groupes de 22 sujets avec un groupe témoin sain et un groupe pathologique. Cependant, en raison de difficultés de recrutement, le groupe Rosacée comprend respectivement 17 et 18 sujets, et le groupe DA pathologique seulement 21 sujets (**Annexe 3 : Critères d'éligibilité de SMPatho**). L'objectif principal de l'étude était de caractériser et d'analyser les profils moléculaires (principalement lipidique) des sujets atteints de dermatose et des sujets témoins, afin d'étudier l'impact de différents facteurs sur ces profils, tels que la dermatose elle-même et la zone topographique (zone lésionnelle (ZL), zone péri-lésionnelle (ZPL), qui se trouve à 1 cm de la ZL, et zone de référence (ZR) qui se trouve pour tous les groupes au niveau de la face interne de l'avant-bras. En complément, nous avons souhaité évaluer un paramètre biométabolique : l'hydratation, mesurée par l'indice d'hydratation (IH) et la PIE pour les sujets atteints de DA, sur les zones d'étude. Enfin, des photographies illustratives des ZL et ZPL ont été réalisées pour compléter ces données.

Dans cette étude, le groupe Acné et son sous-groupe contrôle associé, ont été les premiers analysés. Cependant, plusieurs problématiques ont limité l'intérêt de leur analyse, notamment le très faible nombre de m/z significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) modulés, quelle que soit la comparaison effectuée. Le recrutement des participants a été particulièrement long, s'étalant du 13 décembre 2019 au 12 août 2020, en raison du confinement lié au COVID-19. Cette période prolongée a probablement induit des effets de saisonnalité sur la peau des sujets atteints d'acné. De plus, une différence notable d'âge moyen a été observée entre les deux groupes : $23,41 \pm 3,51$ ans pour le groupe Acné contre $26,59 \pm 2,34$ ans pour le groupe contrôle. Les variations des profils moléculaires liées à l'acné semblent avoir été moins marquées que celles induites par les changements hormonaux, fréquents chez une population de moins de 30 ans. La longue durée d'inclusion a nécessité trois changements successifs de fibre optique, impactant la qualité du laser et donc l'efficacité de l'ablation, ce qui a pu introduire une variabilité supplémentaire dans les résultats. Par ailleurs, deux méthodes d'acquisition laser ont été utilisées, la méthode « point par point » et la méthode « continue ». Pour ce groupe, 102 mesures ont été réalisées avec la méthode « point par point », contre seulement 5 avec la méthode « continue », représentant uniquement 2 sujets. Or, la méthode d'acquisition laser influence fortement la quantité de matériel ablaté et, par conséquent, la qualité du signal. La méthode « point par point » prélève jusqu'à 10 fois moins de matière que la méthode « continue », rendant ces deux approches difficilement comparables. Pour garantir un nombre suffisant de données homogènes, seules les mesures effectuées avec la méthode « point par point » ont été conservées. Les données sur l'acné ont donc été laissées de côté et pour cette dermatose une nouvelle étude clinique serait nécessaire pour obtenir des résultats fiables et exploitables.

6.1 L'étude de la Dermatite Séborrhéique

6.1.1 L'étude SMPathoDS

Dans le groupe DS, et son sous-groupe contrôle associé, 44 sujets sont recrutés avec 22 sujets par sous-groupe, ces deux groupes étaient inclus en parallèle et les sujets appartenaient à la même tranche d'âge et étaient le plus équilibré possible selon le genre et le phototype (**Tableau 1**).

	Groupe DS	Groupe contrôle
Sexe	Hommes : 5 (22,73%) Femmes : 17 (77,27%)	Hommes : 5 (22,73%) Femmes : 17 (77,27%)
Age moyen ($\pm$ STD)	31,64 ($\pm$ 6,85) ans	34,23 ($\pm$ 6,34) ans
Age médian / Min-Max	30,5 ans / 20 ans – 44 ans	35 ans / 24 ans – 44 ans
Phototypes II / III	6 (27,27%) / 16 (72,73%)	3 (13,64%) / 19 (86,36%)

Tableau 1 : Tableau résumé des principales caractéristiques démographiques de la population analysée par SpiderMass dans l'étude SMPathoDS et répartie dans les deux sous-groupes : dermatose et sain. DS : Dermatite Séborrhéique ; STD : Standard déviation

Les sujets inclus dans le sous-groupe DS devaient présenter des lésions du cuir chevelu légères à modérées avec un score IGA compris entre 2 et 3 sur une échelle de cotation variant de 0 (absent) à 4 (sévère), un score d'érythème ≥ 1 sur une échelle de 0 (absent) à 3 (sévère) et des squames cliniquement visibles (**Figure 31**). Les zones à l'étude sont repérées et référencées grâce à des masques de repérage comme celui présent en **Figure 31d**). Dans ces deux sous-groupes, les zones ZL et ZPL étaient situées au niveau du cuir chevelu, tandis que la zone ZR se trouvait sur la face interne de l'avant-bras.

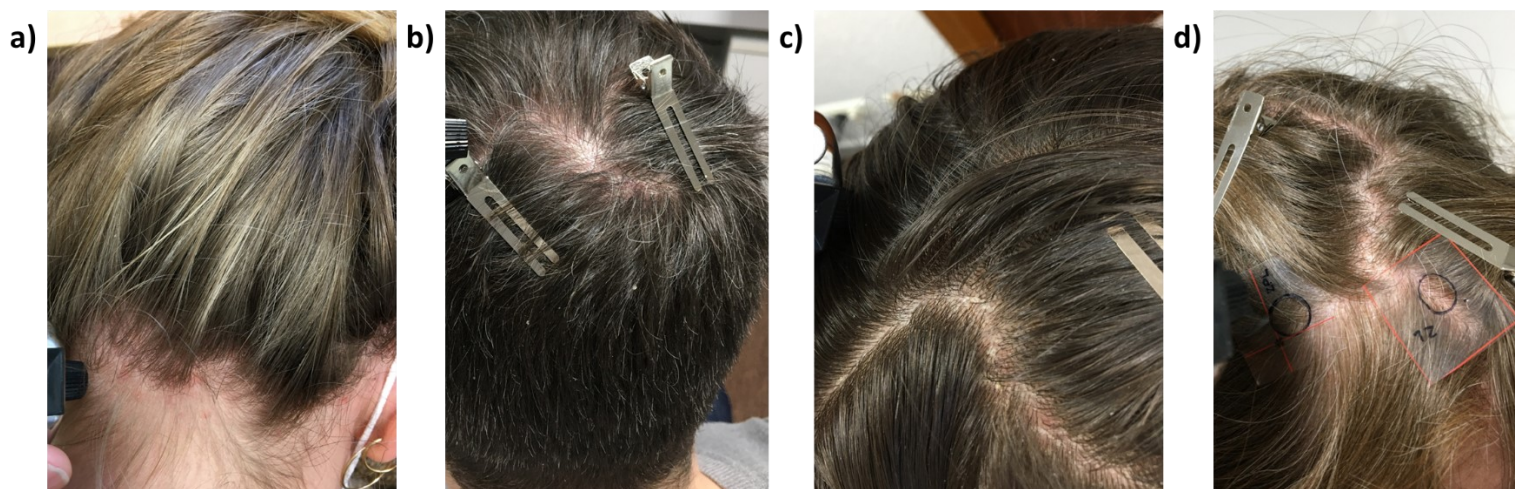


Figure 31 : Photographie de patients atteints de dermatite séborrhéique inclus dans l'étude SMPatho01 présentant des lésions sur le cuir chevelu a) sur le bas du cuir chevelu ; b) avec des squames ; c) avec des squames importantes ; d) avec des squames et des rougeurs.

Les prétraitements et les analyses statistiques faits pour ce groupe étaient ceux présentés dans la partie **5.3.2. Le prétraitement et l'analyse statistique**. Cependant, comme ce groupe a été inclus sur une très longue période à cause du confinement lié au COVID19, les prélèvements ont dû être regroupés en 3 groupes selon la date de passage au SpiderMass et un ajustement du modèle selon le TIC et selon la date a été opéré, sachant que le Groupe 1 correspondait aux prélèvements d'octobre-novembre 2020, le Groupe 2 correspondait aux prélèvements de décembre 2020 et le Groupe 3 correspondait aux prélèvements de janvier 2021. Par ailleurs pour la DS trois comparaisons ont été analysées en fonction

de la localisation du prélèvement (ZL vs ZPL) et de sa nature (papier à cigarettes sur cuir chevelu vs. SC *in-vivo*) :

- Prélèvement de sébum sur papier à cigarettes :
 - Comparaison des prélèvements de sébum du cuir chevelu sur les sujets DS aux prélèvements des sujets CTL (Sébum DS vs CTL)
- Prélèvement du SC en *in-vivo* :
 - Comparaison de la ZL des sujets DS avec le zone « lésionnelle » des sujets CTL (ZL DS vs CTL)
 - Comparaison de la ZL chez les sujets DS avec la ZPL des sujets DS (DS ZL vs ZPL)

6.1.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoDS

Comme pour chaque jeu de données à identifier un seuil sur le Fold Change absolu (FC_{abs}) a été appliqué avec un minimum pour $FC_{abs} \geq 1,5$. Cependant on a retrouvé un nombre limité de signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) et avec un $FC_{abs} \geq 1,5$, la totalité de ces signaux a été sélectionnée pour être identifiée sur les 3 comparaisons sélectionnées. Le descriptif de ces m/z ainsi que leur répartition dans les trois niveaux de confiance, est donnée en **Tableau 2** et sur les volcanoPlot en **Figure 32**.

	In-vivo DS ZL vs ZPL	In-vivo ZL DS vs CTL	Sébum ZL DS vs CTL
Signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$)	67	13	89
↑ ↓	18 49	1 12	34 55
Signaux après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,5$	41	13	56
↑ ↓	2 39	1 12	24 32
Signaux identifiés en Niveau 1 / Équivalent en molécules	0	0	1 1
Signaux identifiés en Niveau 2 / Équivalent en molécules	32 21	8 3	3 3
Signaux identifiés en Niveau 3 / Équivalent en molécules	8 6	4 4	10 3
Isotopes (niveau 2 et 3)	15	3	7
Non identifiés	1	1	42

Tableau 2 : Détail des signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) comprenant les signaux surproduits et les signaux sous-produits pour chacune des comparaisons étudiées dans l'étude SMPathoDS ainsi que les signaux obtenus après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ avec leur répartition dans les différents niveaux d'identification. CTL : Contrôle ; DS : Dermatitis Séborrhéique ; FC_{abs} : Fold Change absolu ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle.

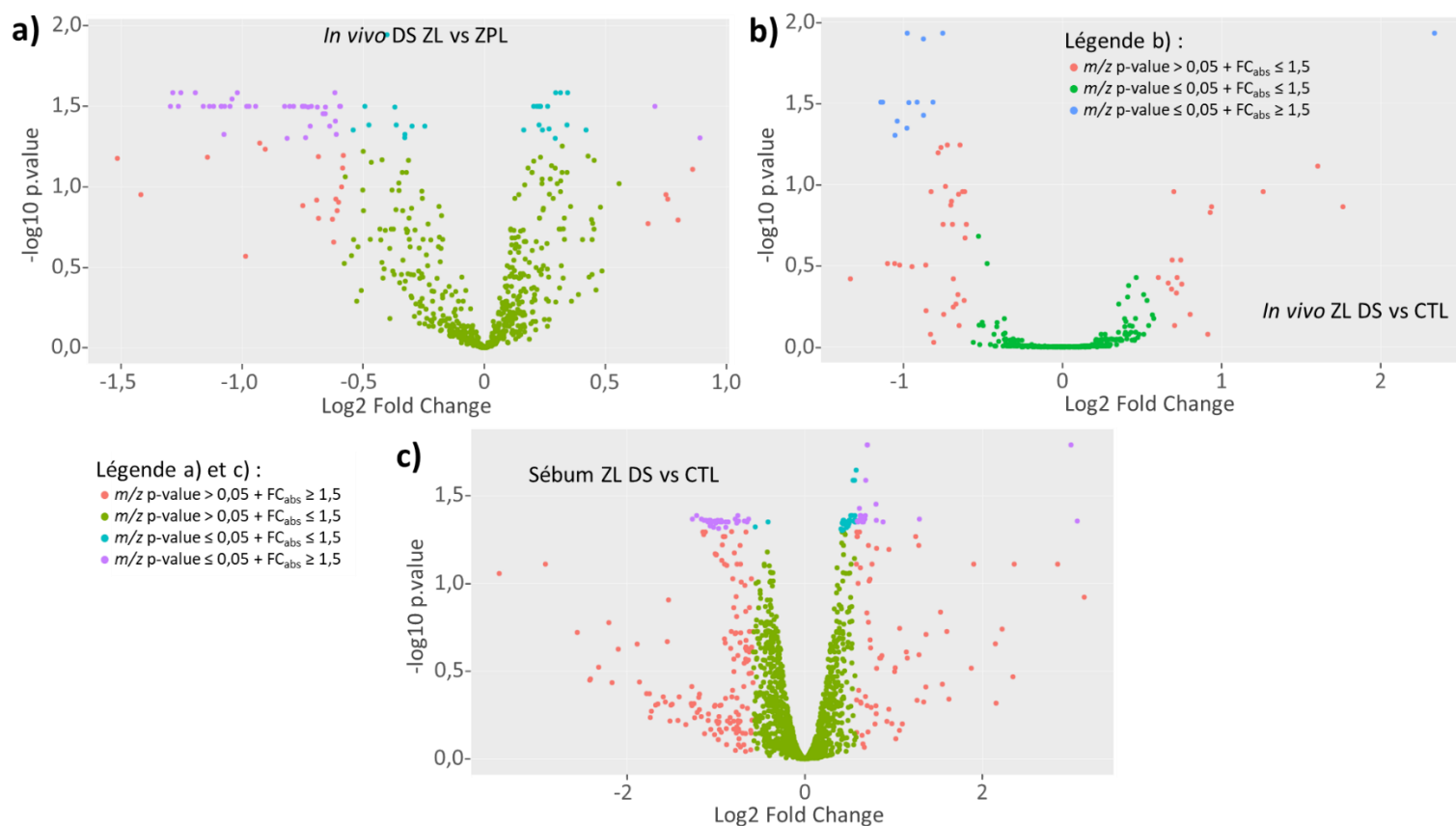


Figure 32 : VolcanoPlot des masses des 3 comparaisons a) In-vivo DS ZL vs ZPL ; b) In-vivo ZL DS vs CTL et c) Sébum ZL DS vs CTL de l'étude SMPathoDS. a) et c) : En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs mais ont un $FC_{abs} \geq 1,5$, en vert ce sont les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 1,5$, en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 1,5$ et enfin en violet sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) dans l'étude SMPathoDS et qui ont un $FC_{abs} \geq 1,5$. b) : En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 1,5$, en vert sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 1,5$ et enfin en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) dans l'étude SMPathoDS et qui ont un $FC_{abs} \geq 1,5$. CTL : Contrôle ; DS : Dermatite Séborrhéique ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle.

En comparant les masses significativement modulées et avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ entre les comparaisons *in-vivo* DS ZL vs ZPL et *in-vivo* ZL DS vs CTL, une seule masse de la *in-vivo* ZL DS vs CTL n'était pas retrouvée dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL. Cette masse correspondait à un aldéhyde gras. De plus, une seule masse commune était retrouvée entre les différentes matrices donc entre les comparaisons Sébum ZL DS vs CTL et *in-vivo* ZL DS vs CTL. Cette unique masse a été identifiée en niveau 2 comme un alkyl-acyldiglycérol.

6.1.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoDS

Dans l'analyse SMPathoDS, 18 molécules ont été identifiées par fragmentation, atteignant ainsi un niveau de confiance level 1 ou 2 selon la disponibilité des standards de référence (**Annexe 4 : Assignations SMPathoDS**). Leur classification repose sur la nomenclature de LipidMaps pour les lipides et de HMDB pour les métabolites. Parmi ces 18 molécules, plus de 80 % (soit 15 molécules) étaient retrouvées dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL. Elles se répartissaient en 4 super classes et 7 classes principales. En revanche, seules 3 molécules étaient détectées dans la comparaison *in-vivo* ZL DS vs CTL, couvrant 2 superclasses et 3 classes principales. Enfin, dans la comparaison Sébum ZL DS vs CTL, 4 molécules étaient identifiées, réparties en 4 superclasses et 4 classes principales.

Parmi ces 18 molécules, plusieurs appartenait à la famille des acyles gras, répartis en trois super classes. Étaient ainsi identifiés trois acides gras saturés, un aldéhyde gras et deux esters gras, dont un FAHFA (Fatty Acid Esters of Hydroxyl-Fatty Acids ou Fatty acid estolides ou en français ester d'acide gras ramifié par un acide gras hydroxylé) et un WE. Le FAHFA identifié était un ω -FAHFA, indiquant que la liaison entre les deux acides gras se situe en fin de chaîne. Toutes ces molécules étaient modulées dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL, à l'exception d'un acide gras libre saturé, le FA 16:0, qui était modulé uniquement dans la comparaison Sébum ZL DS vs CTL. Cependant, elles étaient toutes diminuées dans les ZL, tout comme les Aldéhydes Gras (FAL), WE et FAHFA. Cette baisse était également observée pour les acyles gras identifiés dans la comparaison *in-vivo* ZL DS vs CTL, notamment le FA 26:0 ainsi que le WE 28:0.

La deuxième superclasse modulée dans la DS était celle des GLs. Deux GLs ont été identifiés, un monoacylglycérol et un alkyl-acyldiglycérol. Tous deux étaient diminués dans les ZL des sujets atteints de DS par rapport aux ZPL. De plus, l'alkyl-acyldiglycérol était également réduit dans la comparaison Sébum ZL DS vs CTL.

Ensuite la superclasse présentant le plus de modifications en nombre de molécules dans l'étude SMPathoDS était celle des SPs. Parmi ces SPs, une augmentation était observée pour un Cer, et plus précisément un Cer[NH], dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL. Puis au total sept SPBs appartenant aux trois familles [S], [DS] et [P] ont été également identifiées et dont 6 étaient réduites dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL. La SPB 25:1;O2, appartenant à la famille [S], était également diminuée dans la comparaison *in-vivo* ZL DS vs CTL. La seule SPB non affectée dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL était la sphingosine, qui, en revanche, était retrouvée augmentée dans le sébum des sujets atteints de DS par rapport aux témoins.

Enfin, deux autres superclasses étaient modulées dans cette étude. La première concerne les stérols, avec une augmentation du cholestérol, identifié en niveau 1, dans le sébum des patients DS. La seconde correspond aux composés organohétérocycliques, plus précisément un imidazole de la classe des azoles, l'acide urocanique, dont la concentration était réduite dans la comparaison *in-vivo* DS ZL vs ZPL.

6.1.4 Discussion sur les résultats de SMPathoDS

L'ensemble des molécules identifiées dans cette partie de l'étude SMPatho pouvait être regroupé au sein de voies métaboliques spécifiques, telles que l'activité du microbiote cutané, en particulier celle de *Malassezia*, ainsi que la fonction barrière et le métabolisme des SPs.

Malassezia est le genre fongique le plus abondant de la flore cutanée humaine. Il joue un rôle clé dans la composition lipidique du sébum et du SC en raison de son activité lipasique élevée. Ses lipases, particulièrement adaptées à la dégradation des GLs présents en grande quantité dans le sébum^{126,127}, lui confèrent un avantage métabolique en lui fournissant les acides gras saturés essentiels à son métabolisme carboné. Cette activité s'est traduite par une sous-expression des MGs et des DGs sur le cuir chevelu des patients atteints de DS dans l'étude. Une diminution similaire était également observée pour les acides gras libres FFAs à très longue chaîne et saturés, tels que les FA 24:0 et FA 26:0. Ces lipides, dont la concentration était réduite dans l'étude SMPathoDS, jouent pourtant un rôle crucial dans le maintien d'une flore cutanée équilibrée via leur implication contre les déséquilibres microbiens par leur groupement acide.

La fonction barrière de la peau repose en grande partie sur le système « brick and mortar » du SC. Une perturbation de l'une des deux parties de ce système entraîne un défaut au sein du SC et, par conséquent, une altération de la fonction barrière. Une modification de la partie « mortier », donc de la

partie lipidique, se traduit notamment par une réduction de la longueur des chaînes lipidiques présentes dans le SC, entraînant une diminution globale de ces lipides essentiels. Dans l'étude SMPathoDS, cette altération était observable sur plusieurs lipides clés, notamment les FFAs les plus abondants dans le SC, FA 24:0 et FA 26:0, ainsi que sur le FAHFA 48:2;O, plus précisément le FAHFA 18:2/30-O-30:0, qui possède une très longue chaîne. De plus, une réduction des SPBs était également constatée. L'impact de la DS sur la fonction barrière cutanée est connu depuis les années 1990²²³, mais ce n'est qu'à la fin des années 2010 qu'une corrélation entre cette altération et les modifications du profil lipidique est établie²²⁴. Aujourd'hui, plusieurs études confirment un remodelage lipidique du SC dans la DS, caractérisé par une réduction de la longueur des chaînes des Cer^{225,226}, une augmentation des Cer[NS]^{1,139,143}, ainsi qu'une hausse du nombre d'insaturation¹⁴², des modifications également observées dans la DA. Ces résultats font directement écho aux observations de SMPathoDS, qui a mis en évidence une diminution des lipides à longue chaîne, soulignant ainsi leur rôle crucial dans l'équilibre et la protection de la barrière cutanée.

L'altération de la fonction barrière cutanée repose également sur des modifications de la partie « brick » du SC, constituée principalement des protéines structurales telles la FLG et la kératine. Il est bien établi que les patients atteints de DA présentent une diminution de l'expression du gène de la FLG, ce qui impacte la cohésion et l'hydratation de l'épiderme. Cependant, cette réduction d'expression n'est pas encore étudiée chez les patients atteints de DS. Au-delà de son rôle structural, la FLG est à l'origine de la libération d'acides aminés, précurseurs de l'acide trans-urocanique et l'acide pyroglutamique²²⁷, constituant les NMF. Dans l'étude SMPathoDS, une diminution de l'acide trans-urocanique était observée dans les ZL, suggérant un déséquilibre du NMF. Une explication possible réside dans le rôle de la phytosphingosine, qui était sous-produite dans les ZL des sujets DS. Cette molécule est aujourd'hui reconnue pour stimuler l'expression des gènes codant la FLG et les enzymes responsables de sa dégradation, favorisant ainsi la production d'acides aminés et donc de dérivés hygroscopiques²²⁸. Sur une peau saine, la phytosphingosine permet donc d'optimiser le NMF en régulant la quantité et la dégradation de la FLG. À l'inverse, dans la DS, sa diminution entraînerait un affaiblissement de cette cascade biologique, compromettant ainsi l'hydratation et la fonction protectrice de la peau, comme l'a révélé l'étude SMPathoDS.

Bien que la composante inflammatoire était moins marquée dans l'étude SMPathoDS, comparée aux trois autres pathologies analysées, une augmentation de la sphingosine était observée dans la comparaison Sébum ZL DS vs CTL. Or, la sphingosine est le précurseur de la sphingosine-1-phosphate (S1P), une molécule clé dans la réponse immunitaire cutanée, notamment dans la régulation de l'inflammation et la défense contre les microorganismes²²⁹. Cette augmentation suggérerait ainsi un mécanisme de réponse immunitaire actif dans la DS, bien que moins intense que dans d'autres dermatoses inflammatoires.

6.1.5 Conclusion sur SMPathoDS

La DS est une maladie bien étudiée en lipidomique et métabolomique, avec des modifications cutanées, notamment du SC, largement documentées dans la littérature. Les principales transformations incluent la dégradation des GLs en FFAs due à l'augmentation de *Malassezia*¹²⁷, l'élévation de marqueurs inflammatoires comme l'histamine¹²⁸ et des changements dans le profil des Cer, avec une hausse des Cer[NS] et Cer[AS] et une baisse des Cer[NDS], [NP], [AP], [NH]²³⁰, ainsi qu'une diminution du cholestérol cutané²³¹. L'étude SMPathoDS a confirmé certaines de ces modifications, notamment la diminution des chaînes dans les FFAs et un FAHFA, contrairement à Rousel et al., qui l'observe dans les Cer. Cependant, elle a révélé des différences par rapport à la littérature, notamment une augmentation du cholestérol dans le SC des patients DS, ce qui pourrait être dû à la méthode de

prélèvement utilisée, qui inclut les lipides du sébum contrairement à l'analyse Raman de Fukuda et al. De plus, peu de Cer étaient identifiés comme significativement modifiés dans la DS, contrairement aux tendances observées récemment, ce qui pourrait s'expliquer par une méthode de prélèvement encore nouvelle et moins robuste. Enfin, le groupe DS a été étudié sur une longue période, ce qui pourrait avoir entraîné une plus grande variabilité des résultats. Néanmoins, même si des développements restent encore à réaliser, ces résultats démontrent la force de la technologie SpiderMass pour suivre *in-vivo* ces variations biologiques chez les sujets DS.

6.2 L'étude de la Dermatite Atopique

6.2.1 L'étude SMPathoDA

Le groupe DA et son groupe contrôle associé comptaient un total de 43 sujets, dont 21 atteints de DA et 22 sains. Les sujets inclus dans le sous-groupe DA devaient présenter une DA localisée aux membres supérieurs (ZL et ZPL), avec une forme légère à modérée, caractérisée par un SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) compris entre 15 et 40. De plus, une sécheresse cutanée d'un score ≥ 2 sur une échelle de 0 (absent) à 3 (sévère) était requise pour l'inclusion. Quelques exemples de ZL des patients DA inclus dans l'étude SMPathoDA sont illustrés en **Figure 33**. La ZR se trouvait sur la face interne de l'avant-bras, sur une zone sans lésion.

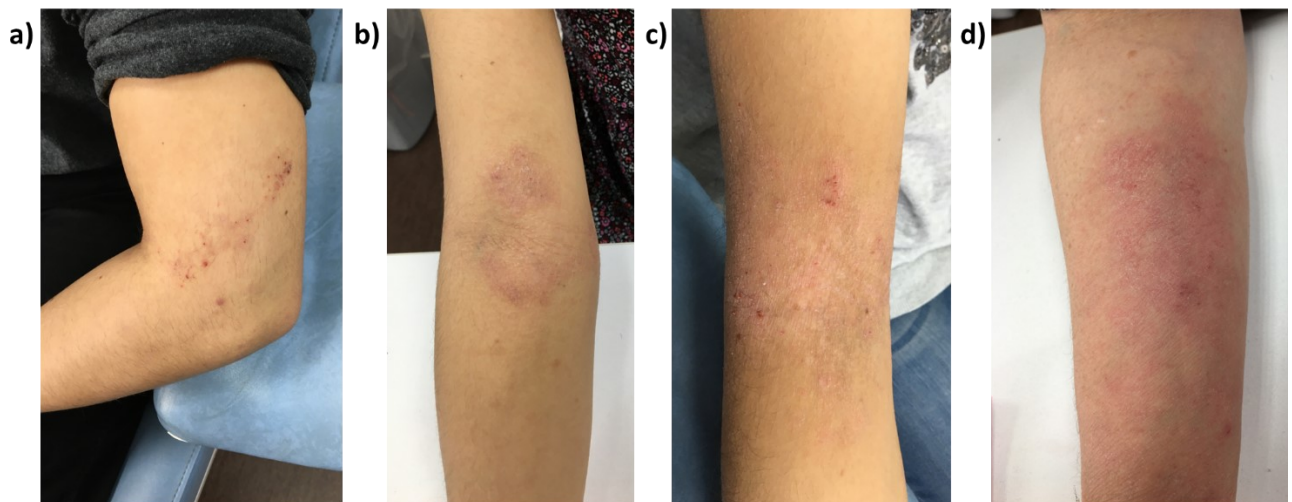


Figure 33 : Photographies de patients atteints de dermatite atopique inclus dans l'étude SMPatho01 présentant une plaque lésionnelle, dominée par la xérose et les lichénifications a) sur le bras ; b) dans le pli du coude ; c) dans le pli du coude ; d) sur l'avant-bras.

Au cours de l'inclusion du sous-groupe DA et de son sous-groupe contrôle associé, la méthode d'acquisition laser a été modifiée, passant de la méthode « point par point » à la méthode « continue ». L'analyse de qualité des données a révélé un écart trop important entre les spectres obtenus avec ces deux techniques. Il a donc été nécessaire d'exclure les spectres acquis par la méthode « point par point », en raison de leur intensité plus faible et du nombre insuffisant de sujets concernés. Ainsi, l'analyse statistique des données SpiderMass a été réalisée sur une population totale de 30 sujets seulement correspondant aux acquisitions réalisées en mode continu, répartis équitablement avec 15 sujets par groupe (DA et CTL), dont le détail des caractéristiques est résumé dans le **Tableau 3**.

	Groupe DA	Groupe contrôle
Sexe	Hommes : 2 (13,33%) Femmes : 13 (86,67%)	Hommes : 3 (20,00%) Femmes : 12 (80,00%)
Age moyen ($\pm$ STD) Age médian / Min-Max	26,87 ($\pm$ 6,66) ans 26 ans / 20 ans - 45 ans	37,60 ($\pm$ 6,76) ans 38 ans / 29 ans - 49 ans
Phototypes II / III / IV	3 (20,00%) / 8 (53,33%) / 4 (26,67%)	2 (13,33%) / 13 (86,67%) / 0

Tableau 3 : Tableau résumé des principales caractéristiques démographiques de la population analysée par SpiderMass dans l'étude SMPathoDA et répartie dans les deux sous-groupes : dermatose et sain. DA : Dermite Atopique ; STD : Standard déviation.

Les prétraitements et les analyses statistiques faites pour se groupe étaient exactement ceux donnés dans la partie **5.3.2. Le prétraitement et l'analyse statistique** avec un ajustement du modèle selon le TIC. Et pour cette pathologie les comparaisons étudiées étaient :

- Inter-groupe :
 - Comparaison des ZR entre les sujets DA et les sujets CTL (ZR DA vs CTL)
 - Comparaison des ZL des sujets DA et les « zones lésionnelles » des sujets CTL (ZL DA vs CTL)
- Intra-groupe :
 - Comparaison chez les sujets DA des ZL avec les ZPL (DA ZL vs ZPL)
 - Comparaison chez les sujets DA des ZL avec les ZR (DA ZL vs ZR)

6.2.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoDA

Dans la partie DA de l'étude SMPatho nous avons trouvé un nombre conséquent de signaux modulés dans les différentes comparaisons et principalement pour les comparaisons ZL DA vs CTL et DA ZL vs ZR avec plus de 300 signaux modulés pour chacune. Au vu du nombre important de signaux modulés et à identifier l'attention a été faite sur les signaux qui ont un $FC_{abs} \geq 2$. Le descriptif des masses significativement modulées (p -value $\leq 0,05$) sur les 4 comparaisons ainsi que les signaux qui ont un $FC_{abs} \geq 2$ et leur répartition dans les trois niveaux de confiance, où l'on retrouve les 3 mêmes niveaux de confiance que pour la DS, est donnée en **Tableau 4** et sur les volcanoplot en **Figure 34**.

	ZR DA vs CTL	ZL DA vs CTL	DA ZL vs ZR	DA ZL vs ZPL
Signaux modulés significativement (p -value $\leq 0,05$)	106	377	337	191
↑ ↓	1 105	72 305	137 200	62 129
Signaux après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 2$	16	243	49	8
↑ ↓	1 15	41 202	8 41	0 8
Signaux identifiés en Niveau 1 / Équivalent en molécules	0	0	0	0
Signaux identifiés en Niveau 2 / Équivalent en molécules	7 / 6	138 / 71	35 / 23	6 / 5
Signaux identifiés en Niveau 3 / Équivalent en molécules	4 / 3	60 / 45	9 / 7	0
Isotopes (niveau 2 et 3)	2	73	13	1
Non identifiés	5	45	5	2

Tableau 4 : Détail des signaux modulés significativement (p -value $\leq 0,05$) comprenant les signaux surproduits et les signaux sous-produits pour chacune des comparaisons étudiées dans l'étude ainsi que les signaux obtenus après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 2$ avec leur répartition dans les différents niveaux d'identification. CTL : Contrôle ; DA : Dermite Atopique ; FC_{abs} : Fold Change Absolu ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle ; ZR : Zone de référence.

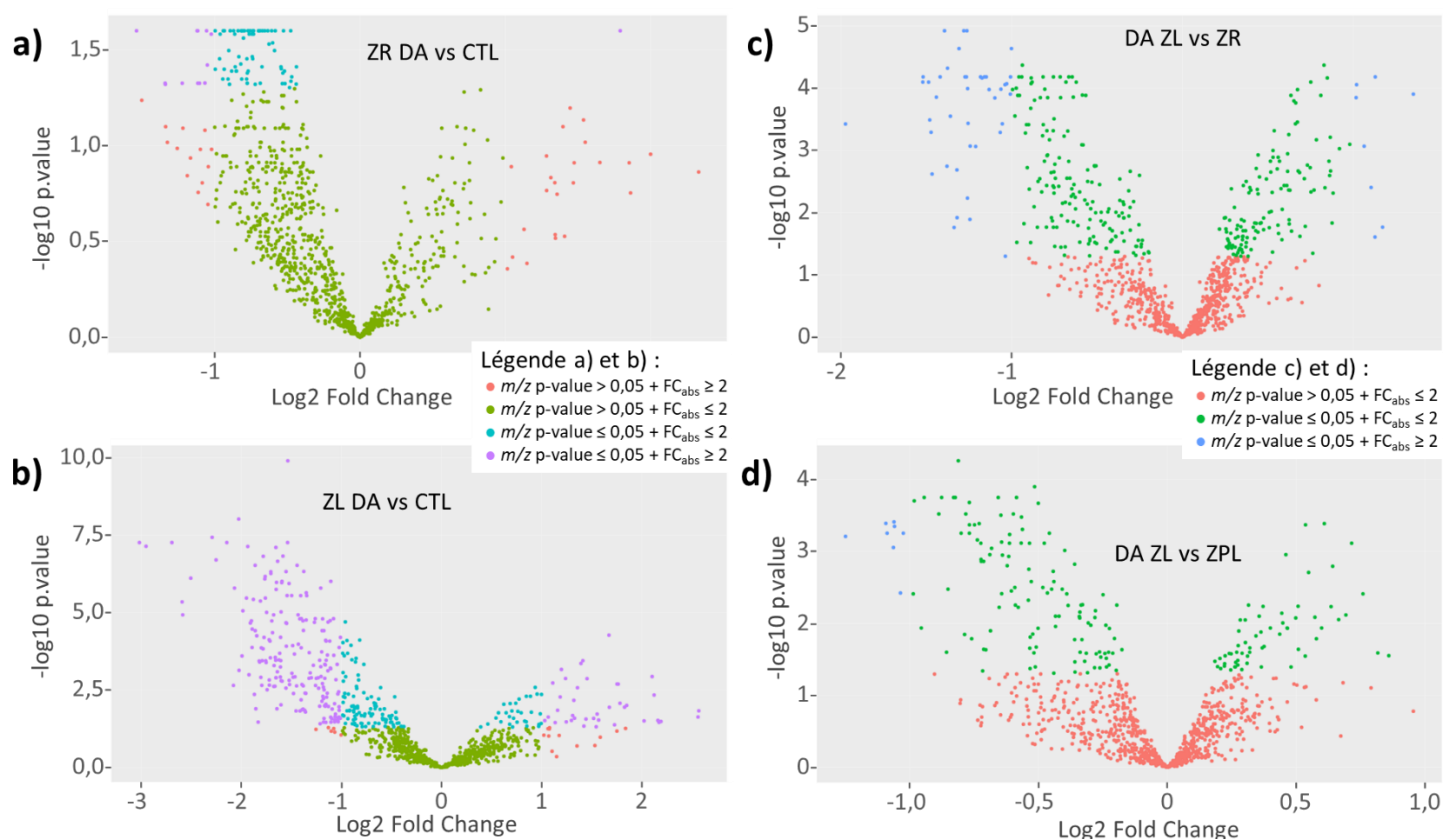


Figure 34 : VolcanoPlot des masses des 4 principales comparaisons a) ZR DA vs CTL ; b) ZL DA vs CTL ; c) DA ZL vs ZR et d) DA ZL vs ZPL de l'étude SMPathoDA. a) et b) En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs mais ont un $FC_{abs} \geq 2$, en vert ce sont les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 2$, en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 2$ et enfin en violet sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) dans l'étude SMPathoDA et qui ont un $FC_{abs} \geq 2$. c) et d) : En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 2$, en vert sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 2$ et enfin en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) dans l'étude SMPathoDA et qui ont un $FC_{abs} \geq 2$. CTL : Contrôle ; DA : Dermate Atopique ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle ; ZR : Zone de référence

La comparaison des masses significativement modulées avec un $FC_{abs} \geq 2$ révèle une forte concordance entre les comparaisons. Parmi les 49 masses identifiées dans la comparaison DA ZL vs ZR, 43 étaient également présentes dans la comparaison ZL DA vs CTL. De plus, les 8 masses communes à la comparaison DA ZL vs ZPL et à la comparaison DA ZL vs ZR se retrouvaient également dans la comparaison principale ZL DA vs CTL. En revanche, sur les 16 masses différentielles observées dans ZR DA vs CTL, seulement 3 étaient partagées avec la comparaison principale, DA ZL vs ZR. Ces trois masses correspondaient à l'alpha-tocophérol acétate (niveau 2), un HexCéramide (niveau 3) et un pic du massif isotopique de WE 40:3.

6.2.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoDA

Dans l'étude SMPathoDA, un total de 81 molécules ont été identifiées par fragmentation (niveau 2) (**Annexe 5 : Assignations SMPathoDA**). Leur classification suit la nomenclature de LipidMaps pour les lipides et HMDB pour les métabolites. La majorité de ces molécules, soit 72, étaient retrouvée dans la comparaison ZL DA vs CTL, réparties en 7 super classes et 15 classes principales. En revanche, la comparaison ZR DA vs CTL ne révélait que 6 molécules modulées, appartenant à 2 super classes et 2 classes principales. Ensuite dans la comparaison DA ZL vs ZR, 24 molécules identifiées étaient réparties

en 4 super classes et 8 classes principales. Enfin, la comparaison DA ZL vs ZPL mettait en évidence 5 molécules, réparties en 3 super classes et 4 classes principales.

Parmi les 81 molécules identifiées, 17 appartenaient à la classe des Acyles gras, comprenant 8 FFAs (5 saturés et 3 insaturés), 2 prostaglandines, 3 FAL, 2 WEs et 2 FAHFA. Toutes ces molécules étaient modulées dans ZL DA vs CTL et/ou dans DA ZL vs ZR. Dans la ZL des sujets DA, les molécules en augmentation par rapport aux sujets CTL incluaient les acides gras saturés à moyenne et longue chaîne, les 2 prostaglandines dérivées de la Prostaglandine F2 α , les WEs à chaîne courte, ainsi que l'acide arachidonique, également accru dans DA ZL vs ZR. À l'inverse, les molécules diminuées dans la ZL des sujets DA par rapport aux CTL sont les acides gras libres saturés et les acides gras libres insaturés à très longue chaîne, les aldéhydes gras (également à très longue chaîne) et les FAHFAs. Ces derniers, identifiés comme ω -FAFAH, possèdent une liaison entre les deux acides gras en fin de chaîne. Ils affichaient une diminution marquée, avec des FC pouvant atteindre -6, et sont également réduits dans les comparaisons DA ZL vs ZR et DA ZL vs ZPL.

La deuxième super classe influencée par la DA était celle des GLs, avec 11 molécules identifiées en niveau 2. Parmi ces GLs, 5 GLs étaient diminués dans la peau non lésionnelle des sujets DA par rapport aux sujets CTL, tandis que 4 TGs, 1 DG et 1 monoglycéride étaient augmentés dans la peau lésionnelle des sujets DA par rapport aux sujets CTL.

Ensuite la plus grande super classe impactée par la DA était celle des SPs, avec 42 molécules affectées. Parmi elles, 12 SPBs étaient diminuées, principalement dans la comparaison ZL DA vs CTL, mais également dans les comparaisons DA ZL vs ZR et DA ZL vs ZPL. Ces diminutions concernaient 4 familles : [S], [DS], [H] et [P], avec des chaînes plutôt longues, à l'exception de la phytosphingosine. Concernant les Cer, qui formaient la classe principale la plus modulée, 30 molécules étaient significativement affectées dans 2 comparaisons : ZL DA vs CTL, où 26 Cer étaient modifiés, et DA ZL vs ZR, avec 4 autres Cer modifiés. Sur l'ensemble, différentes familles de Cer étaient modulées de manière distincte. 4 familles étaient moins concentrées dans les ZL, à savoir les 6-hydroxy-sphingosines ([NH]), les phytoceramides ([NP] et [AP]) et les dihydrosphingosines ([NDS]) à chaîne longue. En revanche, une seule famille, les sphingosines ([NS]), était plus concentrée dans les ZL. Les rapports [NS]/[NP] étaient calculés respectivement pour les deux comparaisons, passant de 0,43 à 1,16 dans ZL DA vs CTL et de 0,37 à 1,16 dans DA ZL vs ZR.

Le seul prénoïde identifié dans cette étude était l' α -tocophérol acétate, avec un FC de 2,72 pour la comparaison ZR DA vs CTL et un FC de 3,6 pour la comparaison ZL DA vs CTL. En outre, les 9 molécules identifiées en niveau 2 restantes étaient des métabolites. Parmi celles-ci, un dipeptide, 4 acides aminés, un imidazole (l'urocanate), deux indoles (l'adrénochrome et l'acide indolelactique) et un carbonyle (le 2-Hydroxybenzaldéhyde). Le dipeptide, ainsi que la citrulline et l'acide pyroglutamique, étaient diminués dans les comparaisons ZL DA vs CTL et DA ZL vs ZR. L'acide glutamique et l'histidine, quant à eux, étaient diminués uniquement dans ZL DA vs CTL. L'urocanate était réduit dans la peau lésionnelle des sujets DA comparée à celle des contrôles, ainsi qu'à la peau péri-lésionnelle et non lésionnelle des sujets DA. Enfin, les indoles étaient diminués dans ZL DA vs CTL, tandis que le 2-Hydroxybenzaldéhyde était augmenté dans cette même comparaison.

6.2.4 Discussion sur SMPathoda

L'ensemble des molécules identifiées dans cette partie de l'étude SMPathoda pouvaient être regroupées dans des voies métaboliques liées à la fonction barrière, à l'état inflammatoire et au stress oxydatif.

Dans la DA, les deux parties du système « brick and mortar » sont perturbées. La perturbation de la partie « mortier » se manifeste par une diminution des FFAs à très longue chaîne et des molécules qui en découlent, telles que les Cer, les SPBs et les FAHFAs, en raison d'une baisse de l'expression des élongases comme ELOVL1 et ELOVL4^{141,142}. Cette diminution des chaînes se reflétait non seulement sur les FFAs dans cette étude, mais également sur les SPBs, dont la variation ne dépendait pas tant de leur famille, mais plutôt de la longueur de leurs chaînes. En effet, les SPBs à chaîne longue, ainsi que la phytosphingosine, étaient diminuées dans les ZL par rapport aux ZR. Ensuite les FAHFAs, molécules sécrétées par les kératinocytes, impliquées dans la synthèse des acylcéramides et la fonction de biosurfactant^{232,233} étaient également affectées par la diminution de l'expression des élongases²³⁴ diminuant le nombre de FAHFAs à chaîne longue et très longue dans les lésions de DA. Tout comme les FFAs, les Cer étaient affectés par la diminution de l'expression des élongases, ce qui a entraîné une réduction des Cer à chaîne longue et une augmentation des Cer à chaîne courte chez les sujets atteints de DA, comme le montrent nos résultats ainsi que d'autres études^{1,225}. En règle générale, la quantité de Cer diminuait dans les ZL, notamment pour les familles Cer[NP], Cer[AP], Cer[NH] et Cer[NDS] à chaîne longue. Cependant, certaines familles de Cer, comme les Cer[NS], ont vu leur quantité augmenter dans ces zones corrélée avec ce qui est trouvé dans la littérature^{1,139,143}. La diminution des Cer à chaîne longue affecte directement la fonction barrière de la peau via une diminution du nombre d'interactions. De plus, les phytocéramides (familles [NP] et [AP]) jouant également un rôle essentiel dans le maintien de la fonction barrière par des liaisons hydrogène plus fortes, leur diminution entraîne inévitablement une perte accrue en eau transépidermique. Enfin le rapport [NS]/[NP], qui est fortement corrélé à la perte d'eau transépidermique et au SCORAD, était bien plus élevé dans les ZL des sujets DA comparées à celles des CTL ou des ZR des sujets DA. Un rapport plus élevé indique une perturbation importante de l'état de la barrière épidermique¹⁴⁶. En effet, Nădăban et al. ont démontré que bien que la longueur de chaîne des Cer soit réduite dans les ZL, la tête des Cer a un impact significatif sur le maintien de la fonction barrière²³⁵. La modification du profil des Cer, associée à la diminution des FFAs à très longue chaîne et des FAHFAs, a conduit à une altération de la fonction barrière, ce qui était également observé par l'Aquaflux®. Cette perturbation était marquée par une augmentation de la PIE dans les ZL des sujets DA par rapport aux sujets sains (p-value < 0,0001).

La FLG, protéine clé du système « brick and mortar » du SC par ses acides aminés donnant des dérivés d'acides aminés hygroscopiques a chez une partie des patients atteints de DA, son gène muté, entraînant une diminution de cette protéine et, par conséquent, des acides aminés et de leur dérivés notamment hygroscopiques^{154,236,237}. Dans le cadre de cette étude, il a été observé que ces acides aminés étaient fortement diminués sur la peau lésionnelle, par rapport à la peau non lésionnelle, avec une réduction pouvant aller jusqu'à un facteur de 6. En plus de l'acide trans-urocanique et l'acide pyroglutamique, la dégradation de la FLG entraîne également la libération de citrulline. Cet acide aminé résultant de la citrullination des arginines présentes sur la FLG, se produit dans 78% à 75% des résidus sur les peaux saines et non lésionnelles respectivement²³⁸. Cependant, dans les peaux lésionnelles, ce processus est diminué, avec seulement 62% des résidus, comme l'a démontré Winget et al. Cette diminution de la citrulline observée dans l'étude SMPathoDA peut donc s'expliquer par cette altération de la citrullination. De plus, la biosynthèse de la citrulline, qui se fait à partir de l'arginine par l'enzyme Nitric Oxide Synthase (NOS), est inhibée dans la DA, contribuant ainsi à la baisse des niveaux de citrulline.

L'acide arachidonique est la molécule la plus représentative de l'état inflammatoire. Cet acide gras, un éicosanoïde, est produit par toutes les cellules cutanées. Il joue un rôle clé dans les processus homéostatiques et les réponses inflammatoires en tant que médiateur lipidique et précurseur de plusieurs prostaglandines et oxylipines²³⁹. Depuis longtemps, une augmentation de la concentration de

cet acide gras est observée dans les peaux lésionnelles des patients DA²⁴⁰⁻²⁴² ce qui était également observé dans l'étude SMPathoDA (comparaisons ZL DA vs CTL et DA ZL vs ZR).

Le stress oxydatif désigne l'oxydation des composés biologiques dans notre corps par des radicaux libres. Ce phénomène joue un rôle pathogène majeur dans la DA, mais notre compréhension de ce mécanisme reste encore aujourd'hui limitée. En effet, une revue de la littérature récente (2020) recense seulement 33 publications entre 1992 et 2019, soit environ 1,18 article par an, un nombre relativement faible comparé aux nombreuses études menées sur le rôle du stress oxydatif dans d'autres maladies²⁴³. L'alpha-tocophérol, ou vitamine E, reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, particulièrement dans la peau humaine, combat les ROS produits après exposition aux UV^{244,245}. Cependant, les résultats concernant la quantification de l'alpha-tocophérol chez les patients atteints de DA sont contradictoires. Par exemple, Oh et al.²⁴⁶ ont rapporté une diminution significative des taux sériques par rapport aux témoins sains, tandis que Hoppu et al.²⁴⁷ n'ont pas observé de différence significative dans le sérum. D'autres études, comme celles de Hozyasz et al.²⁴⁸, ont constaté une diminution de la vitamine E dans les érythrocytes des enfants atteints de DA par rapport aux enfants sains. Cependant, Antille et al.²⁴⁹ ont trouvé une augmentation significative de ce biomarqueur dans les échantillons de peau non lésionnelle des sujets DA. Une différence a également été notée entre les ZR des sujets DA et les contrôles, soulignant la complexité du métabolisme de la vitamine E dans le contexte de la DA²⁴³. Dans l'étude SMPathoDA, seule la forme alpha-tocophérol acétate a été mesurée comme étant significativement modulée. Cette forme stable de la vitamine E, largement utilisée en cosmétique et en médecine pour la complémentation, est cependant non bioactive²⁵⁰.

Tout comme la vitamine E, les prostaglandines jouent un rôle clé dans l'inflammation, étant impliquées dans le stress oxydatif, comme dans le cas du vitiligo²⁵¹ ou de la DA²⁵². Les deux prostaglandines identifiées dans cette étude étaient des dérivés de la Prostaglandine F₂α, une molécule bien connue pour induire des démangeaisons chez les sujets atteints de DA²⁵². L'augmentation des prostaglandines est liée à une activation accrue de la voie de biosynthèse des cyclooxygénases (COX), les principales enzymes responsables de la synthèse des prostaglandines, et cette voie est également intensifiée chez les patients DA²⁵². L'élévation significative de ces molécules souligne clairement l'aspect inflammatoire de la DA.

Une autre molécule influençant le stress oxydatif et modulée de manière significative dans cette étude était l'adrénochrome o-semiquinone, que l'on observait diminuée dans la ZL par rapport à la peau non lésionnelle des sujets DA, ainsi qu'en comparaison avec les contrôles. L'adrénochrome est la forme oxydée de l'adrénaline, l'hormone du stress, et un précurseur de la mélanine^{253,254}, le pigment principal de la peau. Ce dernier est particulièrement réactif au stress oxydatif, comme on peut l'observer après une exposition intense aux UV, par exemple lors de coups de soleil. L'adrénochrome o-semiquinone est un agent réducteur qui réagit rapidement en présence d'oxygène²⁵⁵. Sa diminution dans les ZL entraîne probablement une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, augmentant ainsi le stress oxydatif.

6.2.5 Conclusion sur SMPathoDA

La DA est la pathologie de cette thèse bénéficiant du plus grand nombre de références dans la littérature, avec de nombreuses études en lipidomique et métabolomique ayant mis en évidence d'importantes modifications moléculaires. L'un des marqueurs les plus significatifs était la forte altération du profil des Cer. On observait une diminution globale de ces lipides, accompagnée d'un déséquilibre de leurs proportions, avec une augmentation des Cer[NS] et Cer[AS], hausse du taux d'insaturation, réduction de la longueur des chaînes, ainsi qu'une baisse des phytosphingosines, entraînant une augmentation du ratio Cer[NS]/Cer[NP] correspondant à ce qu'on retrouve dans la littérature^{1,139,143,225}. Cette modification de la longueur des chaînes s'explique en partie par une

diminution de l'expression des élongases, impactant également les FFAs^{141,142}. Au-delà des SPs, Schafer et al. rapportent une réduction des phospholipides et des esters de stérols, ainsi qu'une augmentation des FFAs chez les patients atteints de DA²⁴⁰ que nous n'avons pas retrouvé dans l'étude SMPathoDA. D'autres études révèlent une diminution des DGs et TGs, ainsi qu'une augmentation des glycérophospholipides, notamment les phosphatidyléthanolamines et les acides phosphatidiques²⁵⁶, mais aussi des phosphatidylcholines²⁵⁷. Par ailleurs, une réduction du squalène et des WEs a déjà été rapportée sur la peau atopique^{98,258}. Concernant le métabolisme des acides aminés, plusieurs études indiquent une diminution des dérivés d'acides aminés hygroscopiques, ainsi que de la citrulline dans les peaux atteintes de DA^{154,236–238}. Ilves et al. ont également mis en évidence une diminution de l'acétyl-carnitine et une augmentation de certains acides aminés, notamment le glutamate, la méthionine, la glutamine, l'asparagine, l'arginine et la lysine. Ils observent également une élévation de la putrescine et de la diméthylarginine asymétrique (ADMA)²⁵⁷. L'étude SMPathoDA a confirmé plusieurs de ces altérations, en particulier les modifications du profil des Cer, la diminution des dérivés d'acides aminés hygroscopiques et les perturbations des FFAs, bien que nous apportions une distinction entre FFAs à chaîne courte et longue. Toutefois, certaines divergences sont notables, notamment l'augmentation des niveaux de TGs et de WEs dans l'étude, alors que la littérature rapporte plutôt une diminution de ces molécules. Enfin, l'étude SMPathoDA a mis en lumière des biomarqueurs encore peu documentés dans la littérature, tels que deux dérivés de prostaglandines, l'adrénochrome O-semiquinone et l'alpha-tocophérol acétate. Ces résultats démontrent ainsi que le SpiderMass permet de retrouver une partie des altérations lipidiques caractéristiques de la DA, tout en révélant de nouvelles informations.

6.3 L'étude du Psoriasis

6.3.1 L'étude SMPathoPso

Dans ce troisième groupe de l'étude SMPatho, la pathologie du Pso a été explorée à travers un groupe Pso et son groupe contrôle associé, comprenant au total 44 sujets, répartis en 22 pour chaque sous-groupe. Comme pour les deux groupes précédents, les sujets des deux sous-groupes étaient inclus simultanément et appartenaient à la même tranche d'âge, avec une répartition aussi équilibrée que possible en termes de genre. Les participants du sous-groupe Pso devaient présenter un Pso en plaque érythémato-squameux léger à modéré, avec un score IGA (Investigator Global Assessment) compris entre 2 et 3 sur une échelle allant de 0 (clair) à 5 (très sévère). Les critères d'inclusion nécessitaient également qu'ils présentent au moins une ZL avec un score d'érythème ≥ 1 (échelle variant de 0 à 3), un score de desquamation entre 1 (léger) et 2 (modéré) (échelle variant de 0 à 3), et un score d'œdème égal à 0 (absent) sur une échelle de 0 à 3. Les ZL pouvaient ainsi se situer sur les membres supérieurs ou inférieurs, tandis que les ZPL, toujours placées à 1 cm des ZL, devaient impérativement être exemptes de fissures et de croûtes. Les ZR, quant à elles, étaient situées pour tous les sujets sur la face interne de l'avant-bras. Des exemples des ZL des sujets Pso inclus dans l'étude sont montrés en **Figure 35**.

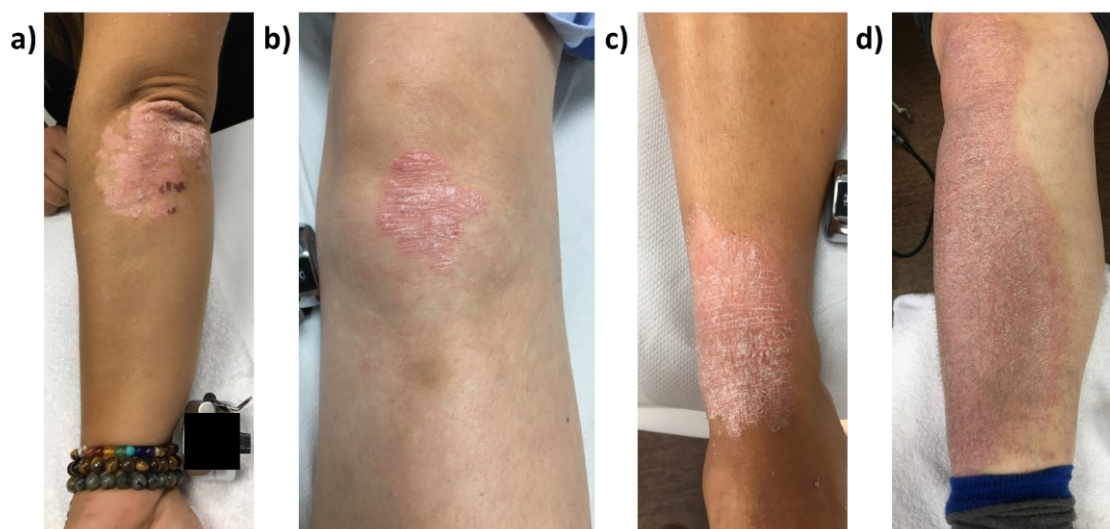


Figure 35 : Photographies de patients atteints de psoriasis inclus dans l'étude SMPatho01 présentant une plaque squameuse et prurigineuse a) sur le coude ; b) sur le genou ; c) sur la cheville ; d) étendue sur la jambe.

Après la revue des acquisitions, deux sujets ont été supprimés de l'analyse SpiderMass car leur calibration semblait compromise. L'analyse statistique des données SpiderMass s'est faite donc sur une population totale de 42 sujets avec 21 sujets par groupe, le détail des caractéristiques est résumé dans le **Tableau 5**.

	Groupe Pso	Groupe CTL
Sexe	Hommes : 9 (44,86%) Femmes : 12 (57,14%)	Hommes : 10 (47,62%) Femmes : 11 (52,38%)
Age moyen (+/-STD)	39,05 (+/- 8,70) ans	41,19 (+/- 10,74) ans
Age médian / Min-Max	39 ans / 24 ans – 53 ans	44 ans / 20 ans – 53 ans
Phototypes II / III / IV	3 (14,29%) / 17 (80,95%) / 1 (4,76%)	3 (14,29%) / 17 (80,95%) / 1 (4,76%)

Tableau 5 : Tableau résumé des principales caractéristiques démographiques de la population analysée par SpiderMass dans l'étude SMPathoPso et répartie dans les deux sous-groupes : dermatose et sain. CTL : Contrôle ; Pso : Psoriasis ; STD : Standard déviation.

Le prétraitement et les analyses statistiques faites pour se groupe sont ceux donnés dans la partie **5.3.2. Le prétraitement et l'analyse statistique** avec un ajustement du modèle selon le TIC et avec l'étape d'AF en moins car ce traitements des données n'était pas recommander pour ce jeu de données. Pour rappel l'AF est une approche statistique utilisée pour ajuster la sévérité de cette correction BH, en filtrant les masses en fonction d'un critère, permettant d'augmenter la puissance statistique et de limiter les faux positifs, tout en conservant les signaux les plus pertinents pour l'étude biologique. En effet un grand nombre de signaux sortent significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) et l'AF demandais une grande suppression de signaux pour ajouter des signaux significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$). Pour le psoriasis les comparaisons étudiées étaient :

- Inter-groupe :
 - Comparaison des ZL entre les sujets Pso et les sujets CTL (ZL Pso vs CTL)
 - Comparaison des ZR entre les sujets Pso et les sujets CTL (ZR Pso vs CTL)
- Intra-groupe :
 - Comparaison chez les sujets Pso des ZL avec les ZR (Pso ZL vs ZR)
 - Comparaison chez les sujets Pso des ZL avec les ZPL (Pso ZL vs ZPL)
 - Comparaison chez les sujets Pso des ZPL avec les ZR (Pso ZPL vs ZR)

6.3.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoPso

Comme pour la partie DA dans les groupes Pso et son sous-groupe associé un grand nombre de signaux étaient modulés dans les différentes comparaisons et principalement pour les comparaisons ZL Pso vs CTL, Pso ZL vs ZR et Pso ZL vs ZPL où l'on retrouvait plus de 200 signaux significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) pour chacun. Au vu de ce nombre important de signaux à identifier l'analyse s'est faite uniquement sur les masses qui ont un $FC_{abs} \geq 2$. Le descriptif des masses significativement modulées sur les 5 comparaisons ainsi que les signaux qui ont un $FC_{abs} \geq 2$ et leur répartition dans les trois niveaux de confiance est donnée en **Tableau 6** et sur les volcano plot en **Figure 36**.

	ZL Pso vs CTL	Pso ZL vs ZR	Pso ZL vs ZPL	Pso ZPL vs ZR	ZR Pso vs CTL
Signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$)	215	367	269	91	64
↑ ↓	92 123	96 271	75 194	24 67	64 0
Signaux après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 2$	102	97	77	1	2
↑ ↓	42 60	15 82	13 64	1 0	2 0
Signaux identifiés en Niveau 1 / Équivalent en molécules	4 / 2	2 / 1	2 / 1	0	0
Signaux identifiés en Niveau 2 / Équivalent en molécules	64 / 59	53 / 48	40 / 28	0	2 / 2
Signaux identifiés en Niveau 3 / Équivalent en molécules	25 / 17	29 / 19	24 / 17	0	0
Isotopes (niveau 1, 2 et 3)	24	19	14	0	0
Non identifiés	9	13	11	1	0

Tableau 6 : Détail des signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) comprenant les signaux surproduits et les signaux sous-produits pour chacune des comparaisons étudiées dans l'étude Pso ainsi que les signaux obtenus après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 2$ avec leur répartition dans les différents niveaux d'identification. CTL : Contrôle ; FC_{abs} : Fold Change absolu ; Pso : Psoriasis ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle ; ZR : Zone de référence.

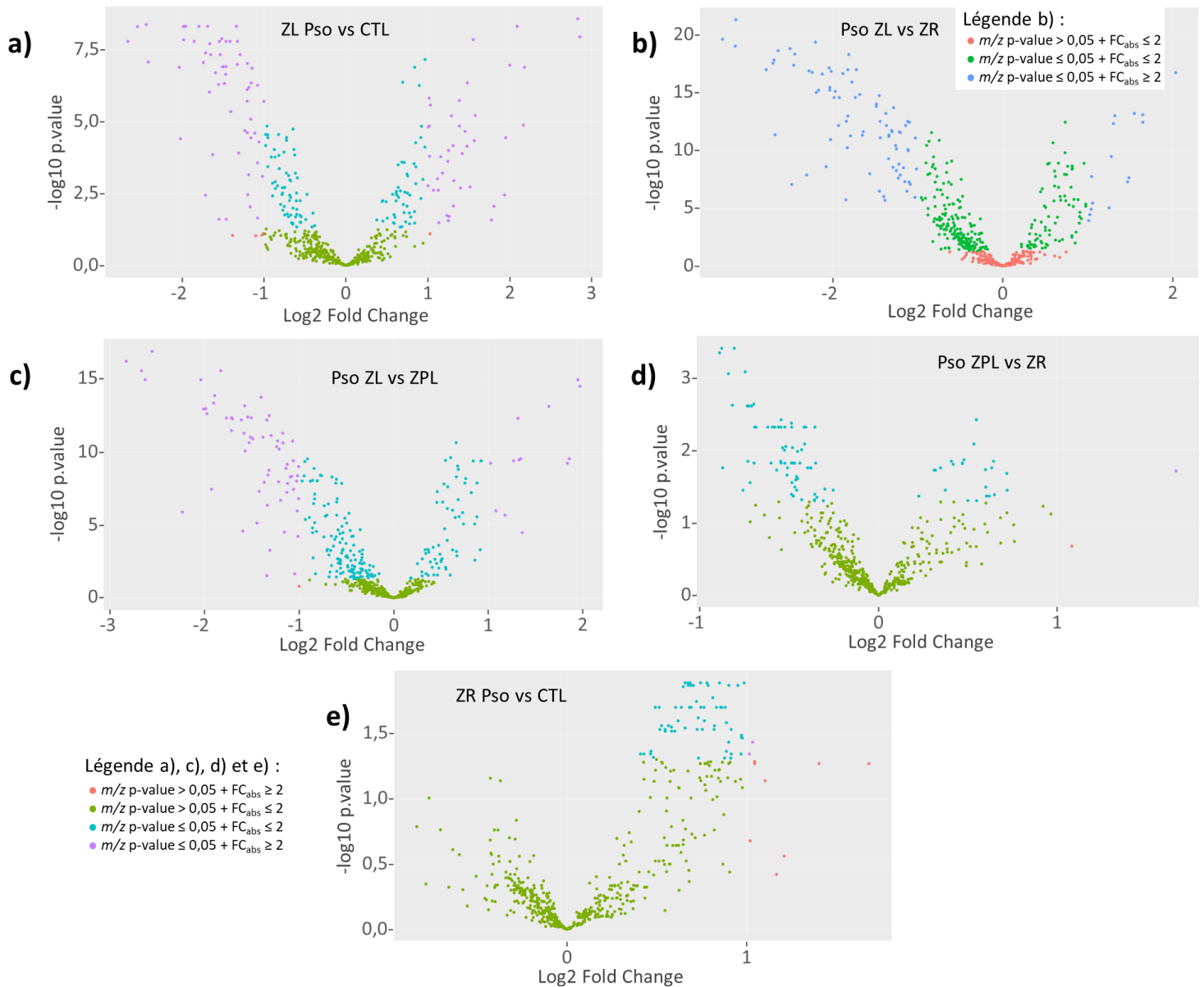


Figure 36 : VolcanoPlot des masses des 5 principales comparaisons a) ZL Pso vs CTL ; b) Pso ZL vs ZR ; c) Pso ZL vs ZPL ; d) Pso ZPL vs ZR et e) ZR Pso vs CTL de l'étude SMPathoPso. a), c), d) et e) : En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs mais ont un $FC_{abs} \geq 2$, en vert ce sont les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 2$, en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 2$ et enfin en violet sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) dans l'étude SMPathoPso et qui ont un $FC_{abs} \geq 2$. **b) :** En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 2$, en vert sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 2$ et enfin en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés (p -value $\leq 0,05$) dans l'étude SMPathoPso et qui ont un $FC_{abs} \geq 2$. CTL : Contrôle ; Pso : Psoriasis ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle ; ZR : Zone de référence

En comparant les masses significativement modulées avec un $FC_{abs} \geq 2$ dans la comparaison ZL Pso vs CTL, 68 masses étaient également modulées dans la comparaison Pso ZL vs ZR, et 62 dans la comparaison Pso ZL vs ZPL. Environ deux tiers des masses significativement modulées avec un $FC_{abs} \geq 2$ dans la comparaison Pso ZL vs ZR étaient également présentes dans la comparaison ZL Pso vs CTL. De plus, presque toutes les masses modulées de manière significative avec un $FC_{abs} \geq 2$ dans la comparaison Pso ZL vs ZPL étaient retrouvées dans la comparaison Pso ZL vs ZR. Enfin, bien que la comparaison ZR Pso vs CTL révélait peu de masses significativement modulées avec un $FC_{abs} \geq 2$, celles-ci étaient presque entièrement retrouvées dans la comparaison ZL Pso vs CTL.

6.3.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoPso

Dans cette troisième partie de l'étude SMPatho, un total de 68 molécules ont été identifiées par fragmentation (niveau 1 et 2) (**Annexe 6 : Assignations SMPathoPso**). Comme pour les autres groupes, les molécules étaient classées selon la nomenclature de LipidMaps pour les lipides et HMDB pour les métabolites. La comparaison principale ZL Pso vs CTL révélait 44 molécules, réparties en 7 super classes et 10 classes principales. La comparaison Pso ZL vs ZR identifiait 38 molécules réparties en 5 super classes et 9 classes principales, tandis que la comparaison Pso ZL vs ZPL en identifiait 28, réparties en 6 super classes et 8 classes principales. Enfin, la comparaison ZR Pso vs CTL ne présentait qu'une seule super classe et une seule classe principale dans ses identifications.

Tout d'abord, parmi les 68 molécules identifiées, 5 étaient classées comme acyles gras, comprenant deux FFAs, avec un saturé et un insaturé, ainsi que 3 esters gras, dont deux WEs et un FAHFA. Le FFA saturé, identifié comme FA 26:0, était diminué dans les 3 comparaisons impliquant la ZL des sujets Pso, et cette diminution était observée dans toutes les comparaisons, tout comme pour le WE à chaîne la plus longue. En revanche, l'acide gras libre insaturé, qui était l'acide arachidonique, était surproduit dans les ZL des sujets Pso. Le deuxième WE, ayant une chaîne plus courte (10 carbones), était diminué uniquement dans la comparaison ZL Pso vs CTL. Enfin, le FAHFA identifié comme ω -FAFAH, avec une chaîne de 48 carbones, était significativement diminué (p -value $\leq 0,05$) dans toutes les comparaisons, sauf ZL Pso vs CTL.

La deuxième super classe modifiée de manière significative (p -value $\leq 0,05$) après un filtrage avec un $FC_{abs} \geq 2$ était la famille des GLs, avec 8 molécules identifiées. Dans cette super classe, un monoglycéride, 4 DGs et 3 TGs étaient modifiés. Le monoglycéride était diminué dans les 3 comparaisons prenant en compte les ZL des sujets Pso, tandis que tous les DGs et TGs étaient augmentés. En effet, la totalité des DGs et TGs étaient augmentée dans la comparaison ZL Pso vs CTL et 3 étaient également augmentés dans Pso ZPL vs ZR et un dans Pso ZL vs ZR.

Ensuite, la super classe ayant le plus grand nombre de molécules modifiées de manière significative (p -value $\leq 0,05$) et avec un $FC_{abs} \geq 2$ était celle des SPs. Au total, 41 molécules de SPs ont été identifiées par fragmentation, réparties en 2 classes principales : les SPBs et les Cer. Quatre têtes polaires différentes étaient retrouvées pour les SPBs et sept familles pour les Cer. Concernant les SPBs, 13 molécules étaient identifiées comme modulées de manière significative (p -value $\leq 0,05$), réparties sur 3 des 5 comparaisons étudiées. Parmi ces SPBs, on retrouvait principalement des homologues aux SPB que l'on pouvait classer en fonction de leur famille, avec des [S], des [H], des [DS] ou des [P]. Toutes les SPBs étaient retrouvées diminuées dans Pso ZL vs ZR, et toutes les SPBs sauf 2 étaient également diminuées dans les comparaisons ZL Pso vs CTL et Pso ZL vs ZPL. Comme pour les SPBs identifiées dans la partie DA, les SPBs de la partie Pso présentent généralement des chaînes plutôt longues, à l'exception d'une qui était la phytosphingosine.

Concernant les Cer, qui constituaient la classe principale avec le plus de molécules modulées, 28 étaient identifiées comme modulées de manière significative dans 4 comparaisons. ZL Pso vs CTL regroupait 18 des 28 Cer identifiées, et Pso ZL vs ZR en regroupait 15, dont 9 n'étaient pas retrouvées significativement modulées dans la comparaison ZL Pso vs CTL. Ensuite, Pso ZL vs ZPL regroupait 10 Cer, et ZR Pso vs CTL présentait uniquement 2 Cer augmentés chez les sujets Pso. Sur l'ensemble, plusieurs familles de Cer étaient modulées différemment. En effet, 3 familles étaient plus concentrées dans les ZL les sphingosines [NS] et [AS], les dihydrosphingosines [NDS], ainsi que la plupart des 6-hydroxy-sphingosines [NH] et [AH] que l'on retrouvait également plus concentrée dans ZR Pso vs CTL. Les phytosphingosines étaient, elles, diminuées dans les ZL. Le rapport [NS]/[NP] était plus important pour

les ZL, avec une valeur de 6,14 contre 1,24 pour la zone ZPL des sujets Pso, 0,68 pour la ZR des sujets Pso, et 1,46 pour les ZL des sujets CTL.

Seul le cholestérol ressortait dans cette partie Pso de l'étude SMPatho comme stérol, étant retrouvé augmenté dans les ZL des sujets Pso comparés aux sujets CTL.

Enfin, sept métabolites étaient identifiés dans trois des cinq comparaisons, comprenant un benzenoïde, quatre acides organiques qui étaient des acides aminés, un composé organooxygéné et un azole. Toutes ces molécules étaient retrouvées dans la comparaison Pso ZL vs ZPL. Dans cette comparaison, l'acide benzoquinoneacétique, la citrulline et l'acide trans-urocanique étaient diminués, tandis que l'acide glutamique était augmenté. En plus de la comparaison Pso ZL vs ZPL, la citrulline et l'acide trans-urocanique étaient également diminués dans les comparaisons ZL Pso vs CTL et Pso ZL vs ZR. Dans cette dernière comparaison, l'acide pyroglutamique était lui aussi diminué. L'acide benzoïque était réduit dans ZL Pso vs CTL, alors que la lysine et l'acide glutamique étaient, à l'inverse, augmentés dans cette comparaison.

6.3.4 Discussion sur SMPathoPso

Comme pour les deux autres pathologies étudiées, les molécules identifiées dans cette partie de l'étude SMPatho peuvent être regroupées en plusieurs voies métaboliques, impliquées dans l'inflammation, l'hyperprolifération des kératinocytes, la perturbation de l'homéostasie du cholestérol et l'altération de la fonction barrière.

Le premier ensemble de voies métaboliques observé dans l'étude SMPathoPso était lié à l'augmentation de l'état inflammatoire, caractérisé par des marqueurs spécifiques. L'acide arachidonique est la molécule la plus représentative de cette inflammation. Son augmentation est largement observée dans les peaux lésionnelles des patients atteints de DA et de Pso^{240-242,259}. L'acide glutamique, quant à lui, est un marqueur commun à plusieurs pathologies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'obésité et la maladie d'Alzheimer²⁶⁰⁻²⁶², où sa concentration est significativement plus élevée chez les patients par rapport aux sujets sains. Dans la peau lésionnelle, des niveaux élevés de l'acide glutamique pourraient refléter une demande accrue en glutamine, une source d'énergie essentielle pour les cellules immunitaires²⁶³. En effet, dans les lymphocytes, l'acide glutamique joue un rôle clé en tant qu'intermédiaire du métabolisme de la glutamine^{111,112}. Enfin, plusieurs études sur le Pso, indépendamment de la méthode d'analyse utilisée^{264,265}, rapportent une augmentation significative de l'acide glutamique dans la peau lésionnelle, ainsi que dans le sérum²⁶⁶ des patients atteints de cette pathologie.

L'hyperprolifération des kératinocytes est une autre caractéristique clé du Pso, mise en évidence par plusieurs marqueurs identifiés dans l'étude SMPatho. Chez les patients atteints de Pso, le renouvellement cutané s'accélère jusqu'à dix fois plus que la normale, entraînant des modifications profondes du profil lipidique, en particulier des Cer. On sait que les propriétés lipidiques du SC sont étroitement liées à son organisation lamellaire et latérale, et que ces structures sont altérées dans certaines maladies cutanées^{267,268}. Dans le Pso en plaques, des études montrent des changements dans la composition des Cer du SC²⁶⁹. Dans l'étude SMPatho, une augmentation générale des Cer était observée, à l'exception des Cer de classe [P] (Cer [NP] et Cer [AP]), dont la concentration diminuait. Leur diminution dans les ZL du Pso entraîne une instabilité de la membrane lipidique, contribuant ainsi à la fragilisation de la fonction barrière de la peau.

L'hyperprolifération des kératinocytes ne se limite pas à une modification du profil des Cer, elle entraîne également des altérations du métabolisme cutané. Comme mentionné précédemment, l'acide glutamique, régulièrement retrouvé en concentration élevée dans la peau lésionnelle des patients

atteints de Pso, pourrait refléter une demande accrue en glutamine. Or cette dernière joue un rôle essentiel non seulement dans le métabolisme énergétique des cellules immunitaires, mais aussi dans celui des kératinocytes, qui nécessitent une synthèse rapide des protéines^{270,271}. De plus, l'acide glutamique possède une action hyperproliférative, favorisant ainsi l'accélération du renouvellement cellulaire²⁷². Par ailleurs, l'étude SMPatho a mis en évidence une surproduction de lysine dans les ZL des patients atteints de Pso, comparée non seulement aux sujets CTL, mais aussi aux ZPL et ZR des patients Pso. Or, la lysine est impliquée dans la production de collagène, dont la synthèse est augmentée dans la peau Pso¹¹³. Cela suggère un lien entre l'excès de lysine et les modifications structurales du tissu cutané observées dans cette pathologie.

Parmi les nombreuses voies métaboliques impactées dans le Pso, une théorie suggère une perturbation de l'homéostasie du cholestérol. En temps normal, environ 85 mg de cholestérol sont sécrétés chaque jour par la peau saine. Cependant, chez les patients atteints de Pso, une quantité nettement plus élevée a été retrouvée dans les squames cutanées. Ces patients perdent entre 1 et 2 g de cholestérol par jour, soit 12 à 23,5 fois plus que les sujets sains^{191,273,274}. Par ailleurs, leur métabolisme systémique du cholestérol est également altéré²⁷⁵. Un lien existe entre le métabolisme du cholestérol, la réponse immunitaire et l'inflammation²⁷⁶, toutefois, ce mécanisme reste encore mal compris. Ce déséquilibre est fréquemment observé dans les maladies inflammatoires chroniques, comme le Pso²⁷⁶. Dans l'étude SMPatho, bien que la concentration exacte de cholestérol cutané n'ait pas été mesurée, une augmentation significative a été observée dans les ZL des patients atteints de Pso ce qui est retrouvé dans différentes études également^{201,202}.

Les patients atteints de Pso présentent une fonction barrière cutanée considérablement altérée²⁷⁷, en raison d'une perturbation du système « brick and mortar » du SC. Si ces altérations sont bien décrites pour des pathologies comme la DA, des études de transcriptomique, comme celles de Zhang X.²⁷⁸, montrent que la composante protéique du SC des sujets psoriasiques subit une perturbation similaire à celle observée dans la DA. Ces déséquilibres affectent également l'expression de certains transporteurs lipidiques impliqués dans la formation des lamelles lipidiques. L'impact sur la structure protéique est illustré dans l'étude SMPathoPso par la diminution de plusieurs acides aminés et dérivés d'acides aminés hygroscopiques, dont la citrulline, l'acide pyroglutamique et le trans-urocanate. La réduction de la citrulline dans le Pso s'explique en partie par la diminution de la FLG^{279,280}, bien que son gène ne soit pas muté chez ces patients^{281,282}, contrairement à la DA. En parallèle, une autre protéine clé, la kératine K1, est également affectée car substrat elle aussi de désimination²⁸³. Des études, notamment celles de Senshu et al., montrent que cette kératine est le principal substrat de la déimination dans l'épiderme des mammifères^{284,285}. Sa diminution chez les sujets psoriasiques entraîne donc une baisse des niveaux de citrulline²⁸⁶, comme observé dans l'étude SMPatho. Par ailleurs, l'interféron gamma (IFN-γ), fortement présent dans les ZL du Pso, inhibe cette réaction de citrullination, accentuant encore la diminution des niveaux de citrulline. Enfin, la phytosphingosine était sous-produite dans les ZL des patients psoriasiques comparées aux sujets témoins. Or, comme détaillé dans la partie DS de l'étude SMPatho, cette molécule joue un rôle clé dans le NMF en stimulant l'expression des gènes codant la FLG ainsi que les enzymes responsables de sa dégradation. Une production insuffisante de phytosphingosine compromet donc la disponibilité des acides aminés et de leur dérivés hygroscopiques, contribuant à la déficience de la barrière cutanée observée dans le Pso.

Des analyses du transcriptome révèlent également une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'IFN-γ. Cette cytokine pro-inflammatoire joue un rôle clé dans le Pso en régulant négativement plusieurs ELOVLs, essentielles à la synthèse des acides gras²⁸⁷. Parmi elles, l'ELOVL1 est impliquée spécifiquement dans l'élongation des acides gras saturés de C20 à C26^{288,289}, elle permet donc la production d'acides gras à très longue chaîne tout comme l'ELOVL4²⁹⁰. De son côté, l'ELOVL6 est responsable de l'élongation des acides gras à partir de C16²⁹¹. La suppression de

ces enzymes induite par l'IFN- γ est considérée comme une cause majeure de la diminution des Cer[NP] et [AP] dans les lésions psoriasiques, ainsi que du raccourcissement des chaînes d'acides gras observé dans cette pathologie^{268,269,292,293}. L'étude SMPatho confirme cette tendance avec une diminution significative des phytosphingosine mais également du FA 26:0 dans les ZL. Ce raccourcissement des chaînes est également observé pour les SPBs. Enfin, un autre type de lipides est également impliqué dans la perturbation de la fonction barrière chez les patients psoriasiques : les FAHFAs. La diminution de l'expression des élongases affecte leur synthèse, entraînant une réduction des FAHFAs à chaîne longue et, en parallèle, une augmentation des FAHFAs à chaîne courte (C16)²³⁴, comme observé dans l'étude SMPatho.

La modification de la famille des GLs observée dans l'étude SMPatho est en accord avec la littérature, bien qu'aucun lien direct avec un processus biologique spécifique du Pso n'ait encore été établi. Cependant, une revue de Pietrzak et al. (2005) cite les travaux de Khyshiktuev et Falco, qui rapportent une augmentation des lipides totaux, des TGs et du cholestérol, aussi bien dans le sang que dans l'épiderme des patients psoriasiques^{191,294}. L'étude SMPatho confirme cette tendance en mettant en évidence une hausse significative des TGs, mais aussi des DGs, dans les ZL.

6.3.5 Conclusion sur SMPathoPso

Le Pso, tout comme la DA, fait l'objet de nombreuses publications en lipidomique et métabolomique. Parmi les molécules les plus étudiées, on retrouve les Cer pour lesquels contrairement à la DA où l'on observe une diminution des Cer totaux²⁹⁵, le Pso se caractérise par une augmentation globale des Cer, avec toutefois des variations importantes selon les sous-familles. L'étude SMPathoPso a confirmé ainsi une forte hausse des Cer[NS] et des Cer à chaîne courte, associée à une nette diminution des Cer[NP], des Cer[AP] et des acylcéramides²⁹⁶, en accord avec la littérature. Concernant les SPBs, les travaux de Moon et al. ainsi que de Checa et al. rapportent une augmentation des sphingosines et des sphinganine, également retrouvée dans SMPathoPso. La sphingosine-1-phosphate augmente dans la peau psoriasique^{297,298}, bien que cette modulation ne soit pas confirmée dans SMPathoPso. De manière générale, la littérature montre une élévation globale des lipides dans les peaux psoriasiques, ce qui se traduit notamment par une hausse des TGs et du cholestérol¹⁹¹, également observée dans SMPathoPso. Les phospholipides, en revanche, ne sont pas significativement modifiés dans notre étude, et les travaux antérieurs restent contradictoires, rapportant tantôt une diminution²⁹⁹, tantôt une augmentation dans le Pso^{191,300,301}. Sur le plan métabolomique, l'étude de Wiong et al. met en évidence plusieurs altération métaboliques. La xanthosine, impliquée dans la prolifération cellulaire, augmente dans le Pso, de même que l'inosine et la carnitine, plus concentrées dans les zones lésées du Pso mais non retrouvée dans SMPathoPso. Du côté lipidique, les auteurs rapportent la diminution de la palmitoylcarnitine et une augmentation de trois acides gras libres, dont deux PUFAs (EPA et DHA), ainsi que de la 13-HODE, une oxylipine impliquée dans l'inflammation. Ces résultats ne sont pas tous retrouvés dans SMPathoPso, où seule la 13-HODE est significativement modulée, avec toutefois un FC_{abs} inférieur à 2. Enfin, plusieurs acides aminés, notamment la thréonine, la sérine et la citrulline²⁰⁰, apparaissent diminués et la baisse de cette dernière est confirmée dans SMPathoPso.

6.4 L'étude de la Rosacée

6.4.1 L'étude SMPathoRosacée

Dans l'étude SMPatho, le groupe Rosacée a été analysé avec un total de 35 sujets, 17 dans le groupe pathologique et 18 dans le groupe contrôle. Le faible nombre de participants s'explique par des difficultés de recrutement au sein du panel de volontaires du centre. Comme pour les autres dermatoses, les deux sous-groupes ont été inclus en parallèle, en veillant à une répartition homogène

selon l'âge et le genre. Les sujets du groupe Rosacée présentaient une érythrocouperose télangiectasique et des papules faciales légères à modérées, avec un score IGA compris entre 2 et 3 sur une échelle de 0 (absence) à 4 (sévérité maximale), ainsi qu'un score d'érythème persistant d'au moins 1 sur une échelle de 0 (absence) à 3 (sévérité maximale), comme l'illustrent ces photos prises lors de l'étude SMPatho en **Figure 37**. Dans ce dernier groupe, les zones ZL et ZPL étaient situées au niveau du visage, tandis que la zone ZR se trouvait sur la face interne de l'avant-bras



Figure 37 : Photographies de patients atteints de rosacée inclus dans l'étude SMPatho01 présentant a) des rougeurs et un érythème ; b) des lésions semblables à l'acné avec des papules ; c) des télangiectasies ou ; d) une forte atteinte au nez.

L'analyse statistique des données SpiderMass s'est faite sur la totalité de la population incluse soit un total de 35 sujets avec 17 Rosacée et 18 CTL, le détail des caractéristiques démographiques est résumé dans le **Tableau 7**.

	Groupe Rosacée	Groupe contrôle
Sexe	Hommes : 1 (5,88%) Femmes : 16 (94,12%)	Hommes : 1 (5,56%) Femmes : 17 (94,44%)
Age moyen (+/-STD)	39,59 (+/- 8,74) ans	42,67 (+/- 7,24) ans
Age médian / Min-Max	39 ans / 21 ans – 53 ans	40,5 ans / 30 ans – 55 ans
Phototypes II / III / IV	6 (35,29%) / 10 (58,82%) / 1 (5,88%)	4 (22,22%) / 12 (66,67%) / 2 (11,11%)

Tableau 7 : Tableau résumé des principales caractéristiques démographiques de la population analysée par SpiderMass dans l'étude SMPathoPso et répartie dans les deux sous-groupes : dermatose et sain. STD : Standard déviation.

Le prétraitement et les analyses statistiques faites pour ce groupe étaient celles données dans la partie **5.3.2. Le prétraitement et l'analyse statistique**. Pour cette pathologie les comparaisons étudiées étaient :

- Inter-groupe :
 - o Comparaison des ZL entre les sujets rosacée et les sujets CTL (ZL Rosacée vs CTL)
 - o Comparaison des ZPL entre les sujets rosacée avec les zones « lésionnelles » des sujets CTL (correspondant au visage) (rosacée ZPL vs CTL ZL)
- Intra-groupe :
 - o Comparaison chez les sujets rosacée des ZL avec les ZPL des sujets rosacée (Rosacée ZL vs ZPL)

Prélèvements de sébum sur papier à cigarettes :

- Inter-groupe :
 - o Comparaison des ZL entre les sujets rosacée et les sujets CTL (Sébum ZL Rosacée vs CTL)

6.4.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans SMPathoRosacée

Pour cette dernière pathologie, le nombre de signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ était suffisamment raisonnable pour être exploité. Ainsi, ce seuil a été retenu pour identifier les masses dans les quatre comparaisons sélectionnées. Le descriptif de ces masses, ainsi que leur répartition selon les trois niveaux de confiance, est présenté en **Tableau 8** et sur les volcanoPlot en **Figure 38**.

	Rosacée ZL vs ZPL	Rosacée ZPL vs CTL ZL	ZL Rosacée vs CTL	Sébum ZL Rosacée vs CTL
Signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$)	3	77	129	13
$\uparrow \mid \downarrow$	3 0	65 12	61 68	13 0
Signaux après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,5$	3	51	78	2
$\uparrow \mid \downarrow$	3 0	41 10	21 57	2 0
Signaux identifiés en Niveau 1 / Équivalent en molécules	0	6 / 2	4 / 2	0
Signaux identifiés en Niveau 2 / Équivalent en molécules	0	35 / 24	43 / 21	0
Signaux identifiés en Niveau 3 / Équivalent en molécules	2 / 2	8 / 6	18 / 13	0
Isotopes (niveau 1, 2 et 3)	0	16	25	0
Non identifiés	1	2	13	2

Tableau 8 : Détail des signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) comprenant les signaux surproduits et les signaux sous-produits pour chacune des comparaisons étudiées dans l'étude SMPathoRosacée ainsi que les signaux obtenus après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ avec leur répartition dans les différents niveaux d'identification. CTL : Contrôle ; FC_{abs} : Fold Change absolu ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle ; ZR : Zone de référence

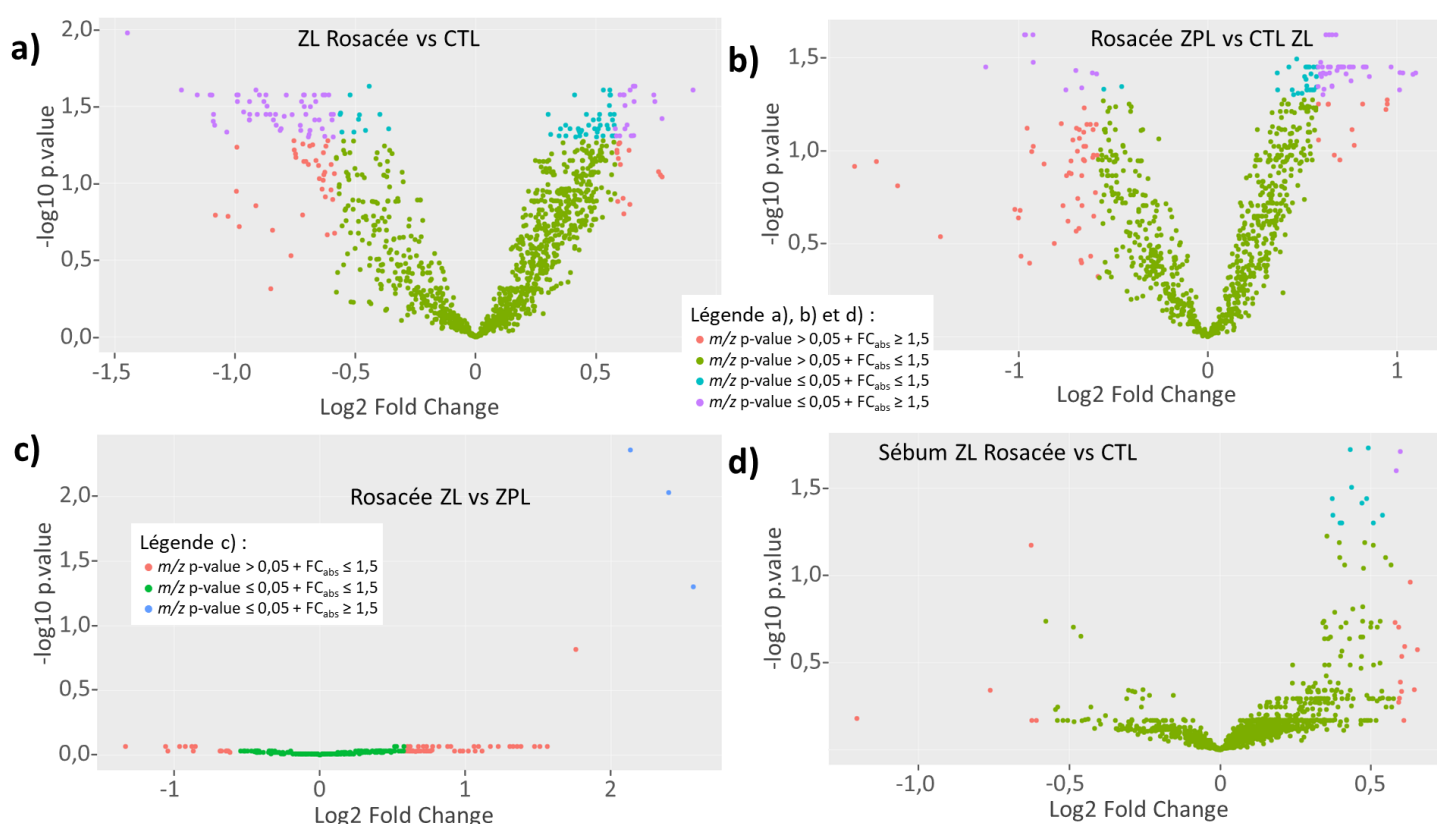


Figure 38 : VolcanoPlot des masses des 4 principales comparaisons a) ZL Rosacée vs CTL ; b) Rosacée ZPL vs CTL ZL ; c) Rosacée ZL vs ZPL et d) Sébum ZL Rosacée vs CTL de l'étude SMPathoRosacée. a), b) et d) : En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs mais ont un $FC_{abs} \geq 1,5$, en vert ce sont les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 1,5$, en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 1,5$ et enfin en violet

sont représentés les m/z qui sont significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) dans l'étude SMPathoRosacée et qui ont un $FC_{abs} \geq 1,5$. c) : En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 1,5$, en vert sont représentés les m/z qui sont significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 1,5$ et enfin en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) dans l'étude SMPathoRosacée et qui ont un $FC_{abs} \geq 1,5$. CTL : Contrôle ; ZL : Zone lésionnelle ; ZPL : Zone péri-lésionnelle ; ZR : Zone de référence

En comparant les masses significativement modulées avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ entre la comparaison Sébum ZL Rosacée vs CTL, réalisée sur des prélèvements de sébum à l'aide de papier à cigarettes, et les trois autres comparaisons effectuées par analyses *in-vivo*, aucune masse commune n'a été identifiée. En revanche, les comparaisons Rosacée ZPL vs CTL ZL et ZL Rosacée vs CTL présentaient des masses communes, avec un total de 23 masses partagées. Il est à noter que ces masses ne sont pas retrouvées avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ dans la dernière comparaison *in-vivo*, Rosacée ZL vs ZPL, bien qu'elles y soient majoritairement significativement modulées.

6.4.3 Identification des molécules modulées dans l'étude SMPathoRosacée

Dans cette quatrième et dernière pathologie de l'étude SMPatho 40 molécules étaient identifiées par fragmentation (niveau 1 et 2)(**Annexe 7 : Assignations SMPathoRosacée**) avec toujours un classement des molécules selon la classification et nomenclature de LipidMaps pour les lipides et HMDB pour les métabolites. Finalement après identification seul deux comparaisons possédaient des molécules en niveau 1 et 2. ZL Rosacée vs CTL regroupait 24 molécules réparties en 6 super classes et 8 classes principales et Rosacée ZPL vs CTL ZL possédait 21 molécules identifiées réparties en 5 super classes et 8 classes principales.

Parmi les 40 molécules de l'étude SMPathoRosacée, cinq étaient des Acyl gras avec un acide gras libre insaturé, il s'agissait plus précisément de l'acide arachidonique et 4 esters gras dont 3 WEs, qui étaient tous avec deux insaturations, une sur chaque chaîne et un ω -FAHFA à chaîne longue.

Concernant les GLs, un grand nombre de molécules était modulé avec 17 mais seul des DGs et les TGs étaient identifiés. On retrouvait 12 DGs et 5 TGs qui étaient par ailleurs tous augmentés dans la comparaison Rosacée ZPL vs CTL ZL et deux DGs étaient également augmentés dans la comparaison ZL Rosacée vs CTL.

Ensuite les SPs étaient également bien représentés avec 13 molécules dans cette partie de l'étude SMPatho et une grande partie de ces molécules étaient des SPBs (11 SPBs) et seulement 2 étaient des Cer. Les 11 SPBs étaient diminuées dans la comparaison ZL Rosacée vs CTL, parmi ces 11 SPBs seulement 2 étaient diminuées en plus dans la comparaison Rosacée ZPL vs CTL ZL. Parmi ces SPBs on retrouvait 3 sous-classes : [S], [DS] et [P]. Les deux Cer identifiées étaient toutes les deux augmentées dans les deux comparaisons et représentent une seule famille de Cer, la famille [NS].

La dernière super classe de lipides identifiées dans SMPathoRosacée était la classe des prénols dans laquelle 2 molécules étaient identifiées comme le squalène et un dérivé du squalène oxydé. Le squalène était augmenté dans les deux comparaisons et le Nor-Dolichols, qui est le dérivé oxydé du squalène était également augmenté mais uniquement dans la comparaison Rosacée ZPL vs CTL ZL.

Enfin 2 métabolites étaient identifiés avec un acide aminé qui était la citrulline qui était diminué dans les deux comparaisons et l'acide trans-urocanique qui était lui diminué uniquement dans ZL Rosacée vs CTL.

6.4.4 Discussion sur SMPathoRosacée

L'ensemble des molécules identifiées dans cette partie de l'étude SMPatho peut également être rassemblé dans un ensemble de voies métaboliques comprenant la modification de la composition des

lipides du sébum, le stress oxydatif, l'état inflammatoire et comme pour les autres pathologies la fonction barrière.

Le premier regroupement de voies métaboliques identifié dans SMPathoRosacée concerne l'altération de la fonction barrière. Cette altération affectait à la fois la composante protéique et lipidique de la barrière cutanée. Sur le plan protéique, une diminution de la citrulline était observée dans les ZL et ZPL des sujets rosacée, comparativement aux ZL des sujets CTL. De plus, l'acide trans-urocanique était réduit dans les ZL des sujets rosacée par rapport aux témoins. Ces observations suggèrent une baisse de la quantité de FLG ou d'une autre protéine sujette à la déimination et de leurs processus de citrullination, bien qu'aucune donnée de la littérature ne le confirme directement. Cependant, il est également établi que l'IFN- γ , fortement présent dans la peau des sujets rosacée, inhibe la citrullination de la FLG ce qui pourrait participer à la diminution des marqueurs, citrulline et acide trans-urocanique observé dans l'étude SMPathoRosacée. Par ailleurs, la phytosphingosine est sous-produite dans les ZL des sujets rosacée, impliquée dans l'expression des gènes codant la FLG et les enzymes responsables de sa dégradation, comme observé dans deux des autres pathologies, elle pourrait elle aussi être un marqueur de cette diminution de la partie protéique de la fonction barrière. Concernant la composante lipidique de la fonction barrière, une diminution de la longueur des chaînes lipidiques, incluant les FFAs, les FAHFAs et les Cer, était également observée. Cette réduction pourrait être liée à l'infiltration de l'IFN- γ , qui, comme décrit dans le contexte de la DA ou du Pso, régule négativement certaines élongases, notamment ELOVL1. Cette enzyme, essentielle à l'élongation des acides gras saturés à longue chaîne (de C20 à C26) va, par son inhibition par l'IFN- γ , entraîner une baisse des lipides C24 et une augmentation des lipides C16 et C18²⁸⁹. Enfin, une diminution d'une Cer spécifique (Cer[NP], niveau 3) a été observée dans la peau lésionnelle des sujets rosacée, constituant un marqueur supplémentaire de l'altération de la fonction barrière.

Dans l'étude SMPathoRosacée, une augmentation des lipides sébacés a été observée chez les sujets rosacée, notamment une hausse des WE et du squalène, spécifiques du sébum¹⁰⁰, ainsi que des DGs et TGs. Toutefois, l'indice lipidique (IL), utilisé pour mesurer la quantité de sébum au cours de l'étude, n'a révélé aucune différence significative entre les groupes Rosacée et CTL. Ce résultat est en accord avec une étude précédente datant de 1975³⁰².

Bien qu'aucun lien direct entre le squalène et la rosacée n'a été établi, il est connu que l'exposition aux UV²⁰⁸ est l'un des déclencheurs cliniques de cette pathologie. Or, le squalène joue un rôle clé dans l'activité antioxydante de la peau exposée. Il possède en effet la capacité d'absorber et de retenir une grande quantité d'oxygène, représentant environ un quart de son poids^{108,109}. Cette propriété entraîne la formation de dérivés oxydés du squalène, protégeant ainsi l'ADN et les cellules des radicaux libres générés par les UV. Dans l'étude SMPathoRosacée, nous avons observé une augmentation d'un dérivé oxydé du squalène (portant une fonction OH). Par ailleurs, une surproduction d'hypoxanthine a été détectée dans les ZL par rapport aux ZPL (niveau 3), indiquant un stress oxydatif accru dans ces régions. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le passage de l'hypoxanthine à la xanthine, puis la conversion de la xanthine en urate, un processus nécessitant de l'oxygène pour activer la xanthine oxydase, une source majeure de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)^{303,304}. Enfin, la spermine, une amine biogénique appartenant à la même famille que la putrescine et la spermidine, retrouvé augmenté dans les ZL, joue un rôle essentiel dans plusieurs fonctions cellulaires. Elle intervient dans la prolifération et la croissance cellulaire, protège l'ADN contre les dommages oxydatifs, régule son état conformationnel, interagit avec les canaux ioniques et participe à la modulation de la réponse immunitaire³⁰⁵⁻³⁰⁷. De plus, bien que les niveaux de polyamines augmentent lors de l'inflammation, leur rôle exact dans ce processus reste incertain car elles semblent posséder à la fois des propriétés pro- et anti-inflammatoires³⁰⁸⁻³¹⁰.

Enfin, plusieurs marqueurs de l'inflammation étaient en augmentation, notamment l'acide arachidonique ainsi que les lipides oxydés. Comme mentionné précédemment, l'augmentation du squalène et de ses dérivés oxydés accroît non seulement le stress oxydatif mais également l'inflammation. En effet, chez l'humain, les lipides oxydés sont considérés comme de puissants médiateurs inflammatoires dans certaines affections cutanées, telles que le pityriasis versicolor ou la DS⁹⁸. Plus précisément, le squalène oxydé est connu pour induire la libération de cytokines inflammatoire³¹¹.

6.4.5 Conclusion de la partie SMPathoRosacée

Contrairement aux autres pathologies étudiées, en particulier la DA et le Pso, la rosacée reste largement sous-explorée, avec peu d'études cliniques et encore moins d'analyses omiques. Les rares études en lipidomique ont soit conclu à l'absence de différences significatives²¹³, soit identifié des variations dans la concentration de certains acides gras libres cutanés, avec par exemple une augmentation du FA 14:0 et une diminution des FA 20:0, FA 22:0, FA 23:0, FA 24:0 et FA 20:1^{2,312}. Il est donc essentiel d'approfondir la recherche sur les altérations lipidiques et métaboliques de la peau lésionnelle dans cette pathologie. Les résultats obtenus dans cette première étude SpiderMass apportent des pistes de recherches intéressantes, qui conviendront d'être confirmées, et pourraient se révéler utiles pour le développement et la prise en charge de cette dermatose à plus long terme.

6.5 Conclusion et comparaison des quatre dermatoses

L'étude SMPatho a permis de visualiser les modifications moléculaires spécifiques à chaque dermatose et d'évaluer l'impact de divers facteurs, notamment la nature de la dermatose et la localisation topographique (ZL, ZPL et ZR). L'analyse approfondie de ces données a également rendu possible une comparaison des métabolites et des voies métaboliques, mettant en évidence celles qui étaient propres à une dermatose spécifique ainsi que celles partagées par l'ensemble des dermatoses étudiées.

Parmi les molécules modulées dans au moins trois des quatre dermatoses étudiées, plusieurs étaient associées à l'inflammation. L'acide arachidonique, par exemple, était significativement augmenté dans les ZL, tout comme une Cer de la famille [NS] à chaîne courte, corrélée à l'inflammation et à l'altération de la fonction barrière. Cette dernière pourrait être liée à une diminution de la synthèse ou de l'activité des élongases, une hypothèse déjà bien documentée pour la DA et qui commence à émerger pour d'autres pathologies, notamment en raison de l'infiltration d'IFN- γ observée dans le Pso et la rosacée.

Certaines molécules impliquées dans les voies métaboliques de la fonction barrière cutanée étaient altérées dans au moins trois des quatre dermatoses étudiées. Parmi elles, l'acide trans-urocanique se distinguait, fortement diminué dans les ZL de la DA et du Pso, il montrait une réduction plus modérée (facteur 2) dans la DS et la rosacée. Concernant la composante protéique de la structure « brick and mortar » de la barrière cutanée, la citrulline était également réduite dans les ZL de trois pathologies, tandis que la phytosphingosine était systématiquement diminuée dans toutes les dermatoses analysées. Cette baisse marquée de la phytosphingosine, à ma connaissance peu documentée dans la littérature actuelle, est révélée par l'étude SMPatho comme un marqueur potentiellement central dans ces pathologies inflammatoires. Du côté lipidique (« mortar »), une réduction significative des acides gras à très longue chaîne FA 24:0 et FA 26:0, de plusieurs SPs à longue chaîne, ainsi que d'un FAHFA à très longue chaîne était observée dans trois ou dans l'ensemble des dermatoses étudiées. Ces altérations reflétaient une diminution de la synthèse ou de l'activité des élongases, enzymes essentielles à la production des lipides structurels de la barrière cutanée. La baisse

d'activité des élongases est un facteur clé dans la désorganisation lipidique de la peau, contribuant à la perte de fonction barrière. Si une altération de la fonction barrière a été constatée dans l'ensemble des dermatoses étudiées, elle était particulièrement sévère dans la DA et le Pso. Cela se traduisait notamment par des variations marquées de l'abondance de certains lipides, avec des FC allant jusqu'à une réduction d'un facteur 9 pour certaines SPBs à très longue chaîne observées dans le Pso et par une réduction marquée de l'acide pyroglutamique dans les ZL de ces deux pathologies, un biomarqueur clé associé à la perte d'intégrité de la barrière cutanée.

Bien que ces quatre dermatoses partageaient certaines similitudes, notamment une altération marquée de la fonction barrière cutanée et une augmentation des processus inflammatoires, chacune présentait des biomarqueurs spécifiques. La diminution généralisée de la fonction barrière était illustrée par la modulation d'un grand nombre de biomolécules communes à l'ensemble des pathologies, tandis que l'inflammation était mise en évidence par l'élévation de l'acide arachidonique dans trois d'entre elles. Cependant, des différences propres à leur métabolisme étaient également observables en SpiderMass. Par exemple, le cholestérol était significativement augmenté dans les ZL des sujets atteints de DS, ce qui pourrait refléter une surproduction de sébum au niveau du cuir chevelu pathologique. En revanche, cette même augmentation du cholestérol était observée dans le Pso, mais cette fois en lien avec une dérégulation systémique du métabolisme du cholestérol propre à cette pathologie. Cette spécificité était particulièrement marquée dans la rosacée, où le stress oxydatif joue un rôle central. C'est d'ailleurs la seule dermatose, dans l'étude SMPatho, où l'on observait une augmentation significative du squalène ainsi que de l'un de ses dérivés oxydés, témoignant de cette composante oxydative majeure (**Figure 39**).

Grâce à la technologie SpiderMass, nous avons démontré qu'il est possible d'observer, en temps réel directement sur les patients, les altérations moléculaires de l'épiderme déjà bien documentées par des approches conventionnelles comme la LC-MS, dans les quatre dermatoses étudiées. Cette méthode permet non seulement de confirmer ces modifications, en particulier celles liées à la fonction barrière et à l'inflammation, mais aussi de les comparer afin d'identifier des mécanismes moléculaires communs. En parallèle, SpiderMass offre la possibilité de révéler des biomarqueurs spécifiques à chaque dermatose, tels que ceux liés au stress oxydatif ou aux perturbations du métabolisme du cholestérol. Enfin, cette approche innovante a permis de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs encore peu décrits dans la littérature, comme le squalène oxydé, la phytosphingosine, ou encore de renforcer certaines hypothèses mécanistiques sur la rosacée, une pathologie encore insuffisamment explorée sur le plan moléculaire.

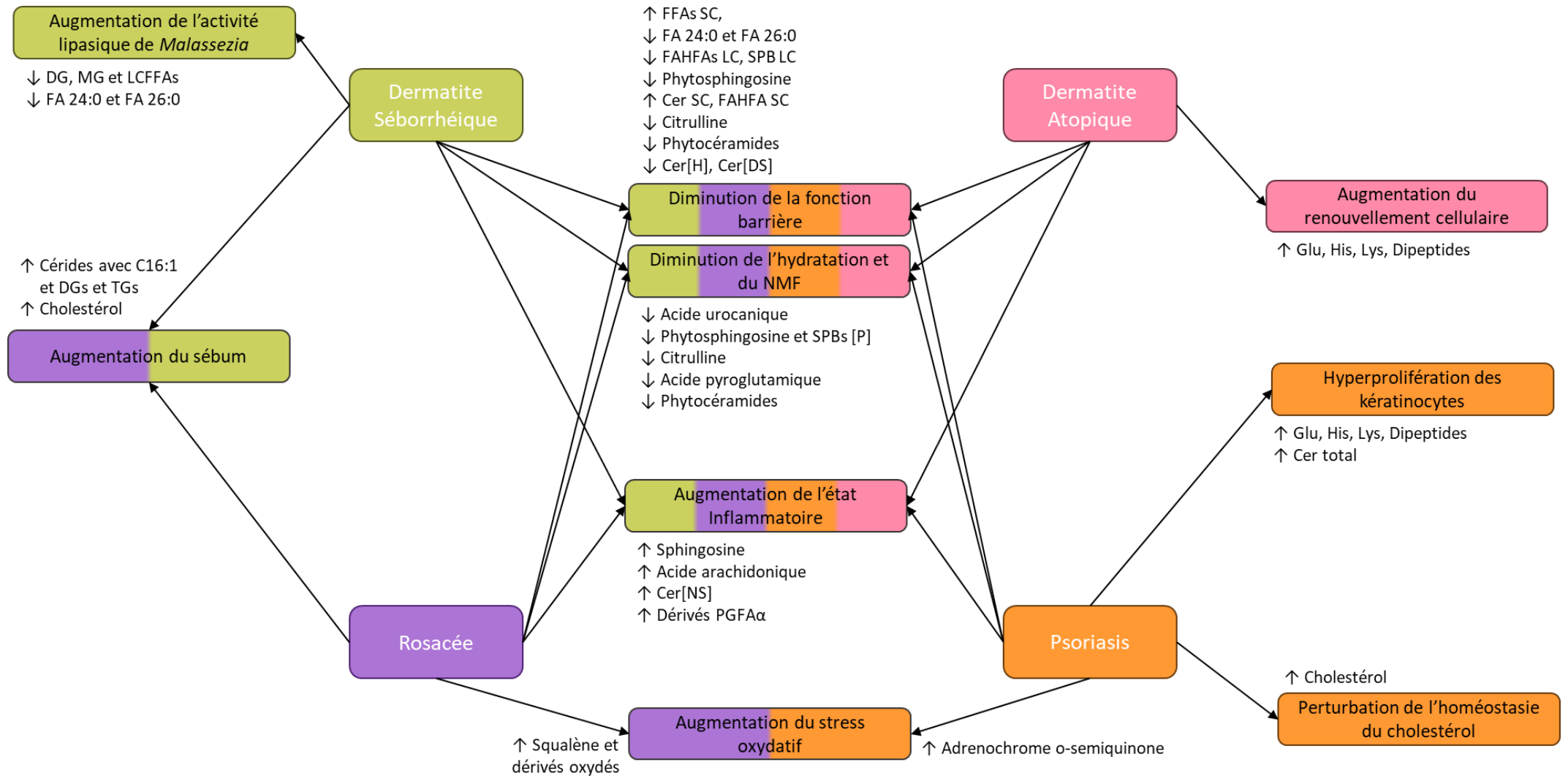


Figure 39 : Schéma représentant les quatre pathologies analysées dans l'étude SMPaTho (dermatite séborrhéique, rosacée, psoriasis et dermatite atopique), ainsi que les molécules détectées par SpiderMass pour chacune d'elles et associées à des processus métaboliques identifiés à partir de la littérature. Certains voies métaboliques sont spécifiques à une pathologie, tandis que d'autres sont partagées entre deux, voire l'ensemble des dermatoses étudiées.

7 Étudier une dermatose et son traitement : la Dermatite Séborrhéique et l'étude KelualDS

La DS peut être traitée par des traitements topiques antifongiques qui limitent la prolifération de *Malassezia*, fortement impliqué dans la pathogénèse, aidant ainsi à atténuer les symptômes. Pour répondre à ce besoin, les Laboratoires PFDC ont reformulé un shampoing antifongique doté également d'une action anti-inflammatoire. Afin d'évaluer son efficacité après deux semaines de traitement intensif, j'ai participé à la mise en place de l'étude clinique visant à évaluer les bénéfices de la nouvelle formulation du shampoing Kelual DS un cours du temps, en s'appuyant sur des méthodes d'évaluation cliniques, biologiques et biométaboliques.

7.1 L'étude KelualDS

L'étude KelualDS était une étude randomisée, contrôlée et bicentrique réalisée au Centre de recherche sur la peau, PFDC et au Centre de santé Sabouraud - hôpital Saint Louis, où nous avons analysé la réponse moléculaire du sébum du cuir chevelu sur une cohorte de 63 sujets (**Annexe 8 : Critères d'éligibilité de KelualDS**), dont les principales caractéristiques démographiques sont résumées dans le **Tableau 9**, lors d'un traitement de la DS avec le shampoing de nouvelle formulation. Les participants ont été suivis par 4 visites réparties sur 4 mois au cours desquelles leur cuir chevelu a été évalué, par des méthodes d'évaluation cliniques, biologiques et biométaboliques afin d'évaluer les effets d'un shampoing traitant. Le produit testé était un shampoing antipelliculaire (Kelual DS®, Laboratoires Dermatologiques DUCRAY, Boulogne Billancourt, France). Ce produit était adapté aux états pelliculaires récurrents impliquant des rougeurs intenses et des démangeaisons, ou comme soin de soutien pour les cuirs chevelus sujets à la DS. L'étude a été divisée en deux parties : dans un premier temps, tous les participants ont utilisé le shampoing traitant (3 fois/semaine) pendant deux semaines, puis les sujets ont été randomisés en deux groupes : un groupe qui a continué le shampoing traitant (1 fois/semaine) et complété par deux applications de shampoing neutre (Extra Doux®, Laboratoires Dermatologiques DUCRAY, Boulogne Billancourt, France) par semaine et le groupe témoin, qui a reçu un shampoing neutre uniquement devait l'appliquer 3 fois /semaine (**Figure 40**). Le sébum a été collecté à l'aide d'un papier à cigarettes à chaque visite, pour permettre les analyses SpiderMass.

	KDS S2 vs S0
Sexe	Hommes : 13 (20,63 %) Femmes : 50 (79,37 %)
Age moyen ($\pm$ STD)	35,30 ($\pm$ 11,06) ans
Age médian / Min-Max	34 ans / 18 ans - 60 ans
Phototypes I / II / III / IV / V	1 (2,00 %) / 12 (19,05 %) / 41 (65,08 %) / 8 (12,70 %) / 1 (2,00%)

Tableau 9 : Tableau résumé des principales caractéristiques démographiques de la population analysée par SpiderMass dans l'étude KelualDS. KDS : KelualDS ; S : Semaine ; STD : Standard déviation.

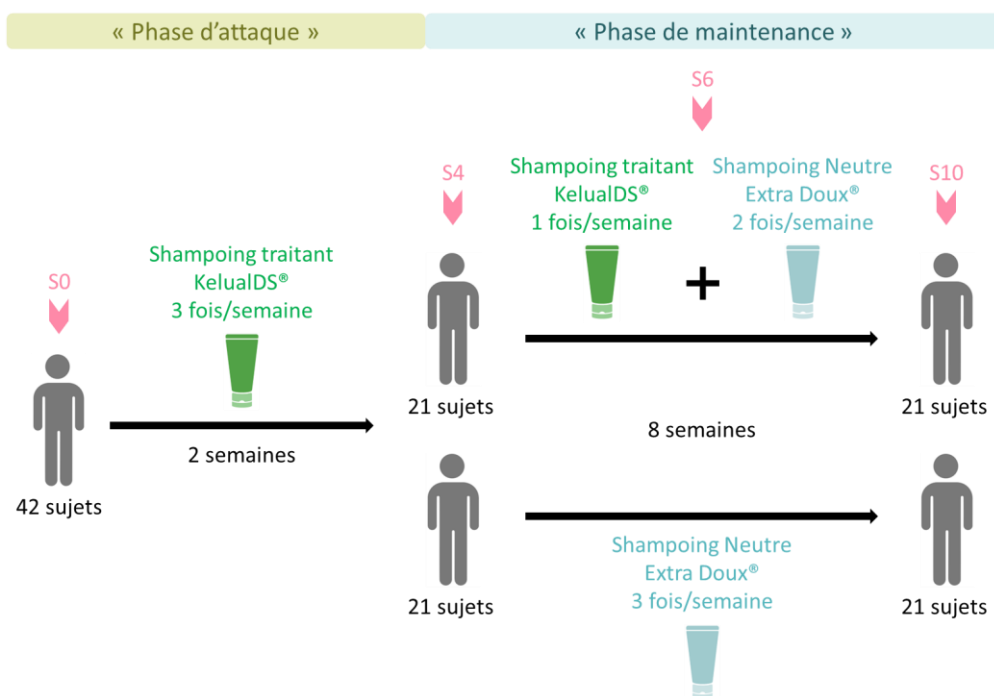


Figure 40 : Schéma explicatif de l'étude KelualDS avec le nombre de sujet par groupe lors des deux phases de l'étude ainsi que les produits appliqués et le nombre d'application par semaine pour chacun d'eux. S : Semaine. Créé en partie avec <https://BioRender.com>

Comme pour SMPatho les prétraitements et les analyses statistiques faites étaient celles données dans la partie 5.3.2. **Le prétraitement et l'analyse statistique** avec l'étape d'AF en moins car le nombre de masses significativement modulées était extrêmement important et ne nécessitait donc pas ce traitement. Dans cette partie, seule la comparaison entre la condition avant traitement et après les deux semaines de traitement intense est étudiée.

7.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans l'étude KelualDS

Pour cette étude, un seuil sur le FC_{abs} est appliqué à 1,5 pour identifier ces signaux. Le descriptif de ces masses ainsi que leur répartition dans les trois niveaux de confiance, est donné en **Tableau 10** et sur le volcanoPlot en **Figure 41**.

	KDS S2 vs S0
Signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$)	3364
↑ ↓	949 2415
Signaux après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,5$	962
↑ ↓	583 379
Pics produits	20
Signaux identifiés en Niveau 1 / Équivalent en molécules	4 3
Signaux identifiés en Niveau 2 / Équivalent en molécules	288 132
Signaux identifiés en Niveau 3 / Équivalent en molécules	386 207
Isotopes (niveau 2 et 3)	312
Non identifiés	264

Tableau 10 : Détail des signaux modulés significativement ($p\text{-value} \leq 0,05$) comprenant les signaux surproduits et les signaux sous-produits entre avant le traitement et après 2 semaines de traitement avec le shampoing KelualDS ainsi que les signaux obtenus après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ avec leur répartition dans les différents niveaux d'identification. FC_{abs} : Fold Change absolu ; KDS : KelualDS ; S : Semaine.

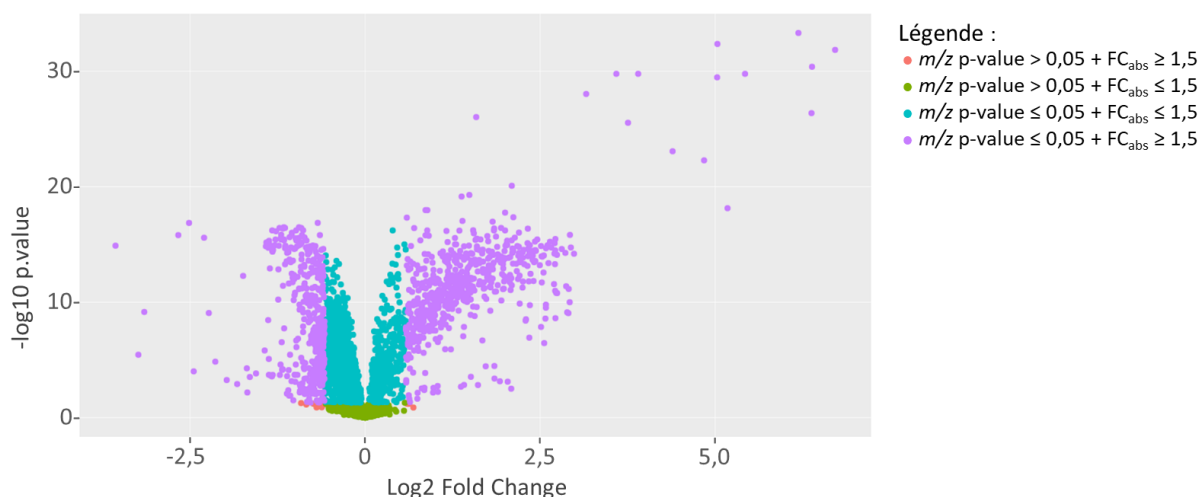


Figure 41 : VolcanoPlot des masses de la comparaison KDS S2 vs S0 de l'étude KelualDS. En rouge sont représentés les m/z qui sont non significatifs mais ont un $FC_{abs} \geq 1,5$, en vert ce sont les m/z qui sont non significatifs et ont un $FC_{abs} \leq 1,5$, en bleu sont représentés les m/z qui sont significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) mais ont toujours un $FC_{abs} \leq 1,5$ et enfin en violet sont représentés les m/z qui sont significativement modulés ($p\text{-value} \leq 0,05$) dans l'étude KelualDS et qui ont un $FC_{abs} \geq 1,5$.

7.3 Identification des molécules modulées dans l'étude KelualDS

Au total 135 molécules étaient identifiées par fragmentation donc soit en niveau 2 soit en niveau 1 en fonction de la disponibilité du standard, dont 104 étant sur-régulées en fin de phase d'attaque et 31 étaient sous-régulées (**Annexe 9 : Assignations KelualDS**). Dans cette étude, on retrouvait 7 super classes et 14 classes principales et parmi ces 7 supers classes, les GLs étaient sur-représentés avec 100 molécules modulées, dont 14 monoacylglycérols (MG), 48 diacylglycérols (DG) et 37 TGs. Les MG ont montré une augmentation plus légère, avec des FC allant de 2,12 à 4,59 et un FC moyen de 3,56, tout comme les DG, avec des FC allant de 1,57 à 7,66 et un FC moyen de 3,81. En revanche, les TGs présentaient une augmentation plus marquée de leur quantité, avec un FC compris entre 3,45 et 7,91 et un FC moyen de 5,46.

Ensuite 24 acyls gras étaient modulés avec un $FC_{abs} \geq 1,5$ comprenant 4 acides gras saturés avec des chaînes allant C14 à C17, 17 acides gras libres insaturés, avec cette fois des chaînes carbonées allant de C6 à C22, un ester gras qui se trouvait être un WE et deux octadécanoïques qui étaient des oxylipines. Dans cette super classes, toutes les molécules étaient diminuées après les deux semaines de traitement comparé à avant le traitement sauf les FFAs saturés qui étaient eux augmentés après cette phase d'attaque.

Les deux dernières super-classes de lipides analysées dans cette étude étaient les SPs et les prénoles. Les SPs, représentés par cinq molécules, montraient tous une diminution après deux semaines de traitement. Parmi elles, on identifiait quatre Cer, avec deux Cer[NH] et deux Cer[AH], ainsi qu'une acylcéramide. Le seul prénole identifié, quant à lui, était une quinone et hydroquinone, correspondant à l'alpha-tocophérol.

Enfin, les métabolites modulés et identifiés dans cette étude se répartissaient en trois super-classes : un acide organique, un composé organique azoté et trois composés organohétérocycliques. L'acide organique, l'acide pyroglutamique, était diminué après le traitement, tout comme l'histamine. Les trois composés organohétérocycliques étaient un azole, l'acide trans-urocanique, et deux indoles, à savoir l'acide indolelactique et la sérotonine et étaient également diminués en fin de phase d'attaque.

La totalité des molécules identifiées et significativement modulées ($p\text{-value} \leq 0,05$) et avec une $FC_{\text{abs}} \geq 1,5$ sont représenté dans le diagramme suivant (**Figure 42**).

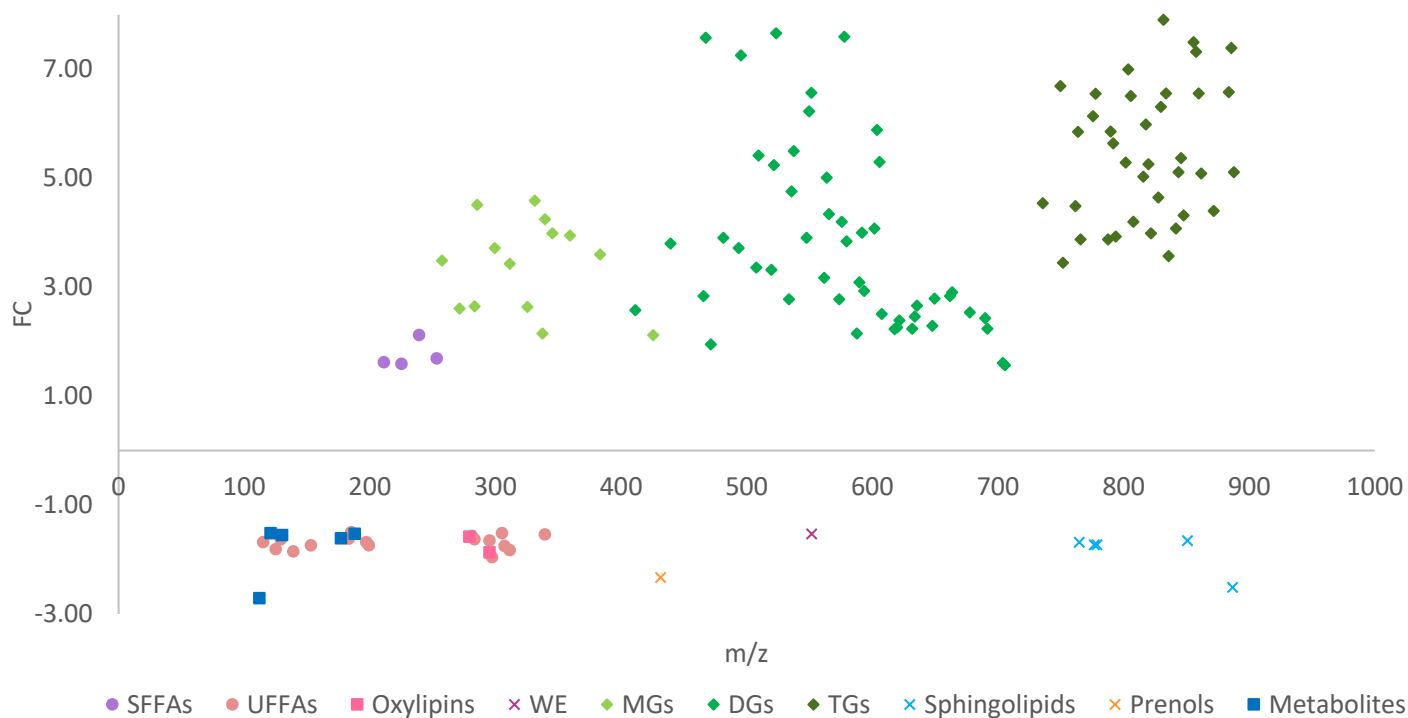


Figure 42 : Distribution des FC des 135 molécules identifiées comme significativement modulées entre S0 (avant application du produit à l'étude) et S2 (après deux semaines d'application du shampoing à l'étude). Une valeur FC positive indique une augmentation de la production de la molécule après deux semaines d'application du produit à l'étude, tandis qu'une valeur FC négative indique une diminution de la production de la molécule. DGs : Diglycérides ; MGs : monoglycérides ; SFFAs : Saturated Free Fatty Acid (Acides Gras Libres Saturés) ; TGs : Triglycérides ; UFFAs : Unsaturated Free Fatty Acid (Acides Gras Libres Insaturés) ; WE : Wax Ester (Céride).

7.4 Discussion et conclusion sur les résultats de KelualDS

Le traitement par shampoing étudié dans cette étude contient plusieurs ingrédients antifongiques (ciclopirox olamine (ou ciclopirox) et piroctone olamine) couplés à un actif anti-inflammatoire (acide β -glycyrrhétinique). Le mécanisme d'action du ciclopirox est principalement lié à l'inhibition des enzymes fongiques dépendantes des métaux, avec pour conséquence une altération et des dommages aux mitochondries et aux membranes cellulaires^{313,314}. De plus, le ciclopirox possède des propriétés anti-inflammatoires liées à l'inhibition de la libération de prostaglandines et de leucotriènes et à l'activité contre les micro-organismes Gram-positifs et Gram-négatifs³¹³. La piroctone olamine est un sel d'éthanolamine du dérivé de l'acide hydroxamique, la piroctone, et possède un mécanisme d'action complexe encore mal compris aujourd'hui. Cependant on sait que cet agent a la capacité de pénétrer la membrane cellulaire et de former des complexes avec le fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}), inhibant le métabolisme énergétique dans les mitochondries des champignons pathogènes^{315,316}.

L'activité antifongique du shampoing KelualDS limite la prolifération des espèces de *Malassezia* et rééquilibre le microbiote du cuir chevelu. Cette diminution en *Malassezia* présent sur le cuir chevelu s'est observée avec le SpiderMass grâce à des biomarqueurs spécifiques. L'augmentation des GLs, qui est d'ailleurs fortement visible sur les spectres avant et après traitement sur la **Figure 43**, et la diminution des acides gras libres insaturés pro-irritants et pro-inflammatoires¹²⁷ en étaient les principaux. Le rapport entre les FFAs et les TGs, mesuré par spectroscopie Infrarouge à transformer de

Fourier (FTIR) lors de cette étude corroborait les résultats obtenus par SpiderMass, et représente un indicateur pertinent de l'état du sébum du cuir chevelu dans le cadre de la DS. Bien que ce rapport ait déjà été utilisé pour analyser le sébum dans le contexte de l'acné, son application à la DS n'avait, à ma connaissance, jamais été explorée jusqu'à présent. Un autre biomarqueur témoignait de la diminution de *Malassezia* à la fin de la phase d'attaque, à savoir l'acide indolelactique, dont les niveaux, tout comme ceux des acides gras insaturés, étaient réduits. Il s'agit d'un métabolite de *Malassezia*, notamment de *M. globosa* et *M. restricta*, issu du métabolisme du tryptophane³¹⁷. En effet, des expériences *in vitro* mettent en évidence une élévation marquée des niveaux d'acide indolelactique après exposition de *M. globosa* et *M. restricta* au tryptophane¹²⁶.

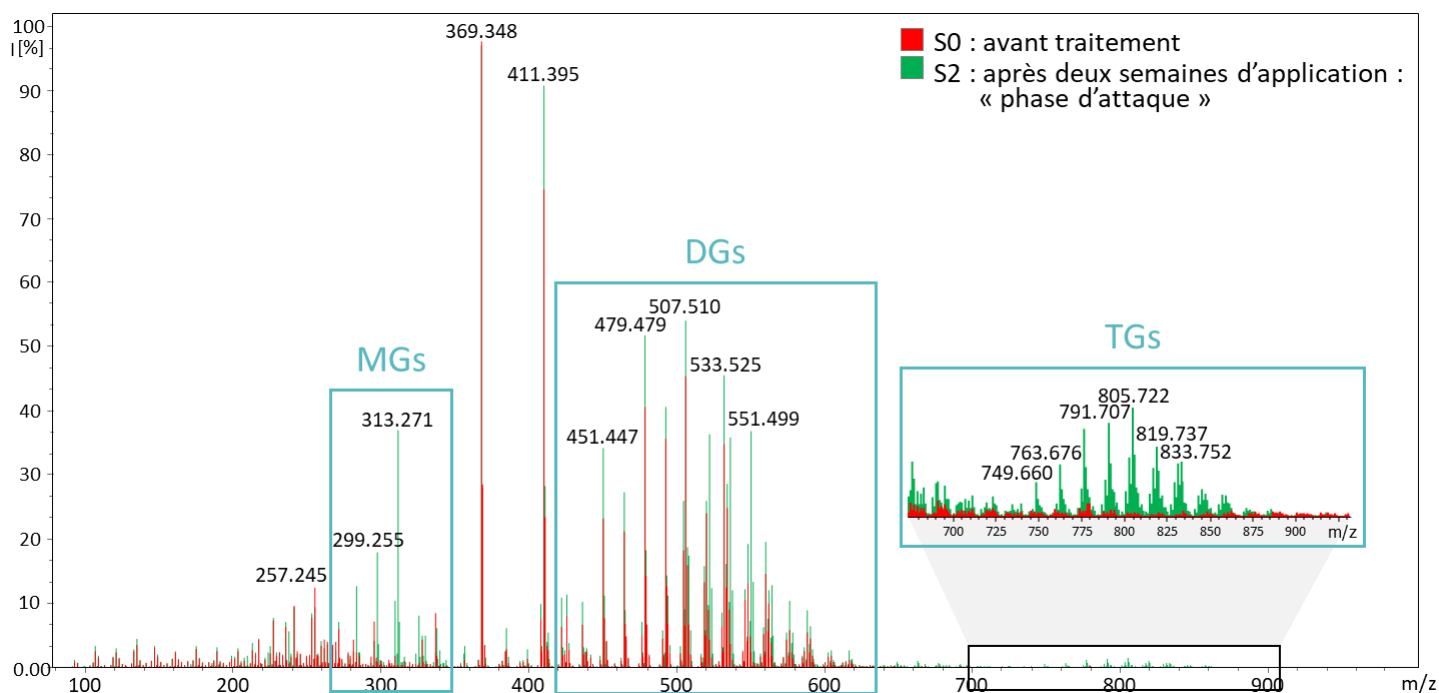


Figure 43 : Spectres MS du sébum du cuir chevelu de sujets atteints de DS à S0 donc avant traitement (Rouge) et à S2, donc après deux semaines de traitement, correspondant à la « phase d'attaque » avec le shampoing antifongique KelulaDS (Vert). DGs : Diglycérides ; MGs : Monoglycérides ; S : Semaine ; TGs : Triglycérides.

Le shampoing KelualDS permettait la diminution de marqueurs inflammatoires et de la perturbation de la barrière épidermique tels que l'histamine, l'acide arachidonique, les oxylipines¹²⁹ et l'acide urocanique. Les PUFAs sont des acides gras à très longue chaîne caractérisés par la présence d'au moins deux doubles liaisons carbone-carbone. Certains PUFAs jouent un rôle clé en tant que précurseurs de molécules de signalisation capables de moduler la composition membranaire, la signalisation des récepteurs, l'expression génique et les processus inflammatoires. Parmi eux, l'acide arachidonique (20:4n-6) est le deuxième PUFAs le plus abondant dans l'épiderme humain, bien que sa concentration reste inférieure à 3%. Il joue un rôle de précurseur de molécules pro-inflammatoires telles que les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes et les oxylipines. Une diminution marquée de l'acide arachidonique a été observée après deux semaines de phase d'attaque, mettant en évidence une réduction de l'état inflammatoire suite au traitement. Les oxylipines, dérivées des PUFAs, jouent un rôle central dans les réactions inflammatoires cutanées et possèdent un large éventail d'actions. Elles se divisent en plusieurs groupes, notamment les prostaglandines, les leucotriènes, et les acides gras mono- et poly-hydroxylés³¹⁸. Dans cette étude, deux oxylipines, la 9-HODE et la 13-HOTE, ont été significativement réduites après deux semaines de traitement. Ces molécules sont respectivement impliquées dans la libération de cytokines inflammatoires¹²⁹ et l'activation de la réponse inflammatoire³¹⁹. Parallèlement, l'histamine et ses récepteurs forment un système immunorégulateur

complexe, faisant de l'histamine un biomarqueur clé de l'inflammation. En tant que puissant médiateur inflammatoire, l'histamine intensifie et prolonge la réponse immunitaire en recrutant diverses molécules et cellules impliquées dans ce processus¹¹⁷. Elle joue également un rôle sur la barrière épidermique en réduisant l'expression de la FLG³²⁰. De plus, l'histamine est un marqueur de référence associé aux démangeaisons dans la DS^{128,321,322}. Conformément à la réduction observée pour d'autres marqueurs inflammatoires dans cette étude avec SpiderMass, le niveau d'histamine avait également diminué après deux semaines de traitement.

En plus de son rôle structural, la FLG est progressivement dégradée par des protéases, libérant des acides aminés et ensuite des dérivés d'acides aminés hygroscopiques tels que l'acide trans-urocanique et l'acide pyroglutamique²²⁷. Ces composants, connus sous le nom de NMF, jouent un rôle essentiel dans le maintien et l'intégrité de la barrière épidermique, la régulation du pH et l'hydratation de la peau¹¹⁰. Dans cette étude, une réduction significative de l'acide urocanique a été observée après deux semaines de traitement intensif, suivi d'une stabilisation pendant la phase d'entretien. Ces résultats suggèrent que le traitement contribue également à restaurer le processus de renouvellement cutané. Cette fois, sur la composante « mortar » du SC, et plus spécifiquement sur les Cer, bien que leur rôle principal soit de constituer la matrice extracellulaire de l'épiderme, contribuant ainsi largement à la fonction barrière, les Cer sont également considérés comme des lipides bioactifs impliqués dans la signalisation lipidique. Il est important de souligner que le métabolisme des SPs peut être activé par divers stimuli, notamment les réponses inflammatoires^{323,324}. L'ensemble de ces résultats sur les Sps dans l'étude KelualDS suggèrent que le traitement testé a modulé la dynamique des Cer sur le cuir chevelu. Étant donné que les Cer sont impliqués dans l'apoptose et les voies inflammatoires³²⁵, les résultats pourraient refléter des niveaux altérés d'inflammation, en cohérence avec les régulations négatives des oxylipines, de l'histamine ou de l'acide arachidonique.

Enfin, d'autres voies métaboliques étaient impactées par le shampoing traitant KelualDS, dont l'une en augmentant la sérotonine. Cette molécule du système neuroendocrinien largement distribuée dans tout l'organisme, est surtout connue pour son rôle dans les réponses au stress, l'appétit, le sommeil, le désir sexuel, la mémoire et le comportement³²⁶. Cependant, la sérotonine, également appelée 5-hydroxytryptamine ou 5-HT est un médiateur important entre ce système neuroendocrinien et la peau, en étant impliquée dans plusieurs fonctions encore mal comprises, mais faisant l'objet de recherches croissantes. Bien que les mécanismes exacts ne soient pas entièrement élucidés, il est désormais établi que la sérotonine influence la synthèse de mélatonine³²⁷ dans la peau et régule les processus inflammatoires³²⁸. Elle est ainsi retrouvée en concentrations élevées dans la peau des patients souffrant de DA, d'eczéma chronique ou de Pso³²⁹⁻³³¹. En ce qui concerne la relation entre la sérotonine cutanée et la DS, bien qu'aucune étude ne la mentionne directement, des recherches menées sur des modèles murins et humains ont permis de démontrer que la sérotonine induit des démangeaisons, un symptôme bien connu de la DS³³²⁻³³⁴.

Pendant ces deux semaines de traitement intensif, un fort changement dans le profil lipidique du cuir chevelu a été observé, avec une réduction des marqueurs inflammatoires et une amélioration de l'intégrité de la barrière épidermique du cuir chevelu des patients. Certains changements, tels que la diminution des acides gras libres (FFAs) et l'augmentation des TGs après deux semaines de traitement intensif, corroborent des observations antérieures réalisées à l'aide d'analyses conventionnelles par GC-MS sur des patients atteints de DS, avant et après un traitement par shampoing antifongique³³⁵. Par ailleurs, cette étude a également démontré que le rapport entre les FFAs et les TGs, mesuré par spectroscopie FTIR, constitue un descripteur pertinent de l'état du sébum du cuir chevelu dans le contexte de la DS.

7.5 Croisement des données acquises par SpiderMass avec une analyse métabolomique

Dans le cadre de cette étude sur le shampoing traitant KelualDS, une analyse métabolomique a été réalisée par un sous-traitant (Metabolon) en utilisant quatre méthodes distinctes, chacune appliquée sur un des quatre aliquotes fait à partir d'échantillons prélevés avec un écouvillon. Toutes les méthodes utilisent une chromatographie liquide ultra-performante (UPLC) Waters ACQUITY couplée à une source d'ionisation par électrospray chauffée (HESI-II) et un spectromètre de masse Orbitrap (Thermo Scientific, Q-Exactive). Les deux premiers aliquotes ont été analysés en conditions acides en mode positif, à l'aide d'une colonne C18 (Waters UPLC BEH C18- 2,1x100 mm, 1,7 μ m) avec un mélange d'eau et de méthanol contenant 0,05 % d'acide perfluoropentanoïque (PFPA) et 0,1 % d'acide formique, ou avec un autre mélange de méthanol, acétonitrile, eau, 0,05 % de PFPA et 0,01 % d'acide formique. Le troisième aliquote est analysé en conditions basiques et en mode négatif, en utilisant la même colonne et les analytes étaient élués par gradient en utilisant du méthanol et de l'eau, avec 6,5 mM de bicarbonate d'ammonium à pH 8. Enfin le quatrième et dernier aliquotes a été analysé en mode négatif avec une colonne HILIC (Waters UPLC BEH Amide 2,1 x 150 mm, 1,7 μ m) en utilisant un gradient d'eau et d'acétonitrile avec 10 mM de formate d'ammonium à pH 10,8.

Bien que l'analyse métabolomique réalisée en LC-MS ne couvre pas entièrement la même plage de composés que l'analyse SpiderMass, qui est plus orientée vers la lipidomique, nous avons pu comparer les FC des molécules dont les niveaux étaient significativement modifiés dans chaque méthode. L'analyse métabolomique LC-MS avait permis d'identifier 31 molécules surproduites et 130 sous-régulées de manière significative entre les phases S0 et S2, avec un $FC_{abs} \geq 1,5$. Parmi ces molécules seulement 16 étaient également identifiées dans l'analyse SpiderMass (**Figure 44**).

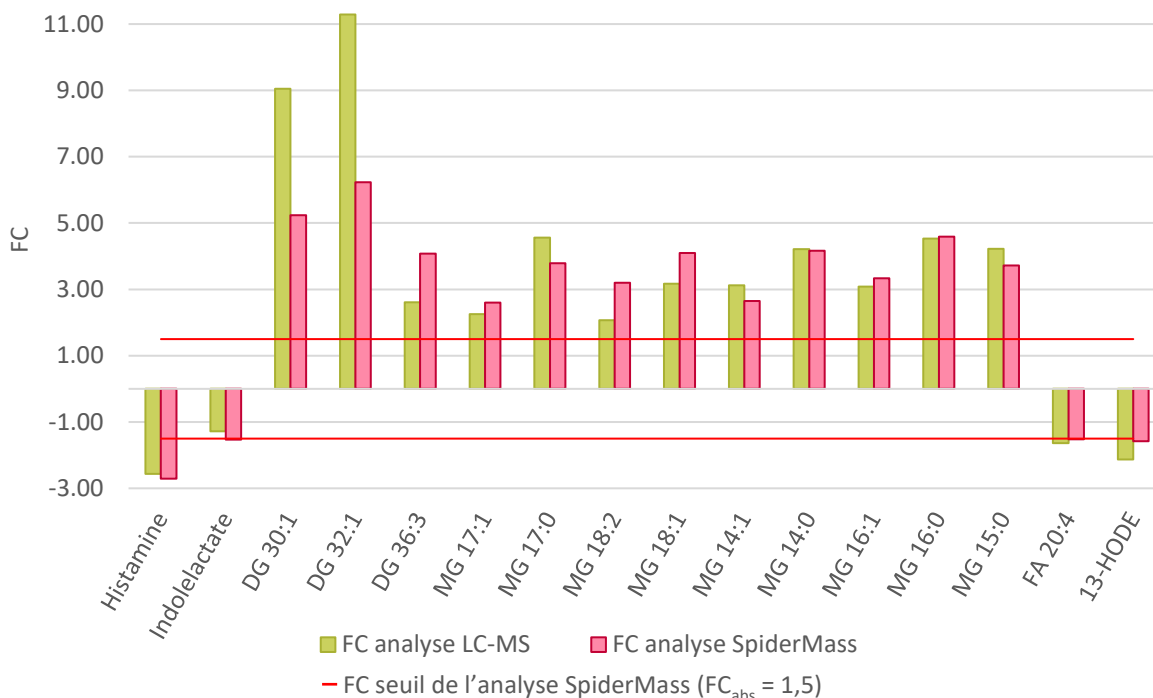


Figure 44 : Représentation du FC des analyses LC-MS et de l'analyse SpiderMass pour les 16 molécules trouvées significativement modulées dans les 2 analyses et avec un $FC \geq 1,5$ dans l'analyse SpiderMass. DG : Diglycéride ; FA : Fatty Acid (Acide Gras) ; FC : Fold Change; MG : Monoglycéride.

Il s'agissait de la première comparaison entre l'analyse SpiderMass et une analyse conventionnelle utilisant des échantillons prélevés chez les mêmes patients, bien que ces deux analyses ne se concentrent pas sur les mêmes plages de masse. Cette comparaison a permis de mettre en évidence une correspondance dans le FC des molécules significativement modulées dans les deux analyses, et présentant un $FC_{abs} \geq 1,5$ dans l'analyse SpiderMass. Ces résultats suggèrent que l'analyse SpiderMass peut produire des données fiables et cohérentes, notamment en termes de quantification, avec celles obtenues par analyse conventionnelle. Afin de valider ces résultats sur un plus grand nombre de molécule, il serait pertinent, dans de futures études, de réaliser une comparaison approfondie entre l'analyse LC-MS conventionnelle et SpiderMass, en incluant une analyse lipidomique, afin d'aligner les plages de masse entre les deux approches.

8 Le SpiderMass : outil d'analyse de la peau saine après application de produit cosmétique

Après avoir démontré que le SpiderMass pouvait détecter et suivre les modifications cutanées sur des dermatoses, caractérisées par une forte dérégulation métabolique, il était essentiel d'évaluer ses capacités sur une peau saine. L'objectif était d'identifier des altérations plus subtiles du profil moléculaire de la peau afin de confirmer les premiers résultats obtenus sur des peaux pathologiques. Pour cela, une étude clinique a été menée au Centre de Recherche sur la Peau PFDC. Des volontaires à la peau saine ont appliqué quotidiennement une crème aux rétinoïdes pendant huit semaines.

Les rétinoïdes, dérivés de la vitamine A (Rétinol, ROL), régulent la croissance et la différenciation des cellules épithéliales. Grâce à leurs propriétés, ils sont largement utilisés pour traiter certaines dermatoses inflammatoires chroniques, comme l'acné et le Pso, ainsi que pour atténuer les effets du vieillissement cutané (photoaging). Leur usage permet d'améliorer la texture, l'épaisseur, l'élasticité et l'apparence de la peau, comme cela est visible dans différentes études sur le ROL³³⁶⁻³³⁸. Bien que plusieurs études comparent l'efficacité des rétinoïdes sur les effets visibles du photoaging, peu se sont spécifiquement intéressées au rétinaldéhyde (ou rétinol, RAL), un précurseur de l'acide rétinoïque commercialisé par PFDC. De plus, la majorité des recherches existantes se limitent à des mesures comme l'hydratation via la mesure de l'IH et la PIE. Il nous semblait donc pertinent d'aller plus loin en proposant une évaluation objective des modifications moléculaires induites par ces molécules après plusieurs semaines d'applications répétées, afin de mieux comparer leurs effets.

8.1 L'étude RetinoSpider

L'étude RétinoSpider était une étude comparative, monocentrique, randomisée et menée en groupes parallèles. Son titre complet était : « Étude comparative, randomisée et contrôlée utilisant le SpiderMass pour l'analyse évolutive des profils moléculaires de l'épiderme (notamment lipidiques) de la face et de paramètres biométaboliques de plusieurs rétinoïdes topiques sur des sujets à peau saine ». Elle a été réalisée au Centre de Recherche sur la Peau Pierre Fabre à Toulouse sur 68 femmes âgées de 40 à 65 ans ayant une peau saine (**Annexe 11 : Critères d'éligibilité de RetinoSpider**), cependant à cause d'une panne du SpiderMass trois sujets ont dû être sortis prématurément de l'étude à la première visite, ramenant à 65 le nombre de sujets analysables en fin d'étude, dont les principales caractéristiques démographiques sont résumées dans le **Tableau 11**. L'objectif principal était d'évaluer l'effet de différents rétinoïdes sur la peau en comparaison avec une simple base hydratante. Plus précisément, l'étude visait à caractériser les signaux moléculaires, notamment lipidiques, de l'épiderme facial avant et après une application quotidienne de rétinoïdes pendant deux mois, grâce à une analyse *in-vivo* par SpiderMass. En complément, plusieurs paramètres biométaboliques ont été mesurés, dont l'hydratation cutanée via l'IH, l'état de la barrière cutanée via la PIE et la texture ainsi que la rougeur de la peau grâce à des photographies standardisées avec ColorFace®.

	Total	Produit A	Produit B	Produit C	Produit D
Sexe : Femme (100%)	65	17	16	15	17
Age moyen (+/-STD)	53,18 (+/-7,25) ans	52,24 (+/- 8,91) ans	52,50 (+/- 6,15) ans	52,73 (+/- 7,46) ans	55,18 (+/- 6,40) ans
Age médian / Min-Max	54 ans / 40 – 65 ans	50 ans / 40 – 64 ans	52 ans / 40 – 65 ans	54 ans / 40 – 63 ans	56 ans / 40 – 63 ans
Phototypes II / III / IV	9 (14%) / 47 (72%) / 9 (14%)	4 (24%) / 9 (53%) / 4 (24%)	2 (13%) / 10 (63%) / 4 (25%)	1 (7%) / 13 (87%) / 1 (7%)	2 (12%) / 15 (88%) / 0

Tableau 11 : Tableau résumé des principales caractéristiques démographiques de la population étudiée en SpiderMass dans l'étude RETINOSPIDER et répartie dans les différents groupes et analysée pour les données SpiderMass ; STD : Standard déviation.

Les 65 participantes ont été réparties aléatoirement en quatre groupes, chacun appliquant un seul produit pendant toute la durée de l'étude dont elles ne connaissaient pas la composition. Ces produits, spécialement formulés pour l'essai, partageaient la même base excipient, mais avec un rétinol différent : le ROL, le RAL et le rétinyl palmitate (RYL). Un quatrième groupe servait de contrôle en appliquant uniquement la base excipient. L'étude s'est déroulée sur huit semaines avec trois visites de suivi : une visite d'inclusion en début d'étude, une visite intermédiaire après quatre semaines et une visite finale après huit semaines. Lors de chaque visite, toutes les mesures étaient réalisées, incluant l'analyse *in-vivo* SpiderMass, l'évaluation de l'IH et de la PIE ainsi que les prises de vue standardisées.

8.2 Caractéristiques générales des masses détectées et modulées dans l'étude RetinoSpider

Dans cette étude, seule la comparaison à T3 entre le RAL et le groupe contrôle (CTL) a été analysée, car c'était la seule condition présentant des masses significativement modulées (p -value $\leq 0,05$). La liste des masses concernées ainsi que leur répartition dans les différents niveaux d'identification est présentée dans le **Tableau 12** et illustrée sur le volcanoplot en **Figure 45**. Compte tenu de la différence importante entre le seuil FC_{abs} de 1,5 et 1,4 comprenant un nombre de masses de 48 contre 200 respectivement, le seuil de FC_{abs} a été fixé à 1,4 afin d'obtenir un volume de données suffisamment exploitable.

	T3 RAL vs CTL
Signaux modulés significativement (p -value $\leq 0,05$)	640
$\uparrow$ $\downarrow$	289 351
Signaux après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,4$	200
$\uparrow$ $\downarrow$	83 117
Signaux identifiés en Niveau 1 Équivalent en molécules	3 3
Signaux identifiés en Niveau 2 Équivalent en molécules	100 66
Signaux identifiés en Niveau 3 Équivalent en molécules	41 28
Signaux identifiés comme produits	11
Isotopes (niveau 1, 2 et 3)	45
Non identifiés	45

Tableau 12 : Détail des signaux modulés significativement (p -value $\leq 0,05$) comprenant les signaux surproduits et les signaux sous-produits pour la comparaison étudiée dans l'étude ainsi que les signaux obtenus après filtrage avec un $FC_{abs} \geq 1,4$ avec leur répartition dans les différents niveaux d'identification. CTL : Contrôle ; FC_{abs} : Fold Change absolu ; RAL : Rétinal.



Figure 45 : Volcanoplot des masses de la comparaison RAL vs CTL à T3. Points verts : masses non significatives et avec un $FC_{abs} \leq 1,4$; Points Bleus : masses significatives mais $FC_{abs} \leq 1,4$; Points rouges : masses non significatives mais $FC_{abs} \geq 1,4$; Points violets : masses significatives et $FC_{abs} \geq 1,4$.

8.3 Identification des molécules significativement modulées dans la comparaison du RAL vs CTL

Au total, 69 molécules ont été identifiées par fragmentation (niveau 1 et 2) dans l'étude RetinoSpider. Elles se répartissaient en 7 super-classes et 12 classes principales (**Annexe 12 : Assignations RetinoSpider**). Comme pour les études SMPatho et KelualDS, leur classification reposait sur la nomenclature de LipidMaps pour les lipides et de HMDB pour les métabolites. Parmi ces 69 molécules, 10 acyles gras ont été identifiés par fragmentation, répartis en deux groupes : un FFA et neuf esters gras, exclusivement des WEs. Toutes les WE étaient en diminution, à l'exception d'une qui était augmentée chez les sujets ayant appliqué le produit contenant du RAL. Cette WE particulière se distinguait par une chaîne de longueur moyenne et l'absence d'insaturation, contrairement aux autres, qui possédaient au moins une insaturation et une chaîne longue à très longue. Le seul FFA identifié était un FA hydroxylé, le FA 10:5;O, qui était également augmenté dans le groupe appliquant le produit avec du RAL.

La deuxième super classe modulée dans cette étude sur les rétinoïdes et qui était d'ailleurs la classe avec le plus de molécules modulées était celle des GLs. Les 3 familles de GLs étaient identifiées dans cette étude avec pour toutes une diminution dans le groupe appliquant du RAL.

Dans la comparaison entre le RAL et le groupe CTL à T3, 15 SPs ont été identifiés, répartis en deux classes principales comprenant 7 SPBs et 8 Cer. Parmi les SPBs, on distinguait quatre familles. La première, celle des sphingosines [S], comprenait une seule molécule, la sphingosine elle-même, dont le niveau était augmenté dans le groupe ayant appliqué le RAL. La deuxième, celle des sphinganine [DS], comptait quatre molécules, toutes également en augmentation. La troisième, celle des 6-hydroxysphingosines [H], ne contenait qu'une seule molécule, tout comme la dernière famille, celle des phytosphingosines, et ces deux molécules étaient également augmentées dans le groupe RAL. Concernant les huit Cer, trois familles étaient modulées chez les sujets ayant appliqué le RAL par rapport au groupe contrôle. La première famille inclut deux sphingosines : une [NS], dont le niveau était diminué, et une [AS], qui était au contraire augmentée. La deuxième famille regroupait trois dihydrosphingosines, dont deux [NDS] et une [ADS], toutes augmentées dans le groupe RAL. Enfin, la troisième famille était celle des phytocéramides, comprenant une [NP] et deux [AP], également toutes en augmentation chez les sujets ayant appliqués le RAL.

La dernière super-classe lipidique présentant une modulation identifiée en niveau 1 ou 2 était celle des stérols, avec quatre molécules. Parmi elles, deux étaient des secostéroïdes, plus précisément des dérivés de la vitamine D3, dont la production était augmentée dans la peau des sujets du groupe RAL. Un autre composé modulé était le 32-hydroxylanostérol, un dérivé du cholestérol, également retrouvé en surproduction dans ce groupe. Enfin, un ester de cholestérol a été identifié, mais cette fois en sous-production chez les sujets ayant appliqué le RAL.

Enfin, 10 métabolites ont été identifiés dans cette étude, répartis en trois catégories : six acides organiques et dérivés, trois composés organohétérocycliques et un composé organique oxygéné. Les six acides organiques et dérivés étaient soit des acides aminés, soit des dipeptides, et tous étaient en surproduction dans le groupe RAL. Les deux acides aminés identifiés étaient la proline (FC = 1,41) et la glutamine (FC = 1,54). Parmi les quatre dipeptides, trois contenaient une proline et l'ensemble des dipeptides était également augmenté dans ce groupe. Les trois composés organohétérocycliques étaient tous des indoles ou des dérivés, avec une production accrue chez les sujets ayant appliqués le RAL. Il s'agissait de l'acide indoleacrylique (FC = 1,41), de l'acide indolelactique (FC = 1,47) et de l'adrénochrome O-semiquinone (FC = 2,15). Enfin, le seul composé organique oxygéné identifié était l'acide benzoquinoneacétique, dont la production était également augmentée dans le groupe RAL.

8.4 Validation des identifications par la méthode du Kendrick's plot

Pour compléter les options accessibles pour l'identification des molécules et plus particulièrement des lipides de la peau, un logiciel utilisant la méthode Kendrick's plot a été développé en interne sur MatLab. La méthode Kendrick's Plot est une approche utilisée principalement en spectrométrie de masse pour l'étude des lipides et des hydrocarbures. Elle se base sur le défaut de masse des composés. La différence entre la masse nominale et la masse exacte mesurée. Ce défaut de masse renvoi des informations sur la composition atomique des composés. Ainsi en reportant le défaut de masse de Kendrick, elle permet de visualiser et de classer des espèces moléculaires en fonction de leur structure chimique et plus particulièrement d'une possible tête polaire et de motifs récurrents. Le principe repose sur la transformation des masses exactes des composés en masses Kendrick, où la masse du méthylène ($-\text{CH}_2-$) est normalisée à une valeur entière (14,0000 u au lieu de 14,01565 u dans le référentiel du tableau périodique courant). En représentant la masse nominale Kendrick en abscisse et la déficience de masse Kendrick en ordonnée, on obtient un graphique où les espèces avec une même tête polaire mais un nombre de groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) différent vont s'aligner sur des lignes horizontales dans un diagramme de Kendrick^{339,340}.

Dans notre cas, la librairie créée et enrichie au cours des études et des analyses, servait de référence dans le Kendrick's Plot. Les points colorés et annotés sur la **Figure 46** correspondaient aux molécules de cette librairie, tandis que les points gris représentaient les masses détectées dans l'étude. Tout d'abord, cette approche permettait de confirmer une identification en effet si un composé se situait précisément entre une molécule similaire avec un groupe CH_2 en moins et une autre avec un CH_2 en plus, cela validait son identification. Ensuite, comme précisé plus haut, ce plot permettait d'observer les lipides partageant une même tête polaire mais présentant des longueurs de chaîne différentes, qui s'alignent sur une même ligne horizontale. Il permettait également d'identifier les insaturations pour une même tête polaire. Par exemple, en **Figure 46**, les TGs apparaissaient sous forme de lignes horizontales et plusieurs lignes distinctes étaient visibles, à chaque nouvelle insaturation, le défaut de masse Kendrick varie d'environ 1,5, provoquant un décalage vertical.

Cette représentation facilitait donc l'identification de composés d'une étude absents de la librairie. Un exemple parlant se trouve en **Figure 46** : un cercle rose indique une absence de point cependant si une masse significative avait été détectée à cet emplacement dans une étude, il aurait été facile de l'identifier. Étant positionnée sur la ligne des TGs, entre TG 49:1 et TG 51:1, cette masse correspondrait logiquement au TG 50:1.

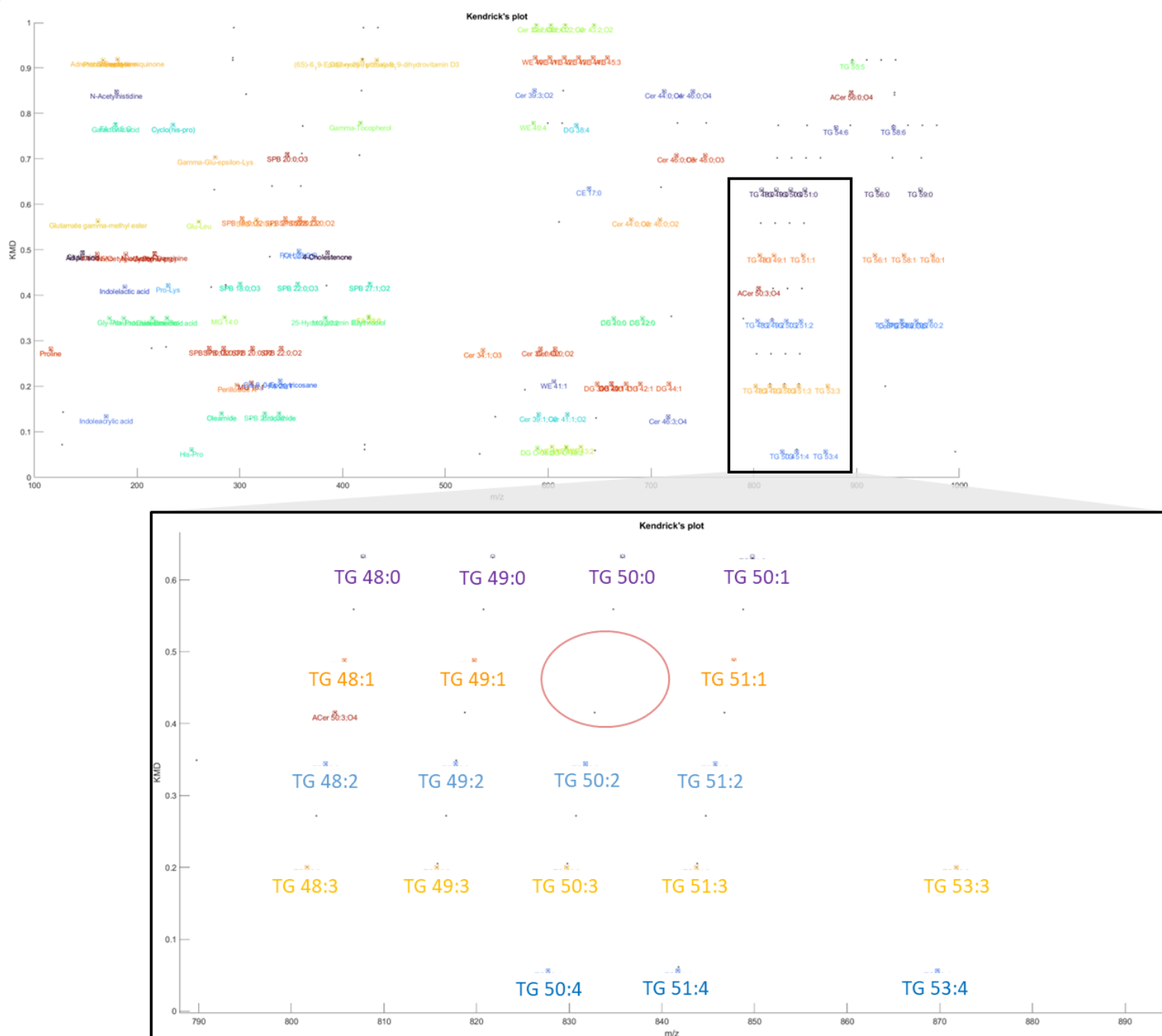


Figure 46 : Représentation du Kendrick's Plot de l'étude RetinoSpider, représentant la masse nominale Kendrick en abscisse et le défaut de masse Kendrick en ordonnée. Sur ce graphique, les espèces avec une même tête polaire mais un nombre de groupements méthylène ($-CH_2-$) différents vont s'aligner sur des lignes horizontales et à chaque nouvelle insaturation, le défaut de masse Kendrick varie d'environ 1,5, provoquant un décalage vertical. TG : Triglycéride.

Cette technique permet d'annoter au niveau 3 les masses qui ne peuvent pas être fragmentées et qui sont absentes de la Library SpiderMass.

8.5 Discussion sur les résultats de l'étude RetinoSpider

Les rétinoïdes choisis dans cette étude sont des intermédiaires du métabolisme de l'acide rétinoïque, la forme biologiquement active (**Figure 47**). Leur transformation en acide rétinoïque débute par la rupture de la liaison ester du RYL, suivie d'oxydations successives du ROL en RAL. La conversion

finale du RAL en acide rétinoïque constitue une étape limitante et irréversible, catalysée par la rétinaldéhyde oxydase.

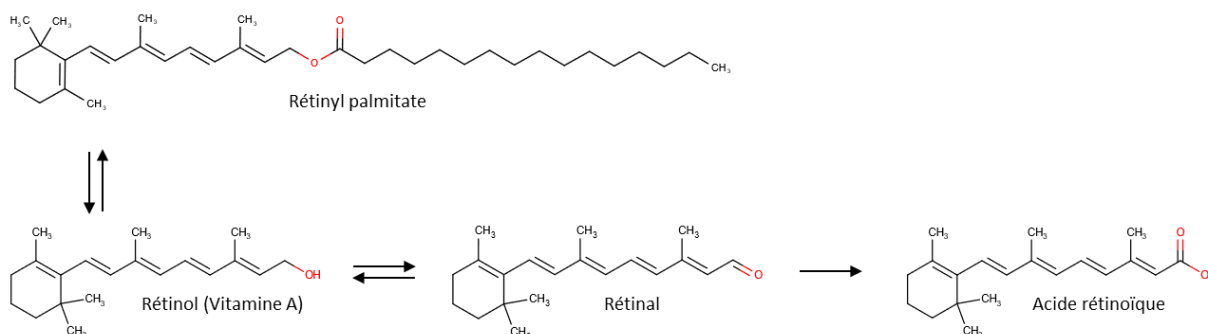


Figure 47 : Schéma simplifié de la synthèse de l'acide rétinoïque à partir des rétinoïdes topiques de l'étude RetinoSpider.

Bien que l'étude RetinoSpider n'ait révélé aucun résultat significatif pour les comparaisons ROL vs CTL, RYL vs CTL, RAL vs ROL et RAL vs RYL en fin de traitement, une tendance générale se dessinait néanmoins sur l'ensemble des comparaisons. L'ensemble des signaux identifiés dans cette étude sur les rétinoïdes pouvaient être regroupées au sein de voies métaboliques spécifiques telles que la régulation de l'excrétion du sébum, la prolifération cellulaire, le métabolisme de la vitamine D et le microbiote et son métabolisme du tryptophane.

Depuis plusieurs décennies, la littérature scientifique montre que les rétinoïdes inhibent la sécrétion de sébum^{341,342}. Bien que leur mécanisme d'action exact reste encore mal compris, il est établi que les rétinoïdes administrés par voie systémique (orale) réduisent la production de sébum en limitant la prolifération des sébocytes basaux et la différenciation des sébocytes terminaux, tout en diminuant la taille globale des glandes sébacées^{343–350}. Ces effets sont principalement observés avec des rétinoïdes oraux comme l'isotrétinoïne, mais également, bien que de manière moins unanime, avec des applications topiques d'isotrétinoïne ou de ROL³⁵¹. Cette réduction de sébum est généralement évaluée à l'aide d'un sébumètre. Avec le SpiderMass, elle pouvait être mise en évidence par la diminution de certaines familles de lipides spécifiques du sébum, comme les GLs et les WEs. Ces dernières, en particulier celles contenant un acide gras 16:1, sont exclusivement présentes dans le sébum humain⁹⁰ donc de bon biomarqueur de la quantité de sébum. Des modifications similaires du profil lipidique du sébum avaient déjà été rapportées en 1982 par Gerber et al., qui avaient observé une diminution des WEs mais pas sur les TGs³⁴². Bien que la réduction du sébum était significative uniquement dans la comparaison RAL vs CTL, une tendance à la baisse était également observable pour les deux autres traitements comparés au groupe contrôle (**Figure 48**).

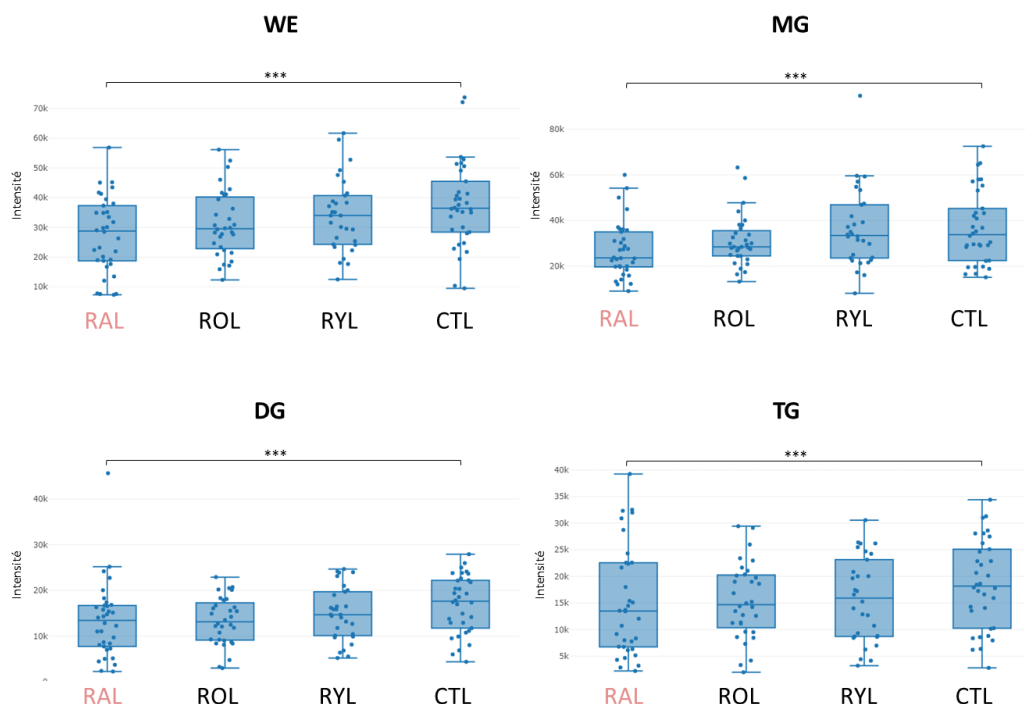


Figure 48 : Boxplot d'un exemple de molécules dans chacune des familles impliquées dans la visualisation de la diminution du sébum après un traitement au rétinol. CTL : groupe contrôle ; DG : diglycérider ; MG : monoglycérider ; RAL : rétinol ; ROL : rétinol ; RYL : rétinyl palmitate ; TG : triglycérider ; WE : cécide (wax esters). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

Le RAL, le ROL et le RYL, étant liposolubles, pénètrent facilement dans la couche cornée puis dans les kératinocytes, où ils sont métabolisés en acide rétinol. Ce dernier se fixe ensuite sur les récepteurs aux rétinol (RXR), déclenchant une cascade d'activités cellulaires, notamment la stimulation de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes^{351–354}. L'augmentation de la prolifération cellulaire se traduit par l'expression de plusieurs marqueurs, en particulier ceux associés à une demande accrue en protéines, tels que les peptides, les dipeptides et les AA³⁵². Ces composés ont été retrouvés en augmentation dans la comparaison RAL vs CTL (**Figure 49**). Parmi eux, la glutamine, identifiée comme l'un des deux acides aminés surproduits dans la peau des sujets traités par le RAL, est bien connue pour son rôle clé dans le renouvellement protéique des muscles striés squelettiques, ainsi que dans le métabolisme des cellules épithéliales intestinales³⁵⁵.

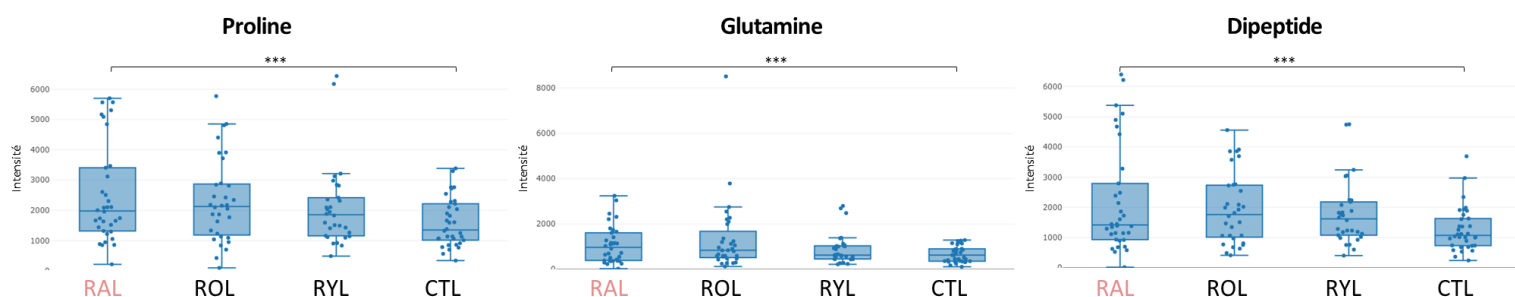


Figure 49 : Boxplot de deux acides aminés : la proline et la glutamine et d'un exemple de dipeptides impliquées dans la visualisation de l'augmentation de la prolifération des kératinocytes après un traitement au rétinol. CTL : groupe contrôle ; RAL : rétinol ; ROL : rétinol ; RYL : rétinyl palmitate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

L'augmentation du renouvellement cellulaire influence directement les Cer, principaux lipides de la matrice extracellulaire du SC, à plusieurs niveaux. D'une part, une prolifération accrue des kératinocytes nécessite une production renforcée de matrice extracellulaire, ce qui entraîne une augmentation des Cer, essentiels au maintien de la cohésion cellulaire. D'autre part, un turn-over

cellulaire accéléré favorise un relâchement des connexions entre les cellules épidermiques afin de faciliter la desquamation. Dans notre étude, cela pourrait être corrélé à l'augmentation de la PIE, observée uniquement chez les sujets ayant appliqués du RAL. Toutefois, ce paramètre est habituellement observé en diminution dans d'autres études portant sur les rétinoïdes topiques^{356–358}. Enfin, bien qu'il existe une distinction entre l'expression des protéines impliquées dans une voie métabolique et les métabolites issus de cette même voie, nos résultats sur les Cer semblent particuliers. En effet, alors que leur augmentation est cohérente avec la prolifération accrue des kératinocytes, elle ne correspond pas aux observations d'Abed et al., qui ont rapporté une diminution des protéines impliquées dans la synthèse des Cer³⁵².

Il est important de souligner que l'augmentation du renouvellement cellulaire est l'effet recherché du RAL pour atténuer les signes de l'âge. Ce processus ne se traduit pas seulement par des marqueurs moléculaires, mais aussi par des améliorations visibles sur les photographies standardisées. Après 8 semaines d'application du RAL, une nette amélioration des 2 paramètres analysés était observée. Le contraste, qui reflète la netteté des textures et donc des rides, était réduit, cela se voyant même à l'œil nu sur les photos du sujet médian (**Figure 50**). L'entropie, mesurant la répartition des textures, diminuait également, notamment au niveau de la patte d'oie. Ces résultats démontraient une amélioration globale de la texture de la peau, caractérisée par une diminution des irrégularités et une meilleure répartition des textures.



Figure 50 : Photos standardisées au ColorFace® du sujet médian de l'évolution des pattes d'oie après 2 mois d'application journalière d'une crème contenant du RAL. T : Temps.

La vitamine D3 joue un rôle essentiel dans la peau, notamment dans la formation de la barrière épidermique et des follicules pileux. Sa carence est associée à divers troubles cutanés prolifératifs et inflammatoires^{118,359–362}, et elle est parfois utilisée comme traitement dans certaines affections, comme le Pso³⁶³.

Bien que peu d'études aient exploré l'interaction entre les dérivés de la vitamine A et la vitamine D, en particulier la vitamine D3, nos résultats mettaient en évidence une véritable connexion entre ces deux familles. Les rétinoïdes agissent sur les cellules épidermiques via les RXR, qui jouent également un rôle clé dans le mécanisme d'action de la vitamine D3. En effet, la vitamine D3 se lie au VDR (vitamin D receptor, récepteur de la vitamine D), formant un hétérodimère avec le RXR³⁶⁴. Ce complexe régule l'expression des gènes sensibles à la forme active de la vitamine D3³⁶⁵, le 1,25-dihydroxyvitamine D3 (calcitriol). Avant d'atteindre cette forme active, la vitamine D3 subit plusieurs transformations, initiées dans la peau par une réaction photochimique convertissant la provitamine D3 (7-déhydrocholestérol) en prévitamine D3. Cette dernière est ensuite isomérisée en vitamine D3, qui est transportée vers le foie pour être métabolisée en 25-hydroxyvitamine D3 (calcidiol). Ce métabolite circule ensuite vers divers tissus cibles, notamment les reins, la prostate, les seins et la peau, où il exerce des fonctions autocrines. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation de la prévitamine D3 et du calcidiol après deux mois de traitement au RAL (**Figure 51**), suggérant une modulation du métabolisme de la

vitamine D3 sous l'effet des rétinoïdes. Par ailleurs, une étude sur la maladie de Parkinson a déjà mis en évidence un rôle du RAL dans la régulation de l'expression du VDR, renforçant l'hypothèse d'une interaction entre ces deux voies métaboliques³⁶⁶.

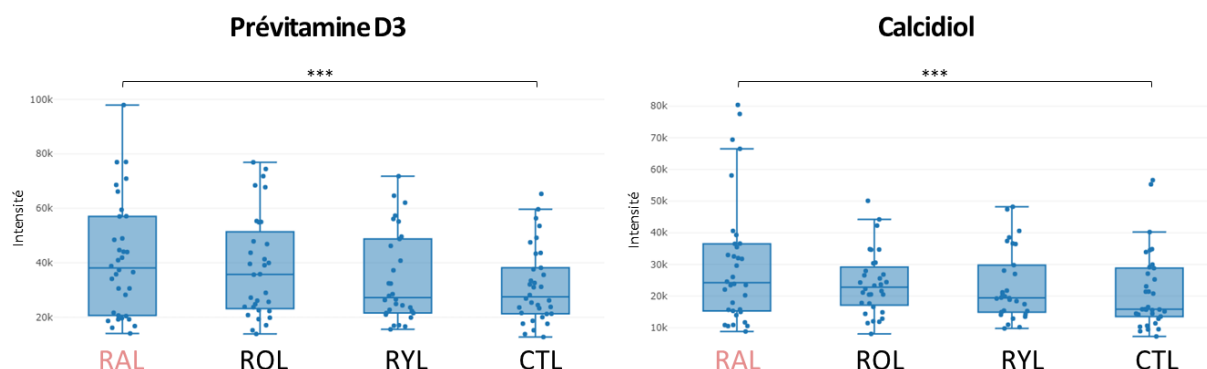


Figure 51 : Boxplot de la prévitamine D3 et de la provitamine D3 (Calcidiol) impliquées dans la visualisation de la modification du métabolisme de la vitamine D après un traitement au rétinoïde. CTL : groupe contrôle ; RAL : rétinol ; ROL : rétinol ; RYL : rétinyl palmitate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

Après deux mois de traitement au RAL, certaines molécules montraient des variations significatives par rapport au groupe sans RAL. Bien qu'elles n'étaient pas directement liées aux mécanismes métaboliques évoqués précédemment, elles semblaient s'inscrire dans une autre cascade de réactions impliquant le tryptophane et le microbiote cutané. Parmi elles, deux métabolites du tryptophane issus du microbiote, l'acide indolelactique et l'acide indoleacrylique, étaient significativement augmentés dans le groupe RAL par rapport au groupe CTL (**Figure 52**). Des études ont révélé que l'acide indoleacrylique joue un rôle clé dans le renforcement d'une autre barrière épithéliale, celle de l'intestin, où il contribue à l'amélioration de la fonction barrière et à l'atténuation des réponses inflammatoires¹¹⁵, suggérant un potentiel effet bénéfique similaire au niveau cutané.

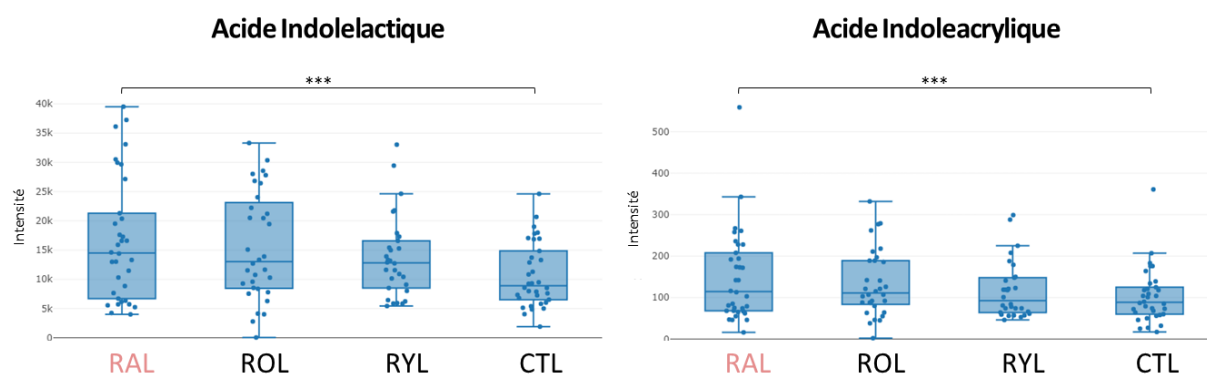


Figure 52 : Boxplot de l'acide indolelactique et de l'acide indoleacrylique impliquées dans la visualisation de la modification du métabolisme de tryptophane du microbiote cutané après un traitement au rétinoïde. CTL : groupe contrôle ; RAL : rétinol ; ROL : rétinol ; RYL : rétinyl palmitate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

8.6 Conclusion

En conclusion, cette troisième étude a mis en évidence un changement significatif du profil moléculaire de la peau après deux mois d'application d'une crème contenant 0,1 % de RAL, grâce au système SpiderMass. Comparée à la peau du groupe témoin utilisant une crème sans actif, cette modification touchait plusieurs familles de molécules et s'inscrivait dans quatre principaux mécanismes métaboliques. Avec cette étude nous avons pu démontrer que le SpiderMass pouvait également

détecter et suivre les modifications cutanées sur une peau saine après application quotidienne de produits cosmétique pendant environ un mois.

D'abord, une diminution de la quantité de sébum a été observée, caractérisée par une réduction des GLs et des WEs, marqueurs spécifiques du sébum humain. Ensuite, l'augmentation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes s'étaient traduites par une hausse des niveaux de proline et de glutamine, de dipeptides et de SPs, composants essentiels de la matrice extracellulaire de la peau. Ce renouvellement cellulaire accru pourrait également expliquer l'augmentation de la PIE après 4 et 8 semaines de traitement, ainsi que l'amélioration visible des rides de la patte d'oie observée avec le ColorFace®. Par ailleurs, une modification du métabolisme de la vitamine D a été constatée, marquée par une hausse des niveaux de prévitamine D3 et de provitamine D3 provenant peut-être d'une activation des RXR impliqués dans cette cascade métabolique. Enfin, une altération du métabolisme du tryptophane, issu du microbiote, a été observée, bien que les causes exactes de cette modification restent à déterminer, possiblement liées à un changement du microbiote cutané.

Dans cette étude, seule la comparaison entre le groupe CTL et le groupe RAL avait révélé des signaux SpiderMass significativement modulés. Toutefois, une tendance d'augmentation ou de diminution a été observée pour chaque molécule modulée entre les différents produits, bien que ces variations n'étaient pas statistiquement significatives. Cela pourrait s'expliquer par un manque de puissance de l'étude, le nombre de sujets était peut-être insuffisant pour mettre en évidence des différences significatives dans les comparaisons ROL vs CTL ou RYL vs CTL sur plusieurs marqueurs. Le fait que seule la comparaison RAL vs CTL était significative pour plusieurs marqueurs métaboliques et lipidiques s'expliquait probablement par le rôle clé du RAL en tant que dernier intermédiaire dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque, la forme biologiquement active des rétinoïdes.

Si les effets des rétinoïdes topiques font l'objet de nombreuses études, les analyses lipidomiques et métabolomiques de leur impact sur la peau restent encore rares. Certains aspects de leur métabolisme restent méconnus, et cette étude apporte de nouvelles connaissances sur les lipides et métabolites affectés par l'application répétée de rétinoïdes sur la peau du visage de personnes en bonne santé.

9 L'analyse du microbiote cutané par SpiderMass

Le SpiderMass se révèle comme un outil de choix pour l'analyse de la peau, aussi bien pour étudier les modifications biologiques liées à un état pathologique que pour suivre l'évolution moléculaire induite par l'application d'un traitement topique ou d'une crème. Il a démontré son efficacité dans l'identification des altérations clés des pathologies cutanées. Désormais, il est essentiel d'évaluer sa capacité à détecter des variations du microbiote cutané, un acteur majeur des déséquilibres de la peau.

9.1 Différencier 5 souches au SpiderMass

Pour débiter l'analyse des bactéries présentes sur la peau, une campagne de mesure a été menée sur différentes souches sélectionnées pour leur rôle dans l'homéostasie cutanée et les dermatoses. Cette étude a porté sur une souche de *Staphylococcus epidermidis* (la souche ATCC 51625), deux souches de *Staphylococcus aureus* (les souches ATCC 6538 et ATCC 29213) et deux souches de *Cutibacterium acnes* (les souches ATCC 6919 et ATCC 11827), toutes impliquées dans les équilibres et déséquilibres de la peau.

Afin de différencier ces souches, il était essentiel d'obtenir un signal clair et distinct pour chacune d'elles. Pour cela, elles ont été cultivées et incubées selon un protocole interne (**Annexe 13 : Protocole de mise en culture des bactéries cutanées : C. acnes, S. aureus et S. epidermidis**). En résumé, une pastille de bactéries était mise en suspension dans un tampon, puis la solution obtenue était étalée avec une anse sur une boîte de Pétri avant incubation à 37 °C pendant 24 h, 48 h ou 72 h avec oxygène ou en anaérobiose selon la souche. Après incubation, plusieurs colonies étaient prélevées et déposées sur un papier à cigarettes, avant d'être analysées par SpiderMass.

Pour évaluer l'impact de certains paramètres de manipulation sur les spectres MS des bactéries, plusieurs conditions ont été testées et répétées afin d'assurer la répétabilité et la reproductibilité des résultats. L'expérimentation a été réalisée en utilisant au moins trois solutions mères par souche et en répétant les manipulations sur plusieurs jours. Différents temps d'incubation ont été testés pour *S. epidermidis*, tandis que *S. aureus* et *S. epidermidis* ont été analysées à partir de différents lots de pastilles lyophilisées. De plus, plusieurs boîtes de culture ont été utilisées, et pour chaque boîte, les colonies ont été étalées sur trois papiers à cigarettes distincts en prélevant des colonies à trois endroits différents de la boîte de Pétri. Cette approche méthodique a permis d'évaluer l'influence de ces paramètres sur les spectres MS obtenus. Ces essais ont permis de collecter un total de 357 données, avec 72 échantillons pour *S. aureus* 6538, 63 pour *S. aureus* 29213, 126 pour *S. epidermidis* et 48 pour chacune des souches de *C. acnes*.

Toutes les données étaient ensuite prétraitées selon la méthode décrite en partie **5.3.2. Le prétraitement et l'analyse statistique**. Une fois le prétraitement effectué, une application interne permettait de tracer différentes ACP afin de vérifier l'éventuelle présence d'effets liés aux lots, aux solutions mères ou aux boîtes de culture. Les ACP réalisées ont révélé de légers effets en fonction de la bactérie étudiée du lot, de la boîte ou de la solution mère, sans pour autant impacter la séparation claire entre les différentes espèces ni entre les souches, comme l'illustre la **Figure 53 a)**. Cette première visualisation montre une distinction nette des trois espèces bactériennes sur l'ACP, ainsi qu'une séparation visible entre les deux souches de *C. acnes* après filtrage (**Figure 53 b)**) et les deux souches de *S. aureus* après filtrage (**Figure 53c)**).

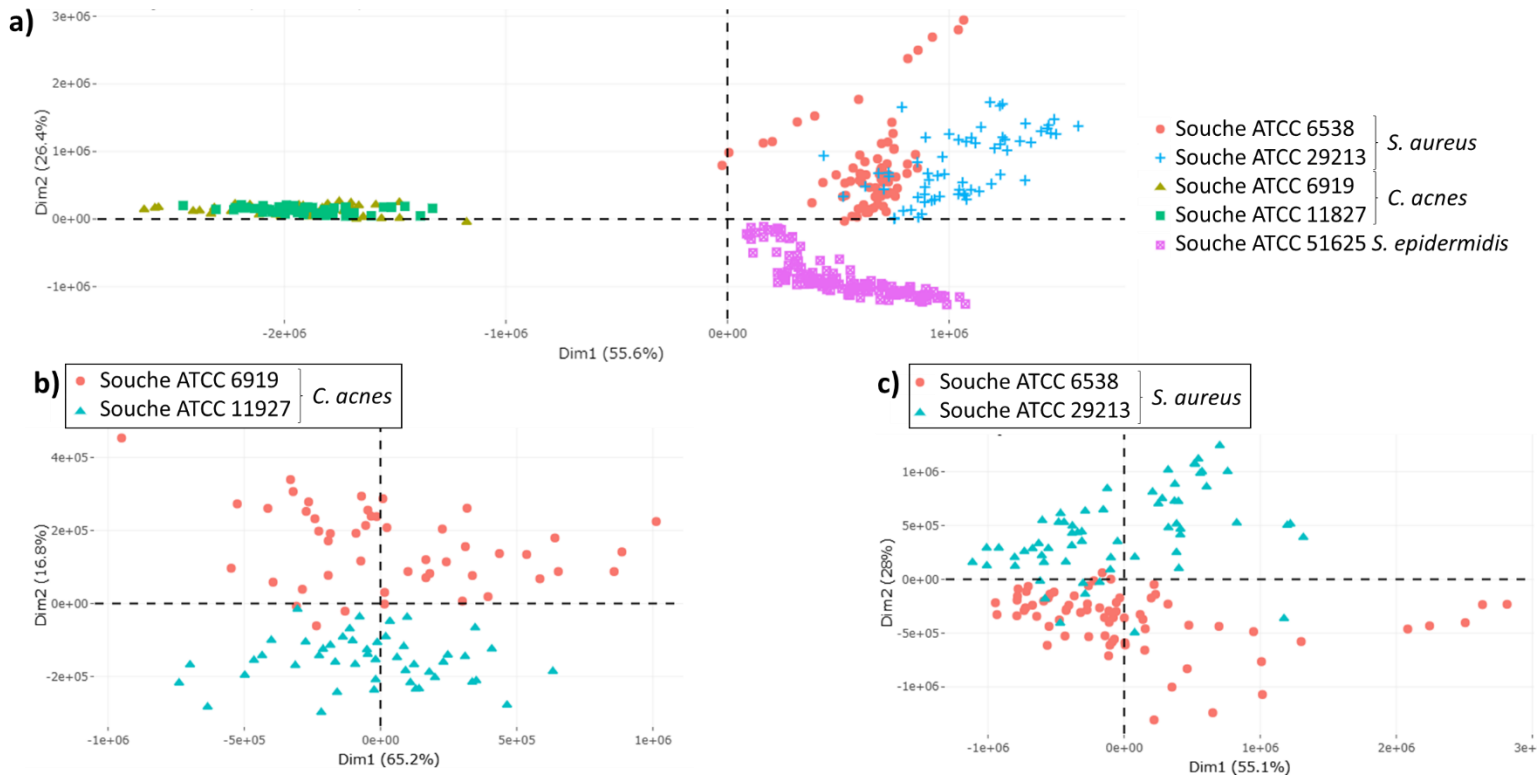


Figure 53 : a) ACP des 5 souches étudiées comprenant deux souches de *S. aureus*, 2 souches de *C. acnes* et une souche de *S. epidermidis* ; b) ACP des deux souches ATCC 6919 et ATCC 11827 de *C. acnes* après filtrage par l'espèce ; c) ACP des deux souches ATCC 6538 et ATCC 29213 de *S. aureus* après filtrage par l'espèce.

Cette préanalyse a permis d'identifier visuellement un petit nombre de masses différenciantes entre les espèces bactériennes et même entre les souches de *S. aureus*. La distinction entre les genres *Staphylococcus* et *Cutibacterium* était clairement observable sur les spectres moyens obtenus lors de cette campagne de mesure, comme le montre la **Figure 54a**). Bien que les spectres de *S. aureus* et *S. epidermidis* étaient plus similaires, certaines différences persistaient et se manifestaient par la présence de masses spécifiques (**Figure 54b**) tout comme entre les deux souches de *S. aureus* (**Figure 54c**). Ces masses ont été sélectionnées en comparant les spectres moyens de chaque espèce et souche bactérienne.

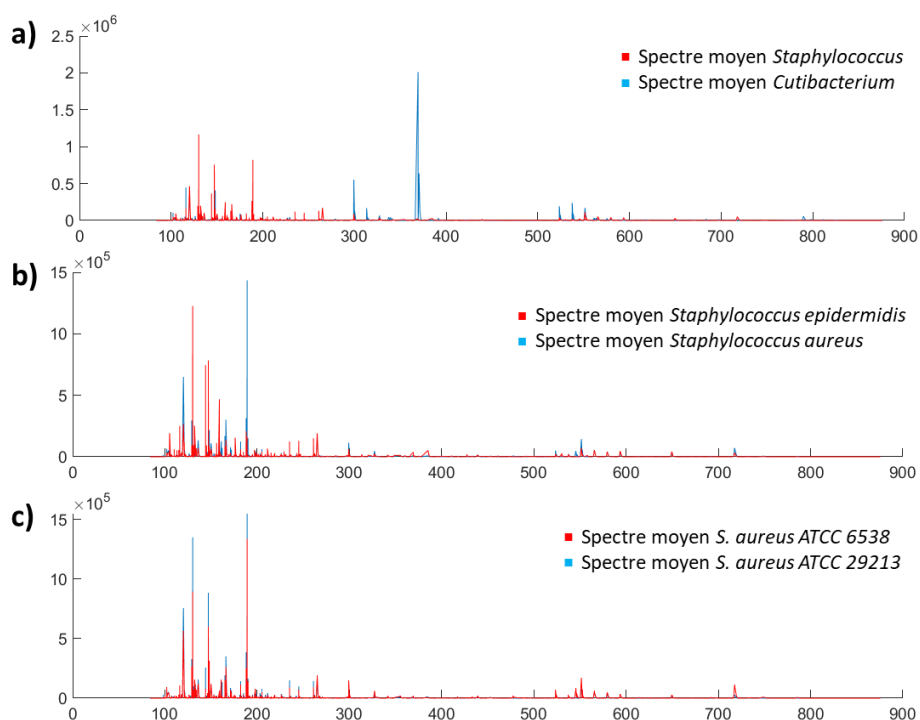


Figure 54 : Spectres moyen a) de toutes les données de bactérie du genre *Staphylococcus* (spectre rouge) comparé à celui de toutes les données de bactérie du genre *Cutibacterium* (spectre bleu) ; b) spectre moyen de toutes les données de bactérie *S. epidermidis* comparé à celui de toutes les données de bactérie *S. aureus* ; c) spectre moyen de toutes les données de la souche ATCC 6538 de *S. aureus* comparé à celui de toutes les données de la souche ATCC 29213 de *S. aureus*.

Après élimination des isotopes pour en conserver que les m/z correspondants aux pics monoisotopiques, 23 masses distinctes ont été sélectionnées. Parmi elles, 20 permettaient de différencier nettement les genres *Staphylococcus* et *Cutibacterium*, tandis que 3 autres, bien que non spécifiques à un genre, se révélaient discriminantes pour une seule souche. Deux de ces masses étaient caractéristiques de la souche *S. aureus* ATCC 6538, et la dernière était spécifique à la souche *S. epidermidis* ATCC 51625. Enfin, les deux souches de *C. acnes* présentaient un profil MS très similaire. Toutefois, une masse affichait une variation marquée en intensité entre elles, bien qu'elle ne fût pas totalement absente ou présente dans l'une d'elles. Toutes ces masses sont représentées dans la **Figure 55**.

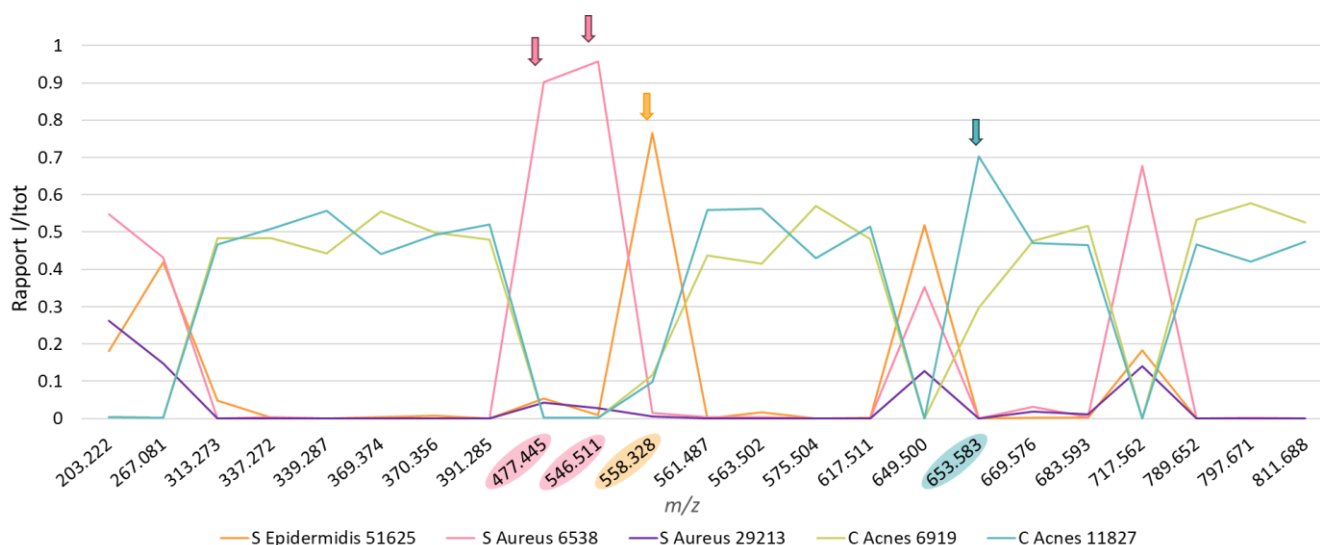


Figure 55 : Présence ou absence d'un m/z dans chacune des souches étudiées par la représentation du rapport de son intensité moyenne dans la souche sur la somme totale de ses intensités obtenues sur les toutes les souches.

Ces premiers tests ont démontré la capacité du SpiderMass à distinguer différentes espèces bactériennes, voire certaines souches spécifiques. Cette approche pourrait être approfondie en enrichissant la base de données de spectres avec de nouvelles souches bactériennes, et ce afin de couvrir une plus large diversité du microbiote cutané. Cette perspective est particulièrement prometteuse, car elle ouvre la voie au développement d'un modèle d'intelligence artificielle (IA) capable de générer un "Bactérioscore"^{367,368}. Ce score pourrait ensuite être utilisé dans des études cliniques de dermo-cosmétiques pour évaluer l'impact de produits topiques, notamment dans des pathologies comme l'acné, où la présence accrue de *C. acnes* joue un rôle clé, ou encore dans la DA, en suivant l'évolution du ratio *S. aureus*/*S. epidermidis* et de certaines souches clés.

10 Conclusion

Les avancées technologiques majeures de ces vingt dernières années ont marqué un tournant dans les pratiques médicales et la recherche clinique, auparavant limitées à l'examen et au dossier médical des patients. Ces progrès ont répondu à un besoin croissant d'outils analytiques performants pour mieux comprendre les mécanismes physiologiques et pathologiques. Parmi ces outils, la spectrométrie de masse s'est imposée comme une technique clé des approches omiques, grâce à sa sensibilité, sa versatilité et sa capacité à fournir des informations moléculaires inaccessibles par la seule analyse génétique. Elle est aujourd'hui incontournable dans les laboratoires de recherche et les industries. Récemment, le développement de méthodes plus rapides et moins invasives a permis d'améliorer encore la compréhension des processus pathologiques cutanés.

L'utilisation du SpiderMass pour l'analyse cutanée présente de nombreux avantages qui en font une technologie particulièrement prometteuse dans le domaine de la dermatologie et la dermo-cosmétique. Sa capacité à réaliser des analyses en temps réel, non invasives et sans préparation d'échantillon permet de préserver l'intégrité de la peau tout en obtenant des profils moléculaires riches et exploitables, tant pour la recherche que pour les applications cliniques. L'analyse directe sur la peau permet de s'affranchir d'un grand nombre de contaminations croisées. Lorsque l'analyse *in vivo* n'est pas possible, des prélèvements simples et non invasifs sont également envisageables, avec un bruit de fond absent ou très faible lors de l'analyse. De plus, sa sensibilité à détecter de légères variations métaboliques et lipidiques en fait un outil puissant pour identifier des biomarqueurs spécifiques, suivre l'évolution des pathologies ou encore évaluer l'efficacité de traitements topiques. La quantification des espèces s'étant également révélée également robuste dans la comparaison avec les analyses conventionnelles par LC-MS/MS, renforçant l'intérêt de la technologie pour le suivi des traitements et des pathologies. Néanmoins, l'absence de séparation chromatographique peut constituer une limite. En cas de signaux issus de molécules ayant des m/z proches, les spectres MS/MS présentent des patrons complexes et conduisent à n'identifier que le composé le plus abondant. Cette limite pourrait toutefois être partiellement levée par l'intégration d'une mobilité ionique au spectromètre de masse, ajoutant une dimension supplémentaire à l'analyse. Ainsi, le couplage de la technologie SpiderMass à un instrument comme le TimsTOF Metabo de la société Bruker présenterait un intérêt certain. Par ailleurs, l'absence de LC en amont du spectromètre de masse empêche l'utilisation de nombreux logiciels d'assignation automatique des pics MS, qui reposent sur des données LC-MS/MS. Cette limitation m'a conduit à effectuer manuellement une grande partie des assignations durant cette thèse, avant de développer un workflow désormais plus automatisé. Cependant, certains ions restent non assignés, soulignant la nécessité d'approches complémentaires. Pour surmonter ces défis, l'intégration de l'intelligence artificielle (IA) dans l'analyse des spectres de masse offre des perspectives prometteuses. Des modèles d'apprentissage, tels que MIST (Metabolite Inference with Spectrum Transformers), ont démontré leur capacité à annoter efficacement les spectres MS/MS en intégrant des connaissances chimiques spécifiques, améliorant ainsi la précision des annotations³⁶⁹. De même, l'approche TransExION, basée sur des architectures de type Transformer, permet une comparaison explicable des spectres MS/MS, facilitant l'identification de structures moléculaires similaires³⁷⁰. En complément, le réseautage moléculaire (Molecular Networking) constitue une stratégie efficace pour l'annotation des composés dans les analyses de spectrométrie de masse. En regroupant les spectres MS/MS selon leur similarité, cette méthode permet de visualiser des familles moléculaires et d'identifier des analogues structuraux, même en l'absence de correspondance directe dans les bases de données. Des plateformes telles que GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) facilitent l'application de cette approche, notamment avec des extensions comme l'Ion Identity Molecular Networking (IIMN), qui intègre les différentes espèces ioniques d'un même composé pour améliorer la connectivité du réseau³⁷¹. En intégrant ces outils d'IA et de réseautage moléculaire, il serait possible d'améliorer

significativement l'annotation des spectres obtenus par SpiderMass, en particulier pour les ions non assignés, renforçant ainsi la robustesse et la profondeur des analyses cutanées. Enfin, des approches de type Data Independent Acquisition, telles celles développées pour la protéomique, avec des plages de MS/MS plutôt qu'un travail précurseur par précurseur, permettrait également de gagner un temps d'acquisition considérable et de pouvoir réaliser les MS/MS directement *in vivo* sur les volontaires en temps-réel. Ces approches nécessitent également des approches d'IA basées sur des réseaux de neurones, avec une donnée conséquente en entrée pour l'entraînement, mais constituerait un vrai plus pour l'approche. Malgré les limitations actuelles, les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent la robustesse, la fiabilité et l'applicabilité du SpiderMass dans la caractérisation des déséquilibres cutanés, positionnant cette technologie comme un outil de choix pour une dermatologie de précision.

C'est donc en exploitant les potentialités uniques de la technologie SpiderMass, ce projet a permis de poser les bases d'une cartographie moléculaire *in-vivo* des altérations cutanées associées à quatre grandes dermatoses : la DS, la DA, le Pso et la rosacée. L'approche repose sur la mise en place d'études cliniques et le développement d'un workflow permettant l'identification de biomarqueurs lipidiques et métaboliques dans les ZL, ZPL et témoins. Bien que le SpiderMass a la spécificité de fonctionner dans les deux polarités (mode positif et mode négatif), l'ensemble des études de cette thèse a été réalisé en mode positif, en raison de la richesse des spectres obtenus. Toutefois, l'optimisation récente du mode négatif par changement de solvant ouvre la voie à des analyses complémentaires, permettant d'enrichir les données moléculaires. Les futures études sur papier à cigarettes pourraient intégrer une double analyse en changeant la polarité du spectromètre et en adaptant le solvant, tandis que les analyses *in-vivo* devront explorer des stratégies pour des transitions efficaces entre les deux modes.

Malgré l'usage exclusif du mode positif, des dizaines de signaux moléculaires ont été identifiés pour chaque pathologie, avec un haut niveau de confiance grâce à une méthodologie créée pour le SpiderMass. Ces signaux, exploitables comme marqueurs pathologiques, renseignent sur la nature de la dermatose, l'inflammation et l'état de la barrière cutanée.

Dans l'étude SMPatho, le groupe DS, bien que modérément inflammatoire, présente des altérations importantes des SPs, avec une augmentation de la sphingosine, précurseur de la sphingosine-1-phosphate, impliquée dans la réponse immunitaire cutanée, ainsi qu'un profil modifié des acylglycérols et FAHFA, témoignant d'un déséquilibre lipidique. Dans le groupe DA, une forte perturbation lipidique et métabolique est observée, incluant une diminution d'acides aminés et de dérivé d'acides aminés hygroscopiques et une modification significative des Cer. Plus de 300 signaux ont été modulés, incluant des prostaglandines peu décrites jusqu'alors, témoignant de l'intérêt du SpiderMass pour révéler des biomarqueurs inédits. Pour le Pso, plus de 200 signaux modulés ont été détectés, avec une altération marquée des SPs et des TGs. Notamment, les SPBs étaient diminuées dans toutes les ZL, tandis que certains FFAs (comme l'acide arachidonique) étaient surproduits. Cette étude met en lumière une signature moléculaire robuste et cohérente entre les comparaisons intra- et inter-groupe. Enfin, la rosacée présente une altération marquée du métabolisme lipidique, avec 40 molécules identifiées, notamment un dérivé de squalène oxydé augmentés dans les ZPL, ainsi qu'une diminution de la citrulline et de l'acide urocanique, liés à l'inflammation chronique. Ces résultats valident la capacité de SpiderMass à produire des profils moléculaires complets, reproductibles et discriminants, exploitables cliniquement pour différencier les pathologies, suivre leur évolution et évaluer la réponse au traitement.

Bien qu'un score final n'ait pas été implémenté durant cette thèse, les bases méthodologiques et analytiques nécessaires à un scoring moléculaire automatisé ont été posées. L'analyse des ratios entre spectres lésionnels et témoins, la sélection de biomarqueurs spécifiques et leur modulation en lien avec

la sévérité clinique sont autant d'éléments qui permettront la création d'un indice quantitatif de gravité. Ce score pourra, à terme, compléter les scores cliniques (SCORAD, IGA...) en apportant une mesure biologique et objective. L'analyse multidimensionnelle des données ouvre par ailleurs la voie à des modèles prédictifs et classificatoires, notamment via l'intelligence artificielle. Les bases de données constituées ici serviront à entraîner des modèles de machine learning capables d'identifier une dermatose ou de prédire la réponse à un traitement en temps réel, via un simple scan cutané.

Dans cette perspective, une piste particulièrement prometteuse réside dans l'intégration d'analyses d'enrichissement fonctionnel. Historiquement développée pour les données de génomiques et de protéomiques^{372,373}, elle se démocratise à la métabolomique ces dernières années. Ce type d'analyse permet de déterminer si certains groupes de molécules, associés à des fonctions biologiques, des voies métaboliques (pathways) ou des propriétés physicochimiques spécifiques, sont surreprésentés parmi les biomarqueurs modulés. En pratique, cela consiste à comparer la liste des molécules d'intérêt issues d'une étude (par exemple, celles régulées dans une dermatose) à des bases de données de référence comme KEGG, Reactome, LIPID MAPS ou HMDB, afin d'identifier des enrichissements statistiquement significatifs. Appliquée aux études cliniques, cette approche permettrait non seulement de valider biologiquement les biomarqueurs identifiés, mais aussi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, en reliant les signatures moléculaires à des processus biologiques précis. De plus, l'analyse d'enrichissement sur les propriétés structurales ou fonctionnelles des lipides (chaîne, insaturation, polarité, classe) pourrait révéler des tendances biochimiques globales, comme une dérégulation ciblée des sphingolipides ou des triglycérides polyinsaturés, parfois non visibles à l'échelle individuelle. En effet, si la variabilité biologique inter personnes peut conduire à ne pas observer certains métabolites particuliers parfois, très similairement à ce qui est observé pour les protéines, les voies de signalisation sont conservées et plutôt que de regarder des marqueurs, il semble alors intéressant d'utiliser une voie de signalisation comme critère de diagnostic ou pronostic. Intégrée dans le pipeline analytique du SpiderMass, cette stratégie renforcerait considérablement l'interprétabilité des données et la pertinence biologique des résultats, ouvrant ainsi la voie à une compréhension plus fine des altérations cutanées dans diverses pathologies^{374–377}.

Au-delà de la caractérisation pathologique et de la compréhension des processus biologiques des dermatoses, le suivi des modifications cutanées après application répétée de produits topiques cosmétiques a également été abordé via deux études sur peaux pathologiques et saines. L'étude KelualDS visait à valider l'utilisation de SpiderMass pour suivre l'efficacité d'un traitement cosmétique rincé chez des patients DS, tout en comparant les résultats à une analyse LC-MS conventionnelle effectuée sur les mêmes patients. Les données obtenues sont cohérentes, démontrant la fiabilité du SpiderMass dans ce suivi. L'étude RETINOSPIDER a montré que le SpiderMass permet également de suivre les modifications cutanées induites par une application quotidienne de rétinoïdes pendant un mois sur peaux saines. Bien que les effets des rétinoïdes soient connus, peu d'études se sont penchées sur leur impact lipidomique et métabolomique. Cette étude comble partiellement ce vide, en identifiant des lipides et métabolites modifiés par leur application. Ces deux travaux soulignent la pertinence de SpiderMass pour la mise en place d'un scoring moléculaire de suivi.

Ce scoring moléculaire de la peau s'inscrit dans le paradigme émergent de la médecine de précision, qui vise à personnaliser les soins selon les caractéristiques individuelles du patient. En dermatologie, cela repose sur l'analyse fine des profils moléculaires et microbiens, ainsi que sur la capacité à suivre leur évolution. Les technologies telles que le SpiderMass offrent aujourd'hui la possibilité de réaliser ces analyses en condition clinique, sans biopsie, de façon rapide, sûre, non invasive

et répétable. Il pourrait ainsi devenir un outil de routine pour les dermatologues, à l'interface entre diagnostic, évaluation et suivi thérapeutique.

Enfin, le microbiote cutané joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de la peau et dans la pathogenèse de nombreuses dermatoses. Il est donc crucial d'évaluer la capacité de SpiderMass à détecter ses variations. Des pré-analyses sur des cultures pures ont démontré la capacité de la technologie à distinguer les espèces bactériennes. Ces résultats serviront de base au développement d'un modèle de machine learning, en vue d'obtenir un "BacterioScore" associé aux lésions analysées^{367,368}. Également les pics les plus discriminants pourront être assignés par fragmentation MS/MS.

11 Annexes

11.1 Annexe 1 : Matériels et Méthodes pour l'utilisation du SpiderMass

Prélèvement de sébum du cuir chevelu ou du visage. Pour l'analyse par SpiderMass, le sébum est prélevé à l'aide d'un papier à cigarettes (JOB) frotté doucement sur le cuir chevelu ou sur le front du sujet. Le papier à cigarettes ne contient ni colle ni additifs, et présente l'avantage d'offrir un signal de fond très faible pour l'analyse ultérieure par SpiderMass. Chaque papier est divisé en deux parties en pliant le papier à cigarettes : une moitié est appliquée sur la zone à prélever, l'autre moitié est gardée sans sébum et est utilisée pour mesurer le bruit de fond (blanc). Après le prélèvement, les échantillons de sébum sur papier à cigarettes sont stockés à -80°C. Tous les échantillons sont analysés simultanément à la fin de l'étude afin de minimiser les variations instrumentales.

Prélèvement de SC par D-Squames®. Pour l'analyse SpiderMass des squames superficielles de SC par D-Squame®, le D-Squames® est appliqué côté adhésif sur la peau du sujet, puis fixé uniformément grâce à un applicateur qui exerce une pression homogène sur toute sa surface. Enfin, il est délicatement retiré de la peau grâce à une pince. Contrairement au papier à cigarettes, le D-Squame® ne génère aucun signal lors de l'analyse SpiderMass. L'acquisition du blanc repose donc exclusivement sur la mesure du blanc environnant. Après le prélèvement, les échantillons de sébum sur papier à cigarettes sont stockés à -80°C. Tous les échantillons sont analysés simultanément à la fin de l'étude afin de minimiser les variations instrumentales.

SpiderMass. Les mesures ont été réalisées à l'aide de la technologie de spectrométrie de masse par ionisation ambiante SpiderMass, qui repose sur une méthode appelée désorption/ionisation assistée par l'eau (Water-Assisted Laser Desorption/Ionization, WALDI). Ce procédé utilise une excitation résonnante de l'eau à 2,94 μm dans l'infrarouge moyen pour désorber et ioniser les molécules présentes à la surface de l'échantillon. Les ions générés sont ensuite aspirés via un tube en PTFE et directement transférés vers un spectromètre de masse Q-TOF (Impact II, Bruker), via une interface dédiée à la préparation de l'aérosol. La conception complète de l'instrument a été décrite dans des publications précédentes³⁷⁸. En résumé, un laser fibré émettant à 2,94 μm permet l'ablation ciblée de l'échantillon. L'instrument fonctionne pour les études cliniques en mode positif et balaye une plage de masse de 50 à 1650 m/z . Une méthode d'acquisition optimisée est utilisée pour couvrir un large spectre moléculaire, avec une infusion continue d'un solvant H₂O/isopropanol (50:50) à un débit de 0,5 mL/h. La puissance du laser est ajustée en fonction du type d'échantillon analysé (*in vivo* visage : 1,5 mJ ; *in vivo* autre que visage : 1,9 mJ ; papier à cigarettes : 1,9 mJ ; D-Squames : 2,25 mJ) tout comme le modèle d'acquisition de déplacement (*in vivo* : « Vivo_cercle_r2 » ; papier à cigarettes : « Pap_cigarette » ; D-Squames : « ScotchDSquame »). Selon le type d'analytes ciblés, différentes méthodes peuvent être appliquées : la méthode Metabo pour les métabolites et la méthode Cer pour les céramides, notamment lors des analyses de fragmentation, les paramètres du spectromètre de masse utilisés pour chacune des trois méthodes d'acquisition sont résumés en **Tableau 13**.

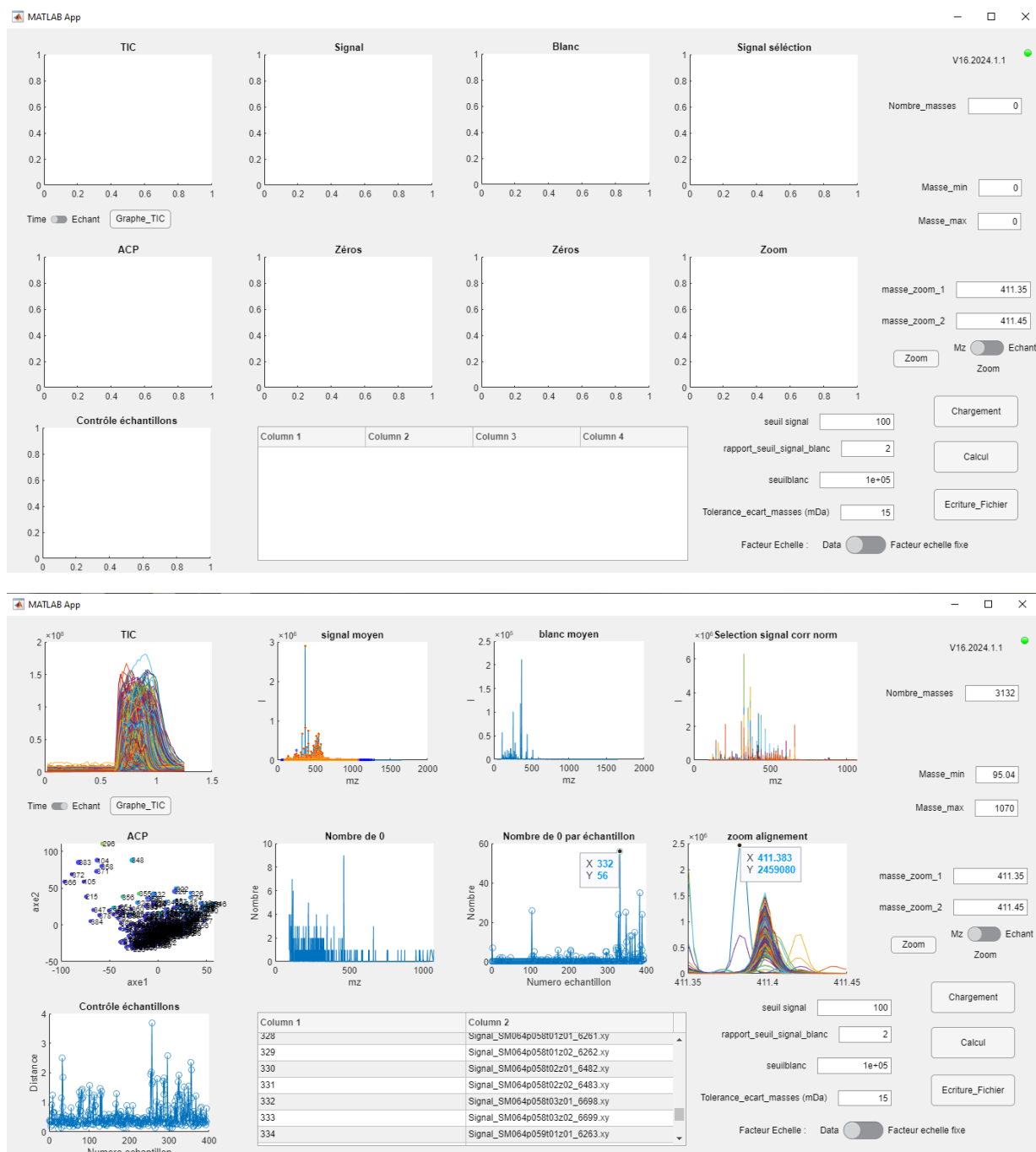
	Méthode Wide (Étude clinique)	Méthode Cer	Méthode Métabo
Capillary (V)	4000	4000	5000
Corona (nA)	5000	6000	6000
Vapozizer Temp. (°C)	350	450	450
Collision RF (Vpp)	900	900	500

Tableau 13 : Paramètres qui diffèrent entre les différentes méthodes d'acquisition masse au SpiderMass.

Traitement des données et analyse statistique. Les données brutes acquises par SpiderMass sont importées dans un programme développé sous Matlab (MathWorks Inc.) pour un prétraitement en plusieurs étapes. Celui-ci comprend : le moyennage des spectres des échantillons sur la zone irradiée, le moyennage des spectres de blancs, la soustraction du blanc, puis une normalisation des spectres par le Total Ion Current (TIC). Divers paramètres de filtrage sont appliqués pour la sélection des m/z , notamment : un seuil d'intensité fixé à 100, un rapport signal/bruit minimum de 2, un seuil TIC pour les blancs de 1×10^5 , ainsi qu'une tolérance d'écart de masse de 15 mDa. L'analyse statistique est ensuite conduite via une application R-Shiny développée spécifiquement pour les études SpiderMass. Dans un premier temps, les pics contaminants (incluant ceux liés à des produits cosmétiques) sont identifiés et exclus. Une analyse différentielle est ensuite réalisée afin d'identifier les ions dont l'intensité relative varie significativement dans le temps, entre groupes, ou entre zones anatomiques. Pour chaque ion, un modèle linéaire mixte est ajusté, intégrant les facteurs fixes d'intérêt (ex. : pathologie, temps, zone) et incluant le sujet comme effet aléatoire. La correction des tests multiples est effectuée selon la méthode de Benjamini-Hochberg, afin de contrôler le taux de faux positifs. Les ions discriminants sont ensuite annotés par comparaison à des bases de données publiques telles que LipidMaps, Alex123 et HMDB, en s'appuyant sur les données de fragmentation MS².

11.2 Annexe 2 : Prétraitement des données par MatLab

Capture d'écran de l'écran de MatLab avec toutes les fenêtres après un prétraitement.



11.3 Annexe 3 : Critères d'éligibilité de SMPatho

CRITÈRES D'INCLUSION

Critères relatifs à la population :

- Sujet ayant donné son consentement écrit à sa participation à l'étude
- Sujet présentant un phototype II à IV selon la classification de Fitzpatrick
- Sujet affilié à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime
- Pour les femmes susceptibles de procréer : utilisation d'une méthode de contraception depuis au moins 4 semaines, évaluée comme efficace par l'investigateur

Pour les sujets du sous-groupe acné de la face et leur sous-groupe contrôle associé :

- Homme ou femme, âgé de 18 à 30 ans inclus

Pour les sujets du sous-groupe dermatite atopique des membres supérieurs et leur sous-groupe contrôle associé :

- Homme ou femme, âgé de 20 à 50 ans inclus

Pour les sujets du sous-groupe psoriasis en plaque des membres et leur sous-groupe contrôle associé :

- Homme ou femme, âgé de 20 à 55 ans inclus

Pour les sujets du sous-groupe érythrocouperose télangiectasique et papule de la face et leur sous-groupe contrôle associé :

- Homme ou femme, âgé de 20 à 60 ans inclus

Pour les sujets du sous-groupe dermite séborrhéique du cuir chevelu et leur sous-groupe contrôle associé :

- Homme ou femme, âgé de 20 à 45 ans inclus

Critères relatifs aux dermatoses :

Pour les sujets du sous-groupe acné de la face :

- Sujet présentant de l'acné de la face légère à sévère, dont le score GEA (Global Acne Evaluation) évalué sur le visage est de 2 à 4 sur une échelle de cotation variant de 0 (pas de lésion) à 5 (très sévère)
- Sujet présentant sur le visage, au moins une zone :
 - Lésionnelle en bordure immédiate d'une papule
 - Péri-lésionnelle à proximité des lésions inflammatoires (papule; de l'ordre de 1cm)
- Sujet présentant sur la face interne de l'avant-bras une zone de référence sans lésion

Pour les sujets du sous-groupe dermatite atopique des membres supérieurs :

- Sujet présentant une dermatite atopique localisée sur les membres supérieurs, légère à modérée avec un SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) compris entre 15 et 40 inclus avec pour la sécheresse un score ≥ 2 sur une échelle variant de 0 (absent) à 3 (sévere)
- Sujet ayant eu au moins une poussée inflammatoire de dermatite atopique sur les membres supérieurs dans les 2 ans précédant le jour d'inclusion
- Sujet présentant sur un membre supérieur (main exclue) au moins une zone :

- Lésionnelle définie par les signes du SCORAD cible compris entre 3 et 12 suivants :
 - Érythème de 1 à 3
 - Sècheresse ≥ 2
 - Œdème / papule de 0 à 3
 - Lésions suintantes ou croûteuses de 0
 - Excoriation de 0
 - Lichénification de 0 à 3 (Sur une échelle variant de 0 (absent) à 3 (sévère))
- Péri-lésionnelle à proximité de la zone lésionnelle (de l'ordre de 1cm)
- Sujet présentant sur la face interne de l'avant-bras une zone de référence sans lésion

Pour les sujets du sous-groupe **psoriasis en plaque des membres**:

- Sujet atteint de psoriasis en plaque erythémato-squameux léger à modéré dont le score IGA (Investigator Global Assessment) est compris entre 2 et 3 sur une échelle de cotation variant de 0 (clear) à 5 (very severe)
- Sujet présentant sur un membre supérieur (main exclue) ou inférieur au moins une zone :
 - Lésionnelle :
 - Sans fissure et sans croûte
 - Avec un score d'érythème ≥ 1 selon une échelle variant de 0 (absent) à 3 (sévère)
 - Avec un score de desquamation compris entre 1 (léger) et 2 (modéré) selon une échelle variant de 0 (absent) à 3 (sévère)
 - Avec un score d'œdème égal à 0 (absent) selon une échelle variant de 0 (absent) à 3 (sévère)
 - Péri-lésionnelle :
 - Sans fissure et sans croûte
 - À proximité de la zone lésionnelle (de l'ordre de 1cm)
- Sujet présentant sur la face interne de l'avant-bras une zone de référence sans lésion

Pour les sujets du sous-groupe **érythrocouperose télangiectasique et papule de la face** :

- Sujet atteint d'érythrocouperose télangiectasique et papule de la face légère à modérée avec un score IGA compris entre 2 et 3 sur une échelle de cotation variant de 0 (absent) à 4 (sévère)
- Sujet présentant sur le visage au moins une zone :
 - Lésionnelle : bordure immédiate de papule avec un score érythème persistant ≥ 1 sur une échelle de cotation variant de 0 (absent) à 3 (sévère)
 - Péri-lésionnelle :
 - À proximité des lésions inflammatoires (papule; de l'ordre de 1cm)
 - Variant d'au moins 1 point en moins sur le score de l'érythème par rapport à la zone lésionnelle
- Sujet présentant sur la face interne de l'avant-bras une zone de référence sans lésion

Pour les sujets du sous-groupe **dermite séborrhéique du cuir chevelu** :

- Sujet atteint de dermite séborrhéique du cuir chevelu légère à modérée avec un score IGA compris entre 2 et 3 sur une échelle de cotation variant de 0 (absent) à 4 (sévère))
- Sujet présentant sur le cuir chevelu au moins une zone :
 - Lésionnelle
 - avec un score d'érythème ≥ 1 sur une échelle de 0 (absent) à 3 (sévère)
 - avec des squames cliniquement visibles
 - Péri-lésionnelle à proximité de la zone lésionnelle (de l'ordre de 1cm)
- Sujet présentant sur la face interne de l'avant-bras une zone de référence sans lésion

CRITÈRES DE NON-INCLUSION

Critères relatifs à la population :

- Pour les femmes susceptibles de procréer : grossesse ou allaitement
- Sujet dans l'incapacité linguistique ou psychique de comprendre l'information donnée et de signer le consentement éclairé
- Sujet qui, selon l'avis de l'investigateur, est dans l'impossibilité de se conformer aux exigences du protocole
- Sujet privé de liberté par décision judiciaire ou administrative, sous tutelle ou sous curatelle
- Sujet en position susceptible de représenter un conflit d'intérêt et/ou membre de la famille de toute personne impliquée dans l'essai clinique sur le site investigateur
- Sujet participant, ayant participé dans les semaines ou mois précédents ou prévoyant une participation à un autre essai clinique susceptible d'interférer avec l'étude, selon l'avis de l'investigateur

Critères relatifs aux pathologies et condition cutanée :

- Sujet présentant un vieillissement cutané prématuré lié à une maladie génétique
- Sujet présentant un érythème solaire sur au moins une zone à l'étude
- Sujet présentant un tatouage ou une cicatrice ou tout autre signe dermatologique sur au moins une zone à l'étude susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur
- Sujet présentant une maladie auto-immune
- Sujet présentant tout type de complication sur au moins une zone à l'étude (du type excoriation, infection bactérienne primaire, virale, fongique ou parasitaire, etc.) selon l'avis de l'investigateur

Critères relatifs aux sous-groupes contrôles :

- Sujet présentant une dermatose ou tout type de lésion sur la zone correspondant à la zone lésionnelle, péri-lésionnelle ou de référence du sous-groupe dermatose associé susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur

Critères relatifs aux dermatoses inflammatoires chroniques :

Pour les sujets du sous-groupe acné de la face :

- Sujet présentant une autre dermatose (chronique/aigue, inflammatoire, infectieuse, immunitaire) sur le visage susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur

Pour les sujets du sous-groupe dermatite atopique des membres supérieurs :

- Sujet présentant une autre dermatose (chronique/aigue, inflammatoire, infectieuse, immunitaire) sur le(s) membre(s) supérieur(s) à l'étude susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur

Pour les sujets du sous-groupe psoriasis en plaque des membres :

- Sujet présentant une forme isolée palmo-plantaire de psoriasis
- Sujet présentant une forme isolée de psoriasis cutanée autre qu'en plaque (en goutte, pustuleux, erythrodermique ou inversé des plis (psoriasis des muqueuses))
- Sujet présentant une autre dermatose (chronique/aigue, inflammatoire, infectieuse, immunitaire) sur le(s) membre(s) supérieur(s) et/ou inférieur(s) à l'étude susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur

Pour les sujets du sous-groupe érythrocouperose télangiectasique et papule de la face :

- Sujet présentant une autre dermatose (chronique/aigue, inflammatoire, infectieuse, immunitaire) sur le visage susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur

Pour les sujets du sous-groupe dermite séborrhéique du cuir chevelu :

- Dermite séborrhéique sous traitement médical
- Sujet présentant une autre dermatose (chronique/aigue, inflammatoire, infectieuse, immunitaire) sur le cuir chevelu susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur (notamment eczéma de contact ou alopecie)

Critères relatifs aux traitements et aux produits cosmétiques :

Pour **tous** les sujets

- Prise orale d'isotrétinoïne ou d'acitrétine (vit-A orale et dérivés) dans les 6 mois précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Traitement rétinolique par voie locale sur au moins une zone à l'étude, pouvant influencer les résultats selon l'avis de l'investigateur dans le mois précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Traitement par photothérapie sur au moins une zone à l'étude dans les 4 semaines précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Traitement topique ou oral établi ou modifié au cours des semaines précédentes ou sur le point d'être établi ou modifié au cours de l'étude, susceptible d'interférer avec les résultats de l'étude selon l'avis de l'investigateur (par exemple modifiant les caractéristiques cutanées : traitement inducteur de pigmentation), kératolytique,...)
- Traitement anti-inflammatoire (stéroïdien ou non stéroïdien) pris de façon quotidienne et répétée durant plus de 5 jours consécutifs au cours de la semaine précédant la visite d'inclusion
- Application de tout traitement topique dérivé de la vitamine D sur au moins une zone à l'étude dans les 3 semaines précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Application de traitements topiques dermocorticoïdes ou immunomodulateurs topiques (tacrolimus), antifongiques, antibiotiques locaux sur au moins une zone à l'étude dans les 3 semaines précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Application d'eau, de produit ou traitement topique sur au moins une zone à l'étude suite à la dernière toilette la veille au soir de la visite
- Application d'eau, de produit topique ou maquillage sur au moins une zone à l'étude le jour de la visite d'inclusion

Pour les sujets du sous-groupe dermite séborrhéique du cuir chevelu et son sous-groupe contrôle associé :

- Utilisation au niveau du cuir chevelu de tout produit pouvant être actif sur les états squameux, à rincer ou à poser (shampooings antipelliculaires, antifongiques, rinçage au vinaigre, huiles essentielles...) dans les 2 semaines précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Toute technique visant à modifier la couleur ou l'état des cheveux (coloration, décoloration, permanente, lissage/défrisage...) réalisée dans les 2 semaines précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite
- Lavage du cuir chevelu réalisé dans les 2 jours précédant la visite d'inclusion ou le jour de la visite

11.4 Annexe 4 : Assignations SMPathoDS

Liste des molécules significativement modulées avec une $FC_{abs} \geq 1,5$ et ayant une identification par fragmentation donc avec une niveau 1 ou un niveau 2, de l'étude SMPatho dans le groupe DS et son sous-groupe associé. [FA] : Fatty Acyls ; [GL] : Glycerolipids ; [SP] : Sphingolipids ; [ST] : Sterol Lipids ; [OC] : Organoheterocyclic compounds

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	Sébum ZL DS vs CTL		vivo ZL DS vs CTL		vivo DS ZL vs ZPL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Straight chain fatty acids [FA0101]	FA 16:0	C16H32O2	-1.55	0.043	NS		NS		
			FA 24:0	C24H48O2	NS		NS		-2.07	0.032	
			FA 26:0	C26H52O2	NS		-2.07	0.050	-2.44	0.026	
	Fatty Aldehydes [FA06]		FAL 26:1	C26H50O	NS		NS		-2.38	0.026	
	Fatty esters [FA07]	Wax monoesters [FA0701]	WE 28:0 : WE(14:0/14:0) ; WE(12:0/16:0)	C28H56O2	NS		-1.88	0.031	-1.67	0.032	
		Fatty acid estolides [FA0709]	FAHFA 48:2;O : FAHFA 18:2/30O(FA 30:0)	C48H9O4	NS		NS		-1.68	0.032	
[GL]	Monoradylglycerols [GL01]	Monoacylglycerols [GL0101]	MG 24:0	C27H54O4	NS		NS		-1.51	0.032	
	Diradylglycerols [GL02]	alkyl-acylglycerols [GL0202]	DG O-26:0 : DG(O-12:0_14:0)	C29H58O4	-1.67	0.044	NS		-1.75	0.032	
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	Sphing-4-enines (Sphingosines) [SP0101]	[S]	Sphingosine	C18H37NO2	1.53	0.037	NS		NS	
		4-Hydroxysphinganine (Phytosphingosines) [SP0103]	[P]	Phytosphingosine	C18H39NO3	NS		NS		-1.51	0.032
		Sphingoid base homologs and variants [SP0104]	[S]	SPB 24:1;O2	C24H49NO2	NS		NS		-1.53	0.039
				SPB 25:1;O2	C25H51NO2	NS		-2.05	0.041	-2.1	0.032
			[DS]	SPB 25:0;O2	C25H53NO2	NS		NS		-2.11	0.047
				SPB 26:0;O2	C26H55NO2	NS		NS		-2.46	0.032
				SPB 28:0;O2	C28H59NO2	NS		NS		-2.17	0.032
		Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NH]	Cer 38:1;O3 : Cer(17:1;O3/21:0)	C38H75NO4	NS		NS		1.63
[ST]	Sterols [ST01]	Cholesterol and derivatives [ST0101]	Cholestérol	C27H46O1	1.63	0.016	NS		NS		
[OC]	Azoles	Imidazoles	Acide trans-urocanique	C6H6N2O2	NS		NS		-2.24	0.032	

11.5 Annexe 5 : Assignations SMPathoda

Liste des molécules significativement modulées avec une $FC_{abs} \geq 2$ et ayant une identification par fragmentation donc avec une niveau 1 ou un niveau 2, de l'étude SMPathoda dans le groupe DA et son sous-groupe associé. [FA] : Fatty Acyls ; [GL] : Glycerolipids ; [SP] : Sphingolipids ; [ST] : Sterol Lipids ; [OA] : Organic acids and derivatives ; [OC] : Organoheterocyclic compounds ; [OO] : Organic oxygen compounds

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZR DA vs CTL		ZL DA vs CTL		DA ZL vs ZR		DA ZL vs ZPL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Straight chain fatty acids [FA0101]		FA 8:0	C8H16O2	NS		2.56	0.003	NS		NS	
				FA 12:0	C12H24O2	NS		2.63	< 0.001	NS		NS	
				FA 18:0	C18H36O2	NS		2.36	0.001	NS		NS	
				FA 24:0	C24H48O2	NS		-3.26	< 0.001	-1.94	< 0.001	-1.58	< 0.001
				FA 26:0	C26H52O2	NS		-4.89	< 0.001	-2.63	< 0.001	-1.84	< 0.001
		Unsaturated fatty acids [FA0103]		FA 20:4	C20H32O2	NS		3.19	< 0.001	2.03	< 0.001	1.51	0.012
				FA 26:1	C26H50O2	NS		-2.22	< 0.001	-1.31	0.010	NS	
				FA 30:1	C30H58O2	NS		-2.7	< 0.001	-1.73	< 0.001	-1.35	0.008
	Eicosanoids [FA03]	Prostaglandins [FA0301]		FA 19:2;O2 : Dinor PGF2alpha methyl ether	C19H34O4	NS		5.91	0.023	NS		NS	
				FA 21:2;O2 : PGF2alpha methyl ether	C21H38O4	NS		5.94	0.015	NS		NS	
	Fatty Aldehydes [FA06]			FAL 23:0	C23H46O	NS		-2.2	< 0.001	-2.09	< 0.001	-1.7	0.001
				FAL 24:0	C24H49O	NS		-2.4	< 0.001	-1.85	< 0.001	-1.56	0.001
				FAL 28:0	C28H54O	NS		-3.4	< 0.001	-2.19	< 0.001	-1.66	< 0.001
	Fatty esters [FA07]	Wax monoesters [FA0701]		WE 8:0 : WE(1:0/7:0)	C8H16O2	NS		4.36	0.003	NS		NS	
				WE 14:0 : WE(2:0/12:0)	C14H28O2	NS		2.09	0.024	NS		NS	
		Fatty acid estolides [FA0709]		FAHFA 48:2;O : FAHFA 18:2/30O(FA 30:0)	C48H90O4	NS		-6	< 0.001	-2.87	0.026	-2.05	0.004
				FAHFA 50:2;O : FAHFA 18:2/32O(FA32:0)	C50H94O4	NS		-3.98	< 0.001	-1.96	0.030	NS	
[GL]	Monoradylglycerols [GL01]	Monoacylglycerols [GL0101]		MG 18:1	C21H40O4	NS		2.74	0.001	NS		1.32	0.012
	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 30:0	C33H64O5	-2.03	0.026	-1.6	0.048	NS		NS	

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZR DA vs CTL		ZL DA vs CTL		DA ZL vs ZR		DA ZL vs ZPL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[GL]	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 30:1	C33H62O5	-2.17	0.025	-1.77	0.017	NS		NS	
				DG 31:0 : DG(15:0_16:0)	C34H66O5	-2	0.040	NS		1.43	0.010	NS	
				DG 32:1 : DG(16:0_16:1)	C35H66O5	-2.08	0.025	-1.54	0.038	NS		NS	
				DG 33:1 : DG(16:1_17:0)	C36H68O5	-2.07	0.038	NS		1.34	0.026	NS	
				DG 36:2 : DG(18:1_18:1)	C39H72O5	NS		2.51	0.026	1.81	0.001	1.53	< 0.001
	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 52:2 : TG(16:0_18:1_18:1)	C55H102O6	NS		2.23	0.014	NS		NS	
				TG 54:4 : TG(18:1_18:1_18:2)	C57H102O6	NS		2.97	0.029	NS		NS	
				TG 54:3 : TG(18:1_18:1_18:1)	C57H104O6	NS		3.2	0.011	NS		NS	
				TG 54:2 : TG(16:1_18:1_20:0) ; TG(18:0_18:1_18:1)	C57H106O6	NS		2.37	0.034	NS		NS	
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	4-Hydroxysphinganine (Phytosphingosines) [SP0103]	[P]	Phytosphingosine	C18H39NO3	NS		-2.06	< 0.001	-1.57	0.004	-1.34	0.008
		Sphingoid base homologs and variants [SP0104]	[S]	SPB 26:1;O2	C26H53NO2	NS		-2.9	< 0.001	-1.84	< 0.001	-1.52	0.004
				SPB 27:1;O2	C27H55NO2	NS		-2.64	< 0.001	-2.23	< 0.001	-1.65	0.001
			[H]	SPB 20:1;O3	C20H43NO3	NS		-2.54	< 0.001	-2.04	< 0.001	-1.53	0.001
				SPB 24:0;O2	C24H51NO2	NS		-2.5	< 0.001	-1.86	0.004	-1.61	0.001
			[DS]	SPB 25:0;O2	C25H53NO2	NS		-3.36	< 0.001	-2.57	< 0.001	-2.03	0.001
				SPB 26:0;O2	C26H55NO2	NS		-3.73	< 0.001	-2.79	< 0.001	-2.13	< 0.001
				SPB 27:0;O2	C27H57NO2	-1.62	0.025	-3.82	< 0.001	-2.4	< 0.001	-1.98	< 0.001
				SPB 28:0;O2	C28H59NO2	NS		-4.19	< 0.001	-2.8	< 0.001	-2.09	< 0.001
				SPB 20:0;O3	C20H43NO3	NS		-2.15	< 0.001	-1.73	< 0.001	-1.51	0.001
			[P]	SPB 22:0;O3	C22H47NO3	NS		-2.22	< 0.001	-1.74	0.004	-1.49	0.006
				SPB 25:0;O3	C25H53NO3	NS		-3.02	< 0.001	-2.42	< 0.001	-1.7	< 0.001
	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NS]	Cer 34:1;O2 : Cer(18:1;O2/16:0)	C34H67NO3	-1.68	0.067	1.7	0.015	2.55	< 0.001	1.69	0.004
				Cer 42:1;O2 : Cer(16:1;O2/26:0) ; Cer(18:1;O2/24:0)	C42H83NO3	NS		NS		2.19	< 0.001	1.64	0.001
				Cer 43:1;O2 : Cer(17:1;O2/26:0) ; Cer(18:1;O2/25:0)	C43H85NO3	NS		NS		2.02	< 0.001	1.42	0.006

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZR DA vs CTL		ZL DA vs CTL		DA ZL vs ZR		DA ZL vs ZPL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[SP]	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NS]	Cer 44:1;O2 : Cer(20:1;O2/24:0) ; Cer(18:1;O2/26:0)	C44H87NO3	NS		NS		2.09	0.001	1.62	0.008
				Cer 52:1;O2 : Cer(24:1;O2/27:0)	C52H103NO3	NS		-2.26	0.006	NS		NS	
			[NH]	Cer 44:1;O3 : Cer(18:1;O3/26:0)	C44H87NO4	NS		-2.21	0.005	NS		NS	
				Cer 45:1;O3 : Cer(18:1;O3/27:0) ; Cer(20:1;O3/25:0)	C45H89NOO4	NS		-2.26	0.003	NS		NS	
				Cer 46:1;O3 : Cer(20:1;O3/26:0) ; Cer(18:1;O3/28:0)	C46H91NO4	NS		-2.25	0.010	NS		NS	
				Cer 47:1;O3 : Cer(20:1;O3/27:0) ; Cer(21:1;O3/26:0)	C47H93NO4	NS		-2.87	0.002	NS		NS	
				Cer 48:1;O3 : Cer(20:1;O3/28:0)	C48H95NO4	NS		-3.19	0.001	-1.69	0.017	-1.43	0.040
				Cer 49:1;O3 : Cer(21:1;O3/28:0)	C49H97NO5	NS		-2.77	< 0.001	-1.58	0.007	NS	
				Cer 50:1;O3 : Cer(22:1;O3/28:0) ; Cer(20:1;O3/30:0)	C50H99NO4	NS		-3.22	< 0.001	-1.63	0.011	NS	
		N-acylsphinganines (dihydroceramides) [SP0202]	[NDS]	Cer 48:0;O2 : Cer(24:0;O2/24:0) ; Cer(23:0;O2/25:0)	C48H97NO3	NS		-2.61	0.013	-1.46	0.028	NS	
				Cer 49:0;O2 : Cer(24:0;O2/25:0)	C49H99NO3	NS		-2.05	0.032	-1.27	0.028	NS	
				Cer 50:0;O2 : Cer(24:0;O2/26:0) ; Cer(26:0;O2/24:0)	C50H101NO3	NS		-2.56	0.016	-1.63	0.007	NS	
		N-acyl-4-hydroxysphinganines (phytoceramides) [SP0203]	[NP]	Cer 40:0;O3 : Cer(16:0;O3/24:0) ; Cer(18:0;O3/22:0)	C40H81NO4	NS		-2.24	0.001	NS		NS	
				Cer 41:0;O3 : Cer(17:0;O3/24:0)	C41H83NO4	-1.81	0.081	-3.24	< 0.001	-1.57	0.005	NS	
				Cer 42:0;O3 : Cer(18:0;O3/24:0)	C42H85NO4	NS		-3.63	< 0.001	-1.56	0.014	NS	
				Cer 43:0;O3 : Cer(17:0;O3/26:0)	C43H87NO4	NS		-3.95	< 0.001	-1.68	0.005	NS	
				Cer 44:0;O3 : Cer(18:0;O3/26:0) ; Cer(20:0;O3/24:0)	C44H89NO4	NS		-3.05	0.001	-1.46	0.032	NS	
				Cer 45:0;O3 : Cer(20:0;O3/25:0) ; Cer(18:0;O3/27:0)	C45H91NO4	NS		-3.38	< 0.001	-1.69	0.002	NS	
				Cer 46:0;O3 : Cer(22:0;O3/24:0) ; Cer(20:0;O3/26:0)	C46H93NO4	NS		-3.17	0.002	-1.67	0.017	-1.44	0.014
				Cer 47:0;O3 : Cer(22:0;O3/25:0)	C47H95NO4	NS		-3.14	0.001	-1.7	0.013	-1.41	0.051
				Cer 48:0;O3 : Cer(22:0;O3/26:0)	C48H97NO4	NS		-2.86	0.002	-1.61	0.007	NS	

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZR DA vs CTL		ZL DA vs CTL		DA ZL vs ZR		DA ZL vs ZPL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[SP]	Ceramides [SP02]	N-acyl-4-hydroxysphinganine (phytoceramides) [SP0203]	[NP]	Cer 49:0;O3 : Cer(22:0;O3/27:0)	C49H99NO4	NS		-2.56	0.004	-1.55	0.006	-1.5	0.051
				Cer 50:0;O3 : Cer(22:0;O3/28:0) ; Cer(24:0;O3/26:0)	C50H101NO4	NS		-2.21	0.004	-1.56	0.005	-1.36	0.049
			[AP]	Cer 41:0;O4 : Cer(17:0;O3/24:0;(2OH))	C41H83NO5	NS		-2.28	0.002	-1.43	0.030	NS	
				Cer 43:0;O4 : Cer(18:0;O3/25:0;O) ; Cer(17:0;O3/26:0)	C43H87NO5	NS		-2.46	0.001	-1.38	0.016	NS	
				Cer 45:0;O4 : Cer(21:0;O3/24:0;O)	C45H91NO5	NS		-2.13	0.013	NS		NS	
				Cer 47:0;O4 : Cer(22:0;O3/25:0;O)	C47H95NO5	NS		-2.09	0.031	NS		NS	
[PR]	Quinones and hydroquinones [PR02]	Vitamin E [PR0202]		Alpha-Tocopherol acetate	C31H52O3	2.72		3.6	0.010	NS		NS	
[OA]	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	Alpha amino acids and derivatives	Acide pyroglutamique	C5H7NO3	NS		-3.59	< 0.001	-2.1	0.001	NS	
			L-alpha-amino acids	Citrulline	C6H13N3O3	NS		-8.09	< 0.001	-2.77	0.001	-1.98	0.004
			Glutamic acid and derivatives	Acide Glutamique	C5H9NO4	NS		-3.56	0.034	NS		NS	
			Histidine and derivatives	Histidine	C6H9N3O2	NS		-3.53	< 0.001	NS		NS	
			Dipeptides	His-pro	C11H16N4O3	NS		-5.67	< 0.001	-2.37	0.001	-1.69	0.016
[OC]	Azoles	Imidazoles		Acide trans-urocanique	C6H6N2O2	NS		-6.02	< 0.001	-3.93	< 0.001	-2.09	0.001
	Indoles and derivatives			Adrenochrome o-semiquinone	C9H10NO3	NS		-3.62	0.013	-2.37	0.013	NS	
		Indolyl carboxylic acids and derivatives		Indolelactic acid	C11H11NO3	NS		-2.43	0.001	NS		NS	
[OO]	Organooxygen compounds	Carbonyl compounds	Hydroxy-benzaldehydes	2-Hydroxybenzaldehyde	C7H6O2	NS		3.44	0.008	NS		NS	

11.6 Annexe 6 : Assignations SMPathoSso

Liste des molécules significativement modulées avec une $FC_{abs} \geq 2$ et ayant une identification par fragmentation donc avec une niveau 1 ou un niveau 2, de l'étude SMPathoSso dans le groupe Sso et son sous-groupe associé. [FA] : Fatty Acyls ; [GL] : Glycerolipids ; [SP] : Sphingolipids ; [ST] : Sterol Lipids ; [BZ] : Benzenoids ; [OA] : Organic acids and derivatives ; [OC] : Organoheterocyclic compounds ; [OO] : Organic oxygen compounds.

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZL Pso vs CTL		Pso ZL vs ZR		Pso ZL vs ZPL		Pso ZPL vs ZR		ZR Pso vs CTL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Straight chain fatty acids [FA0101]		FA 26:0	C26H52O2	-3.18	< 0.001	-3.83	< 0.001	-2.58	< 0.001	-1.48	0.019	NS	
		Unsaturated fatty acids [FA0103]		FA 20:4 (Acide Arachidonique)	C20H32O2	1.58	0.046	1.96	< 0.001	2.12	< 0.001	NS		NS	
	Fatty esters [FA07]	Wax monoesters [FA0701]		SFE 10:0 : WE(4:0/6:0)	C10H20O2	-3.29	0.004	NS		NS		NS		NS	
				WE 30:0 : WE(14:0/16:0)	C30H60O2	-2.24	< 0.001	-2.33	< 0.001	-1.93	< 0.001	NS		NS	
				Fatty acid estolides [FA0709]	FAHFA 48:2;O : FAHFA 18:2/30O(FA 30:0)	C48H90O4	NS		-3.81	< 0.001	-2.18	< 0.001	-1.75	< 0.001	1.96
[GL]	Monoradylglycerols [GL01]	Monoacylglycerols [GL0101]		MG 24:0	C27H54O4	-1.97	< 0.001	-2.39	< 0.001	-2.13	< 0.001	NS		NS	
	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 36:1 : DG(18:0_18:1)	C39H74O5	2.38	0.028	1.81	0.001	NS		NS		NS	
				DG 36:2 : DG(18:1_18:1)	C39H72O5	2.4	0.019	1.89	< 0.001	NS		1.55	0.017	NS	
				DG 36:3 : DG(18:2_18:1)	C39H70O5	2.86	0.002	2.07	< 0.001	1.47	0.011	1.41	0.049	NS	
				DG 36:4 : DG(18:2_18:2)	C39H68O5	2.2	0.032	1.53	0.006	NS		NS		NS	
	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 54:4 : TG(18:1_18:1_18:2)	C57H100O6	3.83	0.004	2.37	< 0.001	1.51	0.027	1.57	0.041	NS	
				TG 54:5 : TG(18:1_18:1_18:3) ; TG(18:0_18:2_18:3)	C57H100O6	3.5	0.004	2.01	< 0.001	NS	0.027	1.52	0.041	NS	
				TG 54:6 : TG(14:1_18:1_22:4) ; TG(14:0_18:2_22:4)	C57H98O6	3.43	0.026	1.8	0.010	NS		NS		NS	
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	4-Hydroxysphinganine (Phytosphingosines) [SP0103]	[P]	Phytosphingosine	C18H39NO3	NS		-2.03	< 0.001	-1.41	0.001	-1.44	0.005	NS	
		Sphingoid base homologs and variants [SP0104]	[S]	SPB 24:1;O2	C24H49NO2	-2.21	< 0.001	-2.61	< 0.001	-2.01	< 0.001	-1.3	0.017	NS	
				SPB 25:1;O2	C25H51NO2	-3.17	< 0.001	-5.53	< 0.001	-3.41	< 0.001	-1.62	0.002	NS	
				SPB 27:1;O2	C27H55NO2	-3.47	< 0.001	-4.12	< 0.001	-3	< 0.001	-1.37	0.023	NS	

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZL Pso vs CTL		Pso ZL vs ZR		Pso ZL vs ZPL		Pso ZPL vs ZR		ZR Pso vs CTL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	Sphingoid base homologs and variants [SP0104]	[H]	SPB 20:1;O3	C21H41NO3	-2.03	< 0.001	-2.4	< 0.001	-2.11	< 0.001	NS		NS	
			[DS]	SPB 22:0;O2	C22H47NO2	-2.28	0.001	-2.26	< 0.001	-2.01	< 0.001	NS		NS	
				SPB 24:0;O2	C24H51NO2	-2.48	< 0.001	-3.6	< 0.001	-2.97	< 0.001	NS		NS	
				SPB 25:0;O2	C25H53NO2	-5.34	< 0.001	-6.91	< 0.001	-6.18	< 0.001	NS		NS	
				SPB 26:0;O2	C26H55NO2	-6.35	< 0.001	-9.88	< 0.001	-7.1	< 0.001	-1.39	0.043	NS	
				SPB 27:0;O2	C27H57NO2	-3.35	< 0.001	-4.63	< 0.001	-3.55	< 0.001	-1.3	0.017	NS	
				SPB 28:0;O2	C28H59NO2	-5.43	< 0.001	-8.86	< 0.001	-5.87	< 0.001	-1.51	0.005	NS	
			[P]	SPB 20:0;O3	C20H43NO3	NS		-2.05	< 0.001	-1.63	0.001	NS		NS	
				SPB 22:0;O3	C22H47NO3	-2.53	< 0.001	-2.32	< 0.001	-2.25	< 0.001	NS		NS	
	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NS]	Cer 34:1;O2 : Cer(18:1;O2/16:0)	C34H67NO3	2.94	< 0.001	2.42	< 0.001	2.5	< 0.001	NS		NS	
				Cer 38:1;O2 : Cer(18:1;O2/20:0), Cer(16:1;O2/22:0)	C38H75NO3	2.05	< 0.001	1.41	< 0.001	1.48	< 0.001	NS		1.62	0.020
				Cer 41:1;O2 : Cer(17:1;O2/24:0) ; Cer(18:1;O2/23:0)	C41H81NO3	2.37	< 0.001	1.93	< 0.001	1.77	< 0.001	NS		NS	
				Cer 42:1;O2 : Cer(16:1;O2/26:0) ; Cer(18:1;O2/24:0)	C42H83NO3	7.13	< 0.001	4.09	< 0.001	3.86	< 0.001	NS		NS	
				Cer 43:1;O2 : Cer(18:1;O2/25:0) ; Cer(17:1;O2/26:0)	C43H85NO3	4.54	< 0.001	2.92	< 0.001	3.12	< 0.001	NS		1.87	0.037
				Cer 44:1;O2 : Cer(18:1;O2/26:0)	C44H87NO3	7.25	< 0.001	3.12	< 0.001	3.92	< 0.001	NS		1.85	0.043
			[AS]	Cer 40:1;O3 : Cer(18:1;O2/22:0;O) ; Cer(17:1;O2/23:0;O)	C40H79NO4	2.45	< 0.001	1.74	< 0.001	1.66	< 0.001	NS		1.89	0.029
				Cer 41:1;O3 : Cer(18:1;O2/23:0;O) ; Cer(17:1;O2/24:O)	C41H81NO4	2.74	< 0.001	1.84	< 0.001	1.84	< 0.001	NS		1.66	0.049
				Cer 42:1;O3 : Cer (18:1;O2/24:0;O)	C42H83NO4	4.01	< 0.001	2.06	< 0.001	2.41	< 0.001	NS		NS	

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZL Pso vs CTL		Pso ZL vs ZR		Pso ZL vs ZPL		Pso ZPL vs ZR		ZR Pso vs CTL	
						FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[SP]	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[AS]	Cer 44:1;O3 : Cer(18:1;O2/26:0;O) ; Cer(20:1;O2/24:0;O)	C44H87NO4	2.49	0.001	NS		1.38	0.027	NS		1.89	0.045
			[NH]	Cer 43:1;O3 : Cer(18:1;O3/25:0) ; Cer(17:1;O3/26:0)	C43H85NO4	2.79	< 0.001	1.37	0.010	1.81	< 0.001	NS		NS	
				Cer 44:1;O3 : Cer(18:1;O3/26:0)	C44H87NO4	2.68	< 0.001	NS		1.58	0.001	-1.43	0.022	NS	
				Cer 46:1;O3 : Cer(20:1;O3/26:0) ; Cer(18:1;O3/28:0)	C46H91NO4	NS		-1.65	< 0.001	NS		-1.54	0.005	2.02	0.045
				Cer 48:1;O3 : Cer(20:1;O3/28:0)	C48H95NO4	NS		-2.97	< 0.001	-2.02	< 0.001	NS		NS	
			[AH]	Cer 41:1;O4 : Cer(17:1;O3/24:0;O)	C41H81NO5	2.62	< 0.001	1.56	< 0.001	1.67	< 0.001	NS		NS	
				Cer 42:1;O4 : Cer(18:1;O3/24:0) ; Cer(16:1;O3/26:0;O)	C42H83NO5	2.39	< 0.001	NS		1.39	0.009	NS		1.97	0.034
				Cer 43:1;O4 : Cer(18:1;O3/25:0;O)	C43H85NO5	2.01	0.002	NS		NS		NS		1.88	0.049
				Cer 44:1;O4 : Cer(18:1;O3/26:0;O) ; Cer(20:1;O3/24:0;O)	C44H87NO5	2.17	0.001	NS		NS		NS		2.05	0.037
				Cer 46:1;O4 : Cer(20:1;O3/26:0;O)	C46H91NO5	NS		-2.32	< 0.001	-1.59	0.001	-1.46	0.015	NS	
		N-acylsphinganines (dihydroceramides) [SP0202]	[NDS]	Cer 42:0;O2 : Cer(18:0;O2/24:0)	C42H85NO3	2.99	< 0.001	2.05	< 0.001	2.26	< 0.001	NS		NS	
				Cer 44:0;O2 : Cer(20:0;O2/24:0)	C44H89NO3	2.27	0.001	1.62	0.005	1.88	< 0.001	NS		NS	
		N-acyl-4-hydroxysphinganines (phytoceramides) [SP0203]	[NP]	Cer 45:0;O3 : Cer(20:0;O3/25:0) ; Cer(18:0;O3/27:0)	C45H91NO4	NS		-2.19	< 0.001	-1.36	0.034	-1.62	0.005	NS	
				Cer 46:0;O3 : Cer(22:0;O3/24:0) ; Cer(20:0;O3/26:0)	C46H93NO4	NS		-2.65	< 0.001	-1.81	0.002	NS		NS	

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	ZL Pso vs CTL		Pso ZL vs ZR		Pso ZL vs ZPL		Pso ZPL vs ZR		ZR Pso vs CTL	
						F _m	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
[SP]	Ceramides [SP02]	N-acyl-4-hydroxysphinganine (phytoceramides) [SP0203]	[NP]	Cer 47:0;O3 : Cer(22:0;O3/25:0)	C47H95NO4	NS		-3.48	< 0.001	-2.29	< 0.001	-1.52	0.015	NS	
				Cer 48:0;O3 : Cer(22:0;O3/26:0)	C48H97NO4	NS		-4.09	< 0.001	-2.52	< 0.001	-1.62	0.015	NS	
			[AP]	Cer 44:0;O4 : Cer(18:0;O3/26:0;O) ; Cer(20:0;O3/24:0;O)	C44H89NO5	NS		-2.16	< 0.001	-1.48	0.003	-1.46	0.014	NS	
				Cer 45:0;O4 : Cer(21:0;O3/24:0;(2OH))	C45H91NO5	NS		-2.35	< 0.001	-1.81	< 0.001	NS		NS	
				Cer 46:0;O4 : Cer(22:0;O3/24:0;O) ; Cer(20:0;O3/26:0;O)	C46H93NO5	NS		-2.75	< 0.001	-2.23	< 0.001	NS		NS	
[ST]	Sterols [ST01]	Cholesterol and derivatives [ST0101]		Cholestérol	C27H46O	2.01	< 0.001	1.75	< 0.001	1.9	< 0.001	NS		NS	
[BZ]	Benzene and substituted derivatives	Benzoic acids and derivatives	Benzoic acids	Acide benzoïque	C7H6O2	-2.76	0.024	NS		-1.52	0.015	NS		NS	
[OA]	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	Alpha amino acids and derivatives	Acide pyroglutamique	C5H7NO3	NS		-2.62	< 0.001	-1.59	0.017	-1.65	0.028	NS	
			Glutamic acid and derivatives	Acide Glutamique	C5H9NO4	2.97	< 0.001	NS		2.57	< 0.001	-1.83	0.017	NS	
			L-alpha-amino acids	Citrulline	C6H13N3O3	-2.3	0.003	-4.24	< 0.001	-2.72	< 0.001	NS		NS	
				Lysine	C6H14N2O2	2.02	< 0.001	1.66	< 0.001	1.6	< 0.001	NS		NS	
[OC]	Azoles	Imidazoles		Acide trans-urocanique	C6H6N2O2	-4.06	< 0.001	-6.43	< 0.001	-3.8	< 0.001	-1.69	0.035	NS	
[OO]	Organooxygen compounds	Carbonyl compounds	P-benzoquinones	Acide Benzoquinoneacetique	C8H6O4	NS		NS		-2.07	0.022	NS		NS	

11.7 Annexe 7 : Assignations SMPathoRosacée

Liste des molécules significativement modulées avec une $FC_{abs} \geq 1,5$ et ayant une identification par fragmentation donc avec une niveau 1 ou un niveau 2, dans l'étude SMPatho dans le groupe Rosacée et son sous-groupe associé. [FA] : Fatty Acyls ; [GL] : Glycerolipids ; [SP] : Sphingolipids ; [PR] : Prenol Lipids ; [OA] : Organic acids and derivatives ; [OC] : Organoheterocyclic compounds.

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	Ery ZPL vs Ctl ZL		ZL Ery vs Ctl	
						FC	p-value	FC	p-value
[FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Unsaturated fatty acids [FA0103]		FA 20:4 (Acide Arachidonique)	C20H32O2	NS		1.71	0.038
	Fatty esters [FA07]	Wax monoesters [FA0701]		WE 35:2 : WE(15:1/20:1) ; WE(16:1/19:1) ; WE(17:1/18:1)	C35H66O2	1.58	0.024	1.53	0.027
				WE 37:2 : WE(16:1/21:1) ; WE(17:1/20:1) ; WE(15:1/22:1)	C37H70O2	1.6	0.024	1.58	0.023
				WE 39:2 : WE(23:1/16:1)	C39H74O2	NS		1.5	0.044
		Fatty acid estolides [FA0709]		FAHFA 50:2;O : FAHFA 16:1/34O(FA 34:1)	C50H94O4	NS		-1.62	0.048
[GL]	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 27:0 : DG(11:0_16:0)	C30H58O5	1.7	0.035	NS	
				DG 29:0 : DG(14:0_15:0)	C32H62O5	1.79	0.035	1.58	0.049
				DG 29:1 : DG(13:0_16:1)	C32H60O5	1.61	0.035	NS	
				DG 30:1 : DG(14:0_16:1) ; DG(12:0_18:1)	C33H62O5	1.5	0.045	NS	
				DG 31:0 : DG(15:0_16:0)	C34H66O5	1.77	0.035	1.57	0.049
				DG 31:1 : DG(15:0_16:1)	C34H64O5	1.65	0.035	NS	
				DG 31:2 : DG(15:1_16:1)	C34H62O5	1.52	0.040	NS	
				DG 33:0 : DG(16:0_17:0)	C36H70O5	1.66	0.039	NS	
				DG 33:1 : DG(16:1_17:0)	C36H68O5	1.61	0.037	NS	
				DG 35:0 : DG(16:0_19:0)	C38H74O5	1.53	0.047	NS	
				DG 35:1 : DG(16:1_19:0) ; DG(17:0_18:1)	C38H72O5	1.58	0.045	NS	
				DG 35:2 : DG(16:1_19:1) ; DG(17:1_18:1)	C38H70O5	1.53	0.050	NS	
	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 45:1 : TG(14:0_15:0_16:1)	C48H90O6	2.14	0.038	NS	
				TG 47:1 : TG(15:0_16:0_16:1)	C50H94O6	2.12	0.039	NS	
				TG 47:2 : TG(15:0_16:1_16:1)	C50H92O6	1.96	0.035	NS	
				TG 49:1 : TG(16:0_16:0_17:1) ; TG(16:0_16:1_17:0)	C52H98O6	2.02	0.047	NS	

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Famille	Assignation	Formule brute	Ery ZPL vs Ctl ZL		ZL Ery vs Ctl	
						FC	p-value	FC	p-value
[GL]	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 49:2 : TG(15:0_16:1_18:1) ; TG(15:0_17:1_17:1)	C52H96O6	2.02	0.038	NS	
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	4-Hydroxysphinganine (Phytosphingosine) [SP0103]	[P]	Phytosphingosine	C18H39NO3	NS		-1.74	0.037
		Sphingoid base homologs and variants [SP0104]	[S]	SPB 20:1;O2	C20H41NO2	NS		-1.64	0.032
			[DS]	SPB 22:0;O2	C22H47NO2	NS		-1.59	0.029
				SPB 23:0;O2	C23H49NO2	NS		-1.63	0.036
				SPB 24:0;O2	C24H51NO2	NS		-1.83	0.036
				SPB 25:0;O2	C25H53NO2	NS		-1.83	0.032
				SPB 26:0;O2	C26H55NO2	NS		-1.95	0.034
				SPB 27:0;O2	C27H57NO2	NS		-1.92	0.029
				SPB 28:0;O2	C28H59NO2	NS		-1.99	0.029
			[P]	SPB 20:0;O3	C20H43NO3	-1.62	0.037	-1.88	0.025
				SPB 22:0;O3	C22H47NO3	-1.68	0.047	-1.98	0.027
	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NS]	Cer 34:1;O2 : Cer(18:1;O2/16:0)	C34H67NO3	1.54	0.024	1.57	0.023
				Cer 36:1;O2 : Cer(18:1;O2/18:0)	C36H71NO3	1.56	0.024	1.56	0.025
[PR]	Isoprenoids [PR01]	C30 isoprenoids (triterpenes) [PR0106]	Acyclic triterpenoids [PR010601]	Squalène	C30H50	1.63	0.035	1.58	0.029
	Polyprenols [PR03]	Dolichols [PR0307]		Nor-Dolichol	C24H42O	1.51	0.039	1.46	0.042
[OA]	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	L-alpha-amino acids	Citrulline	C6H13N3O3	-1.96	0.024	-2.34	0.025
[OC]	Azoles	Imidazoles		Urocanic acid	C6H6N2O2	NS		-2.13	0.040

11.8 Annexe 8 : Critères d'éligibilité de KelualDS

CRITERES D'INCLUSION

Critères liés à la population :

- Homme ou femme âgé(e) de 18 à 60 ans inclus
- Sujet avec un phototype I, II, III, IV ou V selon l'échelle de Fitzpatrick
- Sujet ayant signé son consentement éclairé écrit
- Sujet affilié à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'une assurance maladie
- Pour les femmes en âge de procréer :
 - Utilisation d'une méthode de contraception efficace, évaluée par l'investigateur, le jour de la visite d'inclusion
 - Engagement à continuer à l'utiliser pendant toute la durée de l'étude
- Engagement du sujet à éviter toute teinture, décoloration, permanente, henné, lissage ou défrisage sur le cuir chevelu, ou à ne le faire qu'après la fin de la phase 1 ou au milieu de la phase 2 (à S2 ou S6, dans les 3 jours maximum après la visite)
- Engagement du sujet à éviter toute exposition solaire du cuir chevelu sans protection (chapeau, casquette, bandana, casque, etc.) pendant toute la durée de l'étude

Critères liés à l'état du cuir chevelu :

- Sujet présentant un état squameux du cuir chevelu :
 - Cliniquement visible (score de Squire ≥ 20)
 - Avec une intensité des squames ≥ 2 sur une échelle de 0 à 3 sur au moins 1 des 4 zones du cuir chevelu
 - Récurrent (au moins deux fois par an)
 - Associé à un érythème et un prurit :
 - Érythème noté ≥ 1 sur une échelle de 0 à 3 sur au moins une des zones squameuses parmi les 4 zones du cuir chevelu
 - Prurit auto-évalué par le sujet ≥ 3 sur une échelle numérique de 0 à 10 (moyenne du prurit ressenti durant les 3 derniers jours)

Critères liés aux traitements et/ou produits :

- Sujet ayant une fréquence habituelle de shampooing maximale de 3 fois par semaine
- Sujet ayant effectué son dernier shampooing 3 jours avant la visite

CRITERES DE NON-INCLUSION

Critères liés à la population :

- Pour les femmes en âge de procréer : enceinte, allaitante ou prévoyant une grossesse pendant l'étude
- Sujet ayant perdu sa liberté par décision administrative ou judiciaire, ou sous tutelle
- Sujet ne comprenant pas les informations fournies (pour des raisons linguistiques ou psychiatriques), incapable de donner son consentement écrit ou de remplir son carnet de suivi
- Sujet qui, de l'avis de l'investigateur, ne serait probablement pas conforme aux contraintes et exigences de l'étude

- Sujet participant actuellement, envisageant de participer, ou ayant récemment participé à une autre étude clinique susceptible d'interférer avec les évaluations de l'étude, selon l'investigateur
- Sujet en situation de conflit d'intérêt potentiel et/ou ayant un lien familial avec une personne impliquée dans le déroulement de l'étude (infirmier, technicien, investigateur...), ou du centre d'investigation

Critères liés aux maladies / état cutané :

- Sujet ayant les cheveux crépus
- Sujet ayant des antécédents d'allergie ou d'intolérance à un des ingrédients des produits de l'étude ou à des produits d'hygiène ou de soins capillaires (ex : ciclopiroxolamine, piroctone olamine, lactamide MEA, acide bêta-glycyrrhétinique)
- Sujet ayant des antécédents d'allergie ou d'intolérance à un des matériaux utilisés pour la recherche (tampon PBS Triton X100 pour les prélèvements par écouvillon)
- Sujet présentant toute autre pathologie dermatologique que l'état squameux étudié au niveau des cheveux/cuir chevelu et susceptible d'interférer avec les évaluations de l'étude, telles que :
 - Alopecie ayant provoqué une perte de cheveux sur la partie supérieure du cuir chevelu (stade Norwood-Hamilton > III, Ludwig ≥ I-4, alopecie areata, alopecie totale)
 - Dermite séborrhéique nécessitant un traitement médical
 - Lésion cutanée surélevée, susceptible de subir un traumatisme, etc.
- Sujet présentant une pathologie dermatologique évolutive ou une lésion cutanée sur le cuir chevelu (dermite de contact, psoriasis, excoriations sévères, coup de soleil important, surinfection bactérienne visible du cuir chevelu...)
- Sujet présentant toute autre affection dermatologique, maladie aiguë ou chronique, ou antécédents médicaux susceptibles d'interférer avec les évaluations de l'étude, ou considérés par l'investigateur comme représentant un danger pour le sujet ou incompatibles avec les exigences de l'étude

Critères liés aux traitements et/ou produits :

- Traitement systémique par anti-inflammatoires non stéroïdiens, corticoïdes, antibiotiques ou antihistaminiques pris pendant 5 jours consécutifs dans les 2 semaines précédant l'inclusion ou prévu pendant l'étude, et susceptible d'interférer avec les évaluations
- Tout autre traitement systémique (cardiovasculaire, endocrinien, antidépresseur, antipsychotique, antifongique) initié ou modifié dans les 4 semaines avant l'inclusion, ou prévu/modifié pendant l'étude, susceptible d'interférer avec les évaluations selon l'investigateur
- Traitement ou produit topique appliqué sur le cuir chevelu dans les 2 semaines précédant l'inclusion ou prévu pendant l'étude pouvant avoir une action sur les états squameux ou limiter l'efficacité du produit étudié : anti-inflammatoires, kétoconazole, shampoing antipelliculaire, antifongiques, rinçage au vinaigre, huiles essentielles...
- Toute teinture (y compris au henné), décoloration, permanente, lissage/défrisage du cuir chevelu réalisée dans les 2 semaines précédant l'inclusion
- Tout produit capillaire topique (après-shampoing, sérum, masque, gel, laque, cire, mousse...) ou application d'eau sur le cuir chevelu entre le dernier shampoing et la visite d'inclusion.

11.9 Annexe 9 : Assignations KelualDS

Liste des molécules significativement modulées avec une $FC_{abs} \geq 1,5$ et ayant une identification par fragmentation donc avec une niveau 1 ou un niveau 2, de l'étude KelualDS® entre avant le traitement (S0) et après 2 semaine de traitement avec le shampoing traitant (S2). [FA] : Fatty Acyls ; [GL] : Glycerolipids ; [SP] : Sphingolipids ; [PR] : Prenol Lipids ; [OA] : Organic acids and derivatives ; [OC] : Organoheterocyclic compounds.

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignation	Formule brute	KDS S2 vs S0	
						FC	p-value
[FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Straight chain fatty acids [FA0101]	Long Chain Fatty Acid	FA 14:0	C14H28O2	1.62	< 0.001
				FA 15:0	C15H30O2	1.59	< 0.001
				FA 16:0 (Acide Palmitique)	C16H32O2	2.12	< 0.001
				FA 17:0	C17H34O2	1.69	< 0.001
		Unsaturated fatty acids [FA0103]	Medium Chain Fatty Acid	FA 6:1	C6H11O2	-1.68	0.001
				FA 7:1	C7H12O2	-1.63	< 0.001
				FA 8:1	C8H14O2	-1.81	< 0.001
				FA 9:1	C9H16O2	-1.85	< 0.001
				FA 10:1	C10H18O2	-1.74	0.001
				FA 11:1	C11H20O2	-1.61	< 0.001
			Long Chain Fatty Acid	FA 11:2	C11H21O2	-1.62	< 0.001
				FA 12:1	C12H22O2	-1.74	< 0.001
				FA 12:2	C12H20O2	-1.68	< 0.001
				FA 18:1	C18H34O2	-1.63	< 0.001
				FA 18:2	C18H32O2	-1.57	< 0.001
				FA 19:1	C19H36O2	-1.96	< 0.001
				FA 19:2	C19H34O2	-1.65	< 0.001
				FA 20:1	C20H38O2	-1.83	< 0.001
				FA 20:3	C20H34O2	-1.75	< 0.001
				FA 20:4 (Acide Arachidonique)	C20H32O2	-1.52	< 0.001
			Very Long Chain Fatty Acid	FA 22:1	C22H42O2	-1.54	< 0.001
	Octadecanoids [FA02]	Other Octadecanoids [FA0200]	Oxylipines	FA 18:2;O : 13-HODE + 9-HODE	C18H32O3	-1.58	< 0.001
				FA 18:3;O : 13-HOTE	C18H30O3	-1.87	< 0.001

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignation	Formule brute	KDS S2 vs S0	
						FC	p-value
[FA]	Fatty esters [FA07]	Wax monoesters [FA0701]		WE 37:0 : WE(16:0/21:0)	C37H74O2	-1.53	< 0.001
[GL]	Monoradylglycerols [GL01]	Monoacylglycerols [GL0101]		MG 12:0	C15H30O4	3.49	< 0.001
				MG 13:0	C14H32O4	2.61	< 0.001
				MG 14:0	C17H34O4	4.51	< 0.001
				MG 14:1	C17H32O4	2.65	< 0.001
				MG 15:0	C18H36O4	3.72	< 0.001
				MG 16:0	C19H38O4	4.59	< 0.001
				MG 16:1	C19H36O4	3.43	< 0.001
				MG 17:0	C20H40O4	3.99	< 0.001
				MG 17:1	C20H38O4	2.64	< 0.001
				MG 18:0	C21H44O4	3.95	< 0.001
				MG 18:1	C21H42O4	4.25	< 0.001
				MG 18:2	C21H38O4	4.25	< 0.001
				MG 20:2	C23H42O4	3.6	< 0.001
				MG 24:0	C27H54O4	2.12	< 0.001
	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 22:0	C25H48O4	2.58	0.002
				DG 24:0 : DG(12:0_12:0)	C27H52O5	3.8	0.001
				DG 26:0 : DG(12:0_14:0)	C29H56O5	7.58	< 0.001
				DG 26:1 : DG(16:1_10:0)	C29H54O5	2.84	< 0.001
				DG 27:0 : DG(11:0_16:0) ; DG(13:0_14:0) ; DG(12:0_15:0)	C30H58O5	3.91	< 0.001
				DG 28:0	C31H60O5	7.26	< 0.001
				DG 28:1 : DG(12:0_16:1)	C31H58O5	3.72	< 0.001
				DG 29:0 : DG(14:0_15:0)	C32H62O5	5.42	< 0.001
				DG 29:1 : DG(13:0_16:1)	C32H60O5	3.36	< 0.001
				DG 30:0	C33H64O5	7.66	< 0.001
				DG 30:1	C33H62O5	5.24	< 0.001
				DG 30:2 : DG(15:1_15:1) ; DG(14:1_16:1)	C33H60O5	3.32	< 0.001
				DG 31:0 : DG(15:0_16:0)	C34H66O5	5.5	< 0.001

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignment	Formule brute	KDS S2 vs S0	
						FC	p-value
[GL]	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 31:1 : DG(15:0_16:1)	C34H64O5	4.76	< 0.001
				DG 31:2 : DG(15:1_16:1)	C34H62O5	2.78	< 0.001
				DG 32:0	C35H68O5	6.57	< 0.001
				DG 32:1 : DG(16:0_16:1) ; DG(14:0_18:1)	C35H66O5	6.23	< 0.001
				DG 32:2 : DG(16:1_16:1)	C35H64O5	3.91	< 0.001
				DG 33:0 : DG(16:0_17:0)	C36H70O5	4.34	< 0.001
				DG 33:1 : DG(16:1_17:0)	C36H68O5	5.01	< 0.001
				DG 33:2 : DG(16:1_17:1)	C36H66O5	3.17	< 0.001
				DG 34:0	C37H72O5	3.84	< 0.001
				DG 34:1	C37H70O5	7.6	< 0.001
				DG 34:2	C37H68O5	4.2	< 0.001
				DG 34:3	C37H66O5	2.78	< 0.001
				DG 35:0 : DG(16:0_19:0) ; DG(15:0_20:0)	C38H70O5	2.93	< 0.001
				DG 35:1 : DG(16:1_19:0)	C38H72O5	4	< 0.001
				DG 35:2 : DG(16:1_19:1) ; DG(17:1_18:1)	C38H70O5	3.09	< 0.001
				DG 35:3 : DG(16:1_19:2) ; DG(17:1_18:2) ; DG(15:0_20:3)	C37H72O5	2.15	< 0.001
				DG 36:0	C39H76O5	2.51	< 0.001
				DG 36:1	C39H74O5	5.3	< 0.001
				DG 36:2	C39H72O5	5.89	< 0.001
				DG 36:3	C39H70O5	4.08	< 0.001
				DG 37:0	C40H78O5	2.39	< 0.001
				DG 37:1	C40H76O5	2.26	< 0.001
				DG 37:2	C40H74O5	2.23	< 0.001
				DG 38:0 : DG(14:0_24:0)	C41H80O5	2.66	< 0.001
				DG 38:1	C41H78O5	2.46	< 0.001
				DG 38:2 : DG(18:1_20:1)	C41H76O5	2.24	< 0.001
				DG 39:0 : DG(17:0_22:0)	C42H82O5	2.79	< 0.001
				DG 39:1 : DG(15:1_24:0) ; DG(18:1_21:0)	C42H80O5	2.29	< 0.001

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignation	Formule brute	KDS S2 vs S0	
						FC	p-value
[GL]	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]		DG 40:0	C43H84O5	2.91	< 0.001
				DG 40:1	C43H82O5	2.84	< 0.001
				DG 41:0	C44H86O5	2.54	< 0.001
				DG 42:0 : DG(17:0_25:0) ; DG(16:0_26:0) ; DG(118:0_24:0)	C45H88O5	2.24	< 0.001
				DG 42:1	C45H86O5	2.43	< 0.001
				DG 43:0	C46H89O5	1.57	< 0.001
				DG 43:1	C46H87O5	1.61	< 0.001
			1-alkyl,2-acylglycerols [GL0202]	DG O-26:0 : DG(O-12:0/14:0)	C29H58O4	1.95	< 0.001
	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 43:1	C46H86O6	4.54	< 0.001
				TG 44:0	C47H90O6	3.45	< 0.001
				TG 44:1 : TG(14:0_14:0_16:1) ; TG(14:0_14:1_16:0)	C47H88O6	6.69	< 0.001
				TG 45:0 : TG(14:0_15:0_16:0)	C48H92O6	3.88	< 0.001
				TG 45:1 : TG(14:0_15:0_16:1)	C48H90O6	5.85	< 0.001
				TG 45:2 : TG(13:0_16:1_16:1)	C48H88O6	4.49	< 0.001
				TG 46:1	C49H92O6	6.55	< 0.001
				TG 46:2 : TG(14:0_16:1_16:1)	C49H90O6	6.14	< 0.001
				TG 47:0 : TG(15:0_16:0_16:0) ; TG(15:0_15:0_17:0)	C50H96O6	3.93	< 0.001
				TG 47:1 : TG(15:0_16:0_16:1)	C50H94O6	5.64	< 0.001
				TG 47:2 : TG(15:0_16:1_16:1)	C50H92O6	5.86	< 0.001
				TG 47:3 : TG(15:1_16:1_16:1)	C50H90O6	3.88	< 0.001
				TG 48:0 : TG(16:0_16:0_16:0)	C51H98O6	4.2	< 0.001
				TG 48:1 : TG(16:0_16:0_16:1) ; TG(14:0_16:0_18:1)	C51H96O6	6.51	< 0.001
				TG 48:2 : TG(16:0_16:1_16:1) ; TG(14:0_16:1_18:1)	C51H94O6	7	< 0.001
				TG 48:3 : TG(16:1_16:1_16:1)	C51H92O6	5.29	< 0.001
				TG 49:0 : TG(16:0_16:0_17:0) ; TG(15:0_17:0_17:0)	C52H100O6	3.99	< 0.001
				TG 49:1 : TG(15:0_16:0_18:1)	C52H98O6	5.26	< 0.001
				TG 49:2 : TG(15:0_16:1_18:1) ; TG(15:0_17:1_17:1)	C52H96O6	5.99	< 0.001
				TG 49:3 : TG(16:1_16:1_17:1)	C52H94O6	5.03	< 0.001

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignation	Formule brute	KDS S2 vs S0	
						FC	p-value
[GL]	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 50:0 : TG(16:0_16:0_18:0) ; TG(16:0_17:0_17:0)	C53H102O6	3.57	< 0.001
				TG 50:1 : TG(16:0_16:0_18:1)	C53H100O6	6.56	< 0.001
				TG 50:2 : TG(16:0_16:1_18:1) ; TG(16:0_16:1_18:2)	C53H98O6	7.91	< 0.001
				TG 50:3 : TG(16:1_16:1_18:1) ; TG(16:0_16:1_18:2)	C53H96O6	6.31	< 0.001
				TG 50:4 : TG(16:1_16:1_18:2) ; TG(16:0_16:1_18:3)	C53H94O6	4.65	< 0.001
				TG 51:1 : TG(16:0_17:0_18:1)	C54H102O6	4.32	< 0.001
				TG 51:2 : TG(15:0_18:1_18:1) ; TG(16:0_17:1_18:1) ; TG(16:1_17:0_18:1)	C54H100O6	5.37	< 0.001
				TG 51:3 : TG(15:0_18:1_18:2) ; TG(16:1_17:1_18:1)	C54H98O6	5.11	< 0.001
				TG 51:4	C54H96O6	4.08	< 0.001
				TG 52:1 : TG(16:0_18:0_18:1) ; TG(16:1_18:0_18:0)	C55H104O6	5.09	< 0.001
				TG 52:2 : TG(16:0_18:1_18:1)	C55H102O6	6.56	< 0.001
				TG 52:3 : TG(16:1_18:1_18:1) ; TG(16:0_18:1_18:2) ; TG(16:1_16:1_20:1)	C55H100O6	7.32	< 0.001
				TG 52:4 : TG(16:0_18:1_18:3) ; TG(16:1_18:1_18:2)	C55H98O6	7.5	< 0.001
				TG 53:3	C56H102O6	4.4	< 0.001
				TG 54:2 : TG(16:1_18:1_20:0) ; TG(18:0_18:1_18:1)	C57H106O6	5.11	< 0.001
				TG 54:3 : TG(18:1_18:1_18:1)	C57H104O6	7.39	< 0.001
				TG 54:4 : TG(18:1_18:1_18:2)	C57H102O6	6.58	< 0.001
[SP]	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NH]	Cer 49:1;O3 : Cer(21:1;O3/28:0)	C58H111NO4	-2.51	< 0.001
				Cer 50:1;O3 : Cer(24:1;O3/26:0)	C50H99NO5	-1.73	< 0.001
			[AH]	Cer 50:1;O4	C54H107NO5	-1.65	< 0.001
				Cer 54:1;O4	C49H97N1O4	-1.68	< 0.001
		Acylceramides [SP0204]	Cer[1-O-ENS]	ACer 58:2;O2 : ACer(d18:1/24:0/16:1)	C50H99NO4	-1.73	< 0.001
[PR]	Quinones and hydroquinones [PR02]	Vitamin E [PR0202]		Alpha-Tocophérol (Vitamine E)	C29H50O2	-2.33	< 0.001
[OA]	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	Alpha amino acids and derivatives	Acide pyroglutamique	C5H7NO3	-1.55	0.030
[OC]	Azoles	Imidazoles		Acide trans-urocanique	C6H6N2O2	-1.52	0.023
	Indoles and derivatives	Indolyl carboxylic acids and derivatives		Indolelactic acid	C11H11NO3	-1.53	0.021
		Tryptamines and derivatives	Serotonins	Sérotonine	C10H12N2O	-1.61	0.009

11.10 Annexe 10 : Article “Lipidomic Insights into Seborrheic Dermatitis: Clinical Evaluation of Sebum Changes Using SpiderMass in a Randomized Controlled Study”

British Journal of Dermatology

Text: 3000-4000 words

Abstract: 350 words

Plain Language Summary: 250 words

TITLE: Lipidomic Insights into Seborrheic Dermatitis: Clinical Evaluation of Sebum Changes Using SpiderMass in a Randomized Controlled Study

Running head: SpiderMass lipidomic analysis of seborrheic dermatitis scalp sebum

Authors:

Lucille Darras^{1,3}, Célia Ipinazar¹, Eléonore Gravier¹, Aurélie Mercadie¹, Aurélie Villaret¹, Razvan Marinescu¹, Martine Maitre¹, Camille Genies¹, Valérie Mengeaud², Isabelle Fournier^{3,4,\$}, Gwendal Josse^{1,#}

Affiliations:

¹ Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Toulouse, France

² Laboratoires Dermatologiques Ducray, Lavalur, France

³ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U1192 - Protéomique Réponse Inflammatoire Spectrométrie de Masse - PRISM, F-59000 Lille, France

⁴ Institut Universitaire de France, Paris, France

^{\$} Equal contribution

[#] Corresponding authors:

Prof. Isabelle Fournier, isabelle.fournier@univ-lille.fr. Laboratoire Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM) - Inserm U1192 - Bât SN3, 1er étage, Campus Cité Scientifique, Université de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.

Dr. Gwendal Josse, gwendal.josse@pierre-fabre.com. Laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique - Centre de Recherche sur la Peau - Hôtel-Dieu Saint-Jacques, 2 rue Viguerie, F-31200 Toulouse Cedex3.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Drs Cécile Desjobert-Houitte, Emma Pilling, and Marielle Romet (Santé Active Edition - Synergy Pharm) for medical writing assistance and language editing.

Funding sources:

This study, medical writing and language editing services and the journal's Rapid Service Fee were funded by Pierre Fabre Dermo-Cosmétique and Personal Care.

Author contributions:

All named authors meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship for this article, take responsibility for the integrity of the work as a whole, and have given their approval for this version to be published. In addition Rasvan Marinescu conducted the study. Christophe Lauze, Eléonore Gravier, Aimée Simcic-Mori, Lucille Darras, Gwendal Josse, Célia Ipinazar, Camille Génies, Aurélie Villaret and Martine Maître participated in the analysis and interpretation of data; Christophe Lauze, Eléonore Gravier, Aurélie Mercadié and Aimée Simcic-Mori contributed to the statistical analysis and interpretation of data. Lucille Darras wrote the manuscript. Gwendal Josse, Isabelle Fournier, Eléonore Gravier, Aimée Simcic-Mori, Aurélie Mercadié contributed to the drafting and/or critical revision of the manuscript. Isabelle Fournier and Gwendal Josse overseen the work.

Data availability statement:

Data that support the findings of this study are available in the article or its associated Supplementary Materials.

Ethical statement:

The study was performed in compliance with the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments, as well as Good Clinical Practice guidelines (CHMP/ICH/135/1995 and integrated addendum). It also conformed to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Commission and the French Decree (n°2017-884) pertaining to research on cosmetic products. As registration of studies evaluating cosmetic products is not mandatory in the European Union, the study was retrospectively registered under trial number NCT06578962 (August 28, 2024) for publication. Prior to enrolment, all subjects provided written informed consent.

Abstract

Background. Seborrheic dermatitis (SD) is a skin disorder in which chronic inflammation of the scalp is linked to excessive sebum production and overgrowth of *Malassezia* fungi. These fungi break down sebum lipids, releasing pro-inflammatory unsaturated fatty acids. Lipidomic and metabolomic sebum analysis is thus essential to better understand SD. SpiderMass, an innovative ambient ionization mass spectrometry (AIMS) technology, allows for fast, direct, and non-invasive biochemical profiling of sebum.

Objectives. To assess the potential of SpiderMass for evaluating the skin metabolome and lipidome in scalp SD and study the impact of an anti-SD shampoo (Kelual DS®) on the relative levels of SD-associated scalp metabolites and lipids.

Materials and Methods. Scalp sebum samples were obtained from 42 subjects with scalp SD enrolled in a randomized controlled clinical trial to assess the efficacy of the anti-SD shampoo. All participants used the anti-SD shampoo 3 times weekly for 2 weeks (intensive phase), followed by an eight-week maintenance phase where subjects either continued to apply the anti-SD shampoo once weekly (KDS group) or switched to a neutral shampoo (control group). Sebum was collected during each study visit and analysed with SpiderMass. Additional biochemical analyses were also performed.

Results. After 2 weeks, SpiderMass analysis revealed a significant increase in the levels of glycerolipids and saturated fatty acids, alongside a reduction in the levels of inflammation markers such

as histamine, oxylipins, and arachidonic acid. The change in lipid profile correlated with reduced *Malassezia* levels. During the maintenance phase, the more balanced lipid profile and lower inflammation marker levels were maintained only in the KDS group. SpiderMass findings were consistent with conventional liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) data.

Conclusion. The anti-SD shampoo helped restore and maintain scalp lipid balance and reduce inflammation marker levels and may therefore contribute to improving skin barrier function in scalp SD. SpiderMass enabled real-time monitoring of changes in glycerolipids and inflammation markers, providing results consistent with those obtained using conventional LC-MS approaches. This reliable, powerful, non-invasive tool could be used as a rapid method for biochemical skin analysis in clinical studies, offering new insights into SD mechanisms and treatment responses.

Bulleleted statements

What is already known about this topic?

- Seborrheic dermatitis (SD) is a common inflammatory skin condition associated with excess sebum and *Malassezia* fungi overgrowth.
- *Malassezia* lipases break down skin glycerolipids, producing fatty acids that lead to skin inflammation and itching.
- Anti-SD shampoos are widely used to alleviate SD, but the molecular effects on scalp sebum have not been well characterized in clinical settings.

What does this study add?

- This study used the SpiderMass approach, a novel ambient ionization mass spectrometry technique, to analyse scalp sebum non-invasively in subjects with scalp SD.
- It showed that an anti-SD shampoo restored lipid balance and reduced the levels of inflammation markers in sebum.
- The SpiderMass results were confirmed by conventional LC-MS methods, supporting the value of SpiderMass for clinical dermatology research.

Plain Language Summary

An anti-fungal shampoo can help to restore a healthy balance of oils in scalp sebum and reduce skin irritation in people with seborrheic dermatitis

Seborrheic dermatitis is a common skin condition that causes inflammation of the scalp resulting in red, flaky, and itchy patches. It affects about 2% of people worldwide and is linked to excess oil (sebum) on the skin and the presence of a fungus called *Malassezia*.

Antifungal shampoos are often used to treat people with scalp seborrheic dermatitis. To help us understand how this shampoo affects the molecules of the scalp sebum, we conducted a clinical study in France involving 42 people with scalp seborrheic dermatitis. Everyone taking part used the test shampoo for two weeks. For the next eight weeks, half of the group continued using the test shampoo and the other half switched to a neutral shampoo. During the study, we collected scalp sebum samples using absorbent paper and analysed them using an innovative mass spectrometry-based method called SpiderMass. This quick and painless technology allowed us to check whether using the shampoo led to changes in the levels of scalp sebum molecules.

We found that after two weeks of using the shampoo, there was a clear reduction in molecules that can cause inflammation, and an increase in healthy sebum oils. These improvements were maintained in the group that continued using the test shampoo and were accompanied by a reduction in the amount of *Malassezia* fungi on the scalp.

Our study showed that the test shampoo improved scalp health by reducing inflammatory molecules and restoring the balance of healthy scalp lipids. We also showed that SpiderMass is a promising tool for studying skin conditions and testing treatment effects, which could improve how we evaluate skin treatments in the future.

Introduction

Seborrheic dermatitis (SD) is a skin disorder affecting 1-3% of the population¹. It occurs in all ethnic groups and in individuals of all ages, but is more common in males than females. SD is clinically characterized by the presence of patches of inflamed and itchy skin and is usually associated with a high levels of sebum production, is often accompanied by the presence of dandruff. The role of *Malassezia* in the exacerbation of scalp SD is well established, with the overgrowth of these commensal fungi disrupting skin homeostasis and altering skin lipid composition^{2,3}.

Malassezia species thrive in lipid-rich environments, such as skin areas like the scalp that produce high levels of sebum. These fungi produce lipases that metabolize major sebum components, including monoglycerides (MGs), diglycerides (DGs), and triglycerides (TGs), to provide a carbon source for their growth and survival^{4,5}. The degradation of these glycerolipids (GLs) – which consist of a glycerol backbone bound to one, two, or three fatty acids, respectively – leads to the release and accumulation of short-chain unsaturated free fatty acids (UFFAs)⁶. In patients with SD and *Malassezia* overgrowth, this process results in a marked decrease in GLs in favour of short-chain UFFAs on the skin surface and an increase in inflammatory markers such as histamine and oxylipins^{7,8}. This alteration in sebum lipid composition disrupts the skin barrier function of the *stratum corneum*, most notably by modifying the ceramide profile. Analysing the skin lipid profile of subjects with SD is therefore crucial for advancing our understanding of this inflammatory skin disease. In this context, two recent research studies have described changes in ceramide composition in SD-affected skin^{9,10}.

Shampoos containing antifungal agents play a key role in the management of scalp SD¹¹⁻¹³. However, relatively little is known about the effects of these treatments on SD skin at the molecular level. Metabolomic and lipidomic analyses are typically conducted using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS). At present, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the gold standard for the identification and relative quantification of many skin metabolites. However, this approach is time consuming and labour intensive, requiring extensive sample preparation and multiple sample runs to allow separation and analysis of the heterogenous and physiochemically diverse subclasses of lipids and metabolites found

in human sebum. In this context, shotgun metabolomics and lipidomics have emerged as promising strategies. An innovative ambient ionization mass spectrometry (AIMS) technology called SpiderMass¹⁴, which allows samples to be analysed without any preparation, can be used to identify a wide range of metabolites and lipids for both *ex vivo* applications and direct *in vivo* analysis with minimal invasiveness¹⁵.

In the present study, we evaluated the potential of SpiderMass to study scalp SD by using this technology to analyse sebum scalp samples from subjects with SD who had enrolled in a bicentric, randomized, controlled, clinical trial, initially conducted to evaluate the efficacy and safety of a 10-week scalp care routine using an anti-SD shampoo¹⁶. In addition to validating the suitability of the SpiderMass technique by comparison to data from this study cohort obtained by conventional LC-MS/MS (Genies et al.), the main aim of this ancillary study was to evaluate the effects of the anti-SD shampoo on inflammatory markers and lipids in subjects with SD.

Materials and Methods

Study design and Ethics.

Details of the design of the initial clinical trial have been described previously¹⁷. Briefly, the study was conducted over a 10-week period at the Skin research Centre (Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Toulouse) and the Centre de santé Sabouraud - Hôpital Saint Louis (Paris). The study product was an anti-SD shampoo (Kelual DS® or KDS, DUCRAY Dermatological Laboratories, Boulogne Billancourt, France) containing two antifungal agents (ciclopirox olamine or ciclopirox, and piroctone olamine) and an anti-inflammatory agent (β -glycyrrhetinic acid). The study consisted of 2 phases (**Supplementary information Figure S1**). In the first phase (intensive phase), all study participants were instructed to use the anti-SD shampoo 3 times per week for 2 weeks. In the second phase (maintenance phase), the participants were randomized into 2 groups: a KDS group in which the participants continued using the anti-SD shampoo once weekly, in alternation with two applications per week of a neutral shampoo (Extra Doux® or ED, DUCRAY Dermatological Laboratories, Boulogne Billancourt, France), and the control group in which participants use the neutral shampoo only (3 times

weekly). The effects of the anti-SD shampoo (clinical, biological and biometrological assessments) were evaluated at inclusion (week 0 [W0]), W2, W6 and W10 (study end).

The study was registered (trial number: NCT06578962) and conducted in accordance with Good Clinical Practice guidelines (CHMP/ICH/135/1995) and the Declaration of Helsinki 1996. Written informed consent was obtained from all patients. The study also conformed to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Commission and the French Decree (n°2017-884) pertaining to research on cosmetic products.

Scalp sebum sampling.

Because patients are recruited from two centres, *in vivo* analysis could not be performed. Thus, for SpiderMass analysis, sebum was collected using absorbent paper, which was rubbed gently over the subject's scalp at each study visit. The absorbent paper contained no gum or additives. Before sampling, each sheet of absorbent paper was separated into two parts: one part was applied to the scalp to collect the sample, and the other half was used as a blank control for SpiderMass analysis. After collection, sebum samples on the absorbent paper were stored at -80°C. All samples were then analysed simultaneously at the end of the study to minimize instrumental variation. For metabolomic analysis by LC-MS/MS, sebum collection was performed using a swab rubbed on the scalp as described previously by Genies et al. (under submission) (**Supplementary information Appendix S1**).

SpiderMass analysis.

The principle and design of the SpiderMass technology has been described in detail previously^{18,19}. The unique setup used for this clinical trial is an adaptation of the initially developed prototype to fit the dermatological applications. The set up used for scalp sebum analysis is summarized in **Figure 1A**. Briefly, a fibered laser tuned at 2.94 μm was used to ablate the sample, and the ablated material was then aspirated using polytetrafluoroethylene tubing directly connected to a quadrupole time-of-flight MS instrument (Q-TOF, Impact II, Bruker) and passed through a dedicated interface, in-house developed to prepare the aerosol. The MS instrument was operated in the positive ion mode and set to scan in the 50–1650 m/z range and only one acquisition per sample is made. The laser microetching caused no significant damage to the absorbent paper (**Figure 1B**) and the spectra obtained

from the absorbent paper sebum samples were similar to those recorded from the direct *in vivo* application of the technique to a sebum-rich area of the face (**Figure 1C**).

LC-MS/MS metabolomic analysis

LC-MS/MS analysis was carried out by Metabolon Inc. (Morrisville, NC, USA) using the sample preparation protocols and methods detailed previously by Genies et al. (under submission) and in supplementary data. For comparison of LC-MS data with SpiderMass data only molecules found to be significantly modulated in both analyses were compared as part of the current study

Fourier Transform Infra-red (FTIR) analysis

Transmission FTIR spectra of the lipids on the absorbent paper were acquired with only one run per sample in the 4000–670 cm^{-1} range on a Perkin Frontier spectrometer (Spectrum 400 FT-IT, Perkin Elmer). After blank subtraction, the ratio of the peak areas corresponding to free fatty acids (FFAs; 1710 cm^{-1}) and TGs (1740 cm^{-1}) was calculated and used as an indicator of microbiotic lipase activity and thus sebum quality.

Microbiota analysis

The scalp microbiota was analysed using two methods, as described in Maître et al.¹⁷: absolute quantification of *Malassezia restricta* and *Malassezia globosa* was performed by digital droplet PCR (ddPCR™) with the ddPCR QX200™ and AutoDG™ (Bio-Rad Laboratories) system, and amplicon sequencing of the internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) region of the fungal population was performed at the GeT-IT Genomics Platform (INRAE transfer METYS in Castanet-Tolosan, France).

Data processing and statistical analysis

Raw SpiderMass data were imported into a custom-made Matlab (Mathworks Inc) program for pre-processing. Statistical analyses were then performed with an R-Shiny custom-made application. This data pre-processing step was used to normalize the spectra with the total number of ions (TIC). Contaminant peaks (including those related to the study products) were then identified and removed from subsequent analyses.

Differential analysis was then performed to identify peaks showing significant between-group changes (adjusted p-value < 0.05) in relative intensity over time. A mixed linear model was fitted for

each peak with the following fixed factors: group (Control/KDS), visit (W2/W6/W10) and the interaction group*visit included. The subject was included as a random factor and the baseline value at “W0” was included as a covariate. Finally, multiple testing correction was applied using the Benjamini-Hochberg method to minimize the risk of false positives. The discriminative ions were annotated using public databases, namely LipidMaps database, Alex123 and/or HMDB database, with MS² fragmentation. Only modulated masses with an absolute fold change (FC_{abs}) greater than or equal to 1.5 were included in further analyses. Finally, an integrated analysis of *ITS1* rRNA sequencing results¹⁷ with SpiderMass lipidomics and metabolomics data during the intensive phase was performed using the multi-view DIABLO (Data Integration Analysis for Biomarker discovery using Latent cOmponents²⁰) method (**Supplementary Information Appendix S2**).

Results

Participant cohort

A total of 42 subjects (aged 18-52 years; mean age 35.84 years) were included in the intensive phase of the study. During the maintenance phase, 21 subjects were randomly allocated to the KDS group and 21 subjects to the control group. The two randomized groups were similar in terms of demographic and clinical characteristics, as detailed in Maître et al.¹⁷.

SpiderMass, microbiota and FTIR analysis during the intensive phase

Comparison of the SpiderMass MS fragmentation spectra obtained from the sebum samples collected on absorbent paper before (W0) and after (W2) the intensive phase revealed clear changes in the metabo-lipidomic profile of the SD scalp sebum. Evaluation of the lipid profile indicated that peak intensity in areas of the spectra associated with GLs increased after two weeks of application of the study shampoo (**Figure 2A**). Different profiles were observed for the different GL families (i.e., MGs, DGs, and TGs; **Figure 2B**).

The differential analysis revealed that the levels of 135 sebum molecules were significantly modulated between the start and end of the intensive phase (adjusted p-value <0.05 and with an FC_{abs} ≥ 1.5; **Figure 3A**). Of these 135 modulated molecules, 104 showed increased production, mainly GLs and saturated free fatty acids (SFFAs) (**Figure 3B-E**), and 31 showed decreased production,

including UFFAs (**Figure 3F**), metabolites, oxylipins, and sphingolipids. More specifically, we identified 100 GLs for which production increased during the intensive phase, including 14 MGs, 48 DGs and 37 TGs (**Table S1; Supplementary Information**). TGs showed the most marked increase, with an average FC of 5.46, whereas smaller increases were detected for MGs and DGs, with average FCs of 3.56 and 3.81, respectively. The levels of 4 SFFAs also significantly increased during the intensive phase, with an average FC of 1.76. The 31 molecules showing decreased production during the intensive phase included 17 UFFAs, with an average FC of -1.69 of which arachidonic acid (AA; 20:4n-6) with a FC = -1.52. 5 sphingolipids (4 ceramides and an acylceramide), with an average FC of -1.86, and 2 oxylipins (9-HODE (9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid) with a FC = -1.58 and 13-HOTE (13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid) with a FC = -1.87). Significant decreases in the levels of inflammation markers, such as urocanic acid (FC = -1.52) and histamine (FC = -2.71), were also detected. The levels of several small metabolites were also significantly reduced: serotonin (FC = -1.61), indolelactic acid (FC = -1.53), alpha-tocopherol (FC = -2.33) and pyroglutamic acid (FC = -1.55) (**Table S1; Supplementary Information**). In addition, decreases in the abundance of *Malassezia globosa* (**Figure 3G**) and *Malassezia restricta* (**Figure 3H**) were observed during the intensive phase. The FFA/TG ratio measured by FTIR also showed a clear decrease between W0 and W2 (**Figure 3I**).

LC-MS/MS sebum analysis during the intensive phase

In parallel to SpiderMass, conventional metabolomics was performed on swab samples analysed by LC-MS/MS. The results of this analysis are detailed in Genies et al. (under submission) and included a broader range of molecules than our lipid-focused SpiderMass analysis. The metabolomic LC-MS/MS analysis led to the identification of 161 significantly modulated molecules between W0 and W2: 31 molecules showed significantly increased and 130 showed significantly decreased ($FC_{abs} \geq 1.5$). Overall, 21 of these molecules were found to be significantly modified in both analyses. The modulation pattern and FC values derived from the LC-MS/MS and SpiderMass data appeared similar for all molecules evaluated in both studies; however, for DG 30:1 ($FC_{LC-MS} = 9.05$, $FC_{SpiderMass} = 5.24$) and DG 32:1 ($FC_{LC-MS} = 11.29$, $FC_{SpiderMass} = 6.23$) the LC-MS/MS FC values appeared higher than those derived from the SpiderMass analysis (**Figure 4**).

Integrated lipid and microbiota analysis during the intensive phase

The SpiderMass/*ITS1* integrated analysis showed a correlation between the high presence of *Malassezia* and lipids, such as UFFAs and the two oxylipins (octadecanoids), as well as a strong correlation between the presence of *Cladosporium* and *Penicilium* and GLs (MG, DG, TG) and SFFAs (**Figure 5A**). Moreover, these correlations discriminated samples based on the time of sampling. The position of sample coordinates inside the fungi and lipid subspaces (**Figure 5B**) indicated that the group comprising *Malassezia*, UFFAs and the two oxylipins predominated at W0, whereas the *Cladosporium*, *Penicilium* and GL group predominated at W2. The DIABLO analysis showed a high degree of covariance between changes in fungi composition and changes in lipid profiles following the intensive phase, which indicated a possible relationship between these scalp components.

SpiderMass, microbiota and FTIR analysis during the maintenance phase

Analysis of data from sebum samples collected during the second phase of the study showed that subjects in the KDS group maintained a regular lipid profile over time, whereas a reversal of the effects observed in the intensive phase occurred in the control group, with a decline in the levels of GLs (**Figure 3 B-D**) and SFFAs (**Figure 3E**) back to the levels measured at baseline. There was also an increase in the levels of inflammatory markers and UFFAs (**Figure 3F**), which returned to levels close to those observed before application of the anti-SD shampoo. In addition, increases in the abundance of *Malassezia globosa* (**Figure 3G**) and *Malassezia restricta* (**Figure 3H**) were observed in the control group during the maintenance phase. The clear decrease in the FFA/TG ratio measured by FTIR observed during the intensive phase, was also not maintained in the control group (**Figure 3I**).

Discussion and Conclusion

This study used an innovative SpiderMass approach to show that the regular use of an anti-SD shampoo led to a substantial change in the lipid profile of scalp sebum in subjects with SD, leading to the return of a healthy balance of GLs and FFAs, reductions in the levels of markers of inflammation and pruritus, and decreases in *Malassezia* abundance. The improvements were maintained with continued use of the study product, with significant differences observed between the KDS and control groups for most parameters during the maintenance phase. These results demonstrating the

effectiveness of the study product as part of a maintenance care regimen are consistent with those of the clinical study of Turlier et al.¹¹. As in this previous trial, many recent clinical studies evaluating the effectiveness of anti-SD products regularly include instrument or biochemical measurements but rarely include lipidomic or metabolomic analysis. However, these omics approaches offer a more complete and objective evaluation of the effects of study products. Indeed, in our study, the SpiderMass/ITS1 integration analysis revealed co-variance patterns between metabolites/lipids and microbial species, highlighting how this approach could lead to a better understanding of SD dysbiosis and the impact of treatments.

SD treatment involves topical anti-inflammatory agents and topical or oral antifungal drugs²¹. The anti-SD shampoo used in this study contained several antifungal ingredients (ciclopirox olamine and piroctone olamine) and an anti-inflammatory agent (β -glycyrrhetic acid). Based on current knowledge of the pathophysiology of SD and the results of the current study, the antifungal agents in the study shampoo limited the proliferation of *Malassezia* species and rebalanced the scalp microbiota, which combined with the anti-inflammatory agent, led to a reduction in presence of pro-irritant and pro-inflammatory UFFAs⁴ and other inflammatory markers such as histamine, arachidonic acid, oxylipins⁸ and urocanic acid, minimizing disruption of the epidermal barrier and the resultant erythema (as illustrated in **Figure 6**).

SpiderMass, first introduced for precise detection of excision margins in cancer²², presents several advantages for skin analysis, including the minimal invasiveness of sampling, real-time capacity, and large amount of information generated during analysis. Indeed, mass spectrometry is an interesting technology for skin analysis in clinical trials due the specificity of the molecular information extracted. Many studies have used LC-MS/MS to evaluate the lipid and metabolic profiles associated with inflammatory skin diseases, such as atopic dermatitis, acne, or psoriasis²³⁻²⁷. However, few studies have carried out lipidomic analysis of the skin or sebum of people with SD. The current study demonstrated the potential of analysing skin molecules directly in sebum samples using SpiderMass. Our analysis identified a large number of molecules modulated by the application of the study product, including changes in the abundance of key molecules involved in the pathophysiology of SD. Some of

these molecules were also found to be differentially modulated in a metabolomic analysis carried out on the same cohort of patients using LC-MS/MS (Genies et al.). This is the first time that metabolic analyses conducted using SpiderMass and conventional LC-MS/MS approaches have been compared using samples taken from the same patients. Our findings therefore provide robust evidence validating the use of the SpiderMass approach in clinical studies.

Our detailed analysis of the lipid composition of the scalp sebum of subjects with SD during the intensive phase showed that the various structural lipid classes in the sebum showed very homogeneous patterns of modulation in their levels after the 2-week application of the study shampoo. Some of the changes observed during this intensive phase of the study, such as the decrease in UFFAs and the increase in TGs, confirmed the results of a previous study based on data obtained by conventional GC-MS analysis of samples from subjects with SD before and after application of antifungal shampoo⁵. In the present study, we also showed that the ratio between the FFAs and TGs measured by FTIR provided an accurate indication of the lipid profile status of SD scalp sebum. This ratio had been previously proposed for studying the sebum in acne but, to our knowledge, this approach has never been proposed for SD²⁸.

The wide range of molecules analysed by SpiderMass in our study provided further insights into the global effects of the study product, as well as a more detailed analysis of lipid composition and inflammatory mediators in SD. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), very long-chain fatty acids that contain at least two carbon-carbon double bonds, alongside some PUFA derivatives, were some of the key sebum components showing altered production following regular use of the study product. AA is the second most abundant PUFAs in the human epidermis and, although its concentration does not exceed 3%, it is a precursor of several pro-inflammatory molecules, including prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes poly-hydroxy fatty acids and oxylipins²⁹. Oxylipins in particular play a central role in inflammatory skin reactions. In our study, the level of AA, as well as the levels of two oxylipins were found to be significantly reduced after 2 weeks of applying the study product. The two modulated oxylipins identified in our study, 9-HODE and 13-HOTE, are involved in the release of inflammatory cytokines⁸ and the activation of the inflammatory response³⁰, respectively. These findings

therefore demonstrate the anti-inflammatory properties of the study product, which resulted in a decrease in the inflammatory state of the scalp in subjects with SD.

Another example of the anti-inflammatory action of the study product was the effect on histamine production. Like oxylipins, histamine and its receptors represent a complex immunoregulatory system, making histamine a key biomarker of inflammation and previously described as a reference marker of itch in SD^{7,31,32}. Histamine is a potent inflammatory mediator produced by activated cells. It intensifies and prolongs inflammatory responses by triggering the recruitment of various pro-inflammatory molecules and immune cells³³. As with the other markers of inflammation evaluated in our SpiderMass study, histamine production was reduced after two weeks of application of the study product. Beyond reducing inflammation, the anti-histamine effect of the study product may also help to improve skin barrier function. Among its many activities, histamine plays an important role in modifying the epidermal barrier, mainly through effects on reducing filaggrin expression³⁴. In addition to its structural role, filaggrin is slowly degraded by proteases to release hygroscopic amino acids such as trans-urocanic acid and pyroglutamic acid³⁵. Together these precursors form the natural moisturizing factors that are essential for epidermal barrier integrity, pH balance, and contribute to maintaining epidermal hydration³⁶. In this study, urocanic acid was found to be significantly reduced after the 2-week intensive phase and stabilized during the maintenance phase, suggesting that skin turnover was restored by the study product.

Sphingolipids were another class of lipids that showed significant modulation during the intensive phase of the study. This lipid class is defined by the presence of a sphingoid backbone with a variety of headgroups. Sphingolipids contain one of the four classes of sphingoid bases including sphingosine, sphinganine (dihydrosphingosine), phytosphingosine, and 6-hydroxysphingosine³⁷. A sphingoid base conjugated with a fatty acid creates a ceramide. Ceramides are bioactive lipids that play a key role in lipid signalling. Sphingolipid metabolism can be stimulated by multiple stimuli including inflammatory responses^{38,39}. Recently, Rousel et al. investigated the link between skin ceramide composition and skin barrier properties¹⁰. In our study, several ceramides were found to be reduced after the intensive phase, which could be explained by a decrease in desquamation after the application

period. Together, these results suggest that the study product modulated ceramide dynamics on the scalp. Given that ceramides are involved in apoptosis and inflammatory pathways⁴⁰, these results could also reflect altered levels of inflammation, consistent with our results showing the downregulation of oxylipin, histamine and AA production during the intensive phase of the study.

Taken together, the various molecular variations observed during the intensive phase of the study indicated that, in addition to restoring lipid balance, the study product showed significant activity on various metabolic pathways involved in SD, including reducing inflammatory markers and modulating the levels of molecules that could lead to improvements in the integrity of the epidermal barrier of the scalp in SD.

In the present study, we showed that the SpiderMass technology allowed the precise, non-invasive analysis of the lipid and metabolite profile of scalp sebum in subjects with SD. This strategy enabled the rapid collection of a large amount of molecular data. Both a global analysis and the identification of the metabolites and lipids were shown to be possible using the MS/MS approach. However, the absence of a separation method upstream of the mass spectrometer in the SpiderMass set up limited molecular identification in some cases, notably when two compounds had very close m/z ratios and only the molecule with the highest intensity could be fragmented and analysed. This constraint could be partially overcome by integrating an ion mobility spectrometer into the system, offering an additional dimension for separation and thus improving the resolution of the analysis. We also demonstrated that this strategy could be used in clinical trials to follow the evolution the various metabolites and lipids during participant follow up. Indeed, in this study we investigated how an anti-SD shampoo restored a healthier lipid profile in subjects with SD, leading to increases in glycerolipid content and lower levels of inflammation and itching markers, such as AA and histamine. This demonstrated the potential of SpiderMass technology as an asset for both understanding the underlying mechanisms of skin pathologies and as a valuable tool for evaluating efficacy in clinical studies. Lastly, the technology can be used similarly *in vivo* to perform time course analysis and better pictured the pathophysiological mechanisms of skin diseases as well as to follow the efficiency of new active products by monitoring along time their effect on the skin at the molecular level.

References

1. Adalsteinsson JA, Kaushik S, Muzumdar S, et al. An update on the microbiology, immunology and genetics of seborrheic dermatitis. *Exp Dermatol* 2020; 29:481–9.
2. Lee YW, Lee SY, Lee Y, Jung WH. Evaluation of Expression of Lipases and Phospholipases of *Malassezia restricta* in Patients with Seborrheic Dermatitis. *Ann Dermatol* 2013; 25:310–4.
3. Sommer B, Overy DP, Kerr RG. Identification and characterization of lipases from *Malassezia restricta*, a causative agent of dandruff. *FEMS Yeast Res* 2015; 15:fov078.
4. Park M, Park S, Jung and WH. Skin Commensal Fungus *Malassezia* and Its Lipases. *J Microbiol Biotechnol* 2021; 31:637–44.
5. Ro BI, Dawson TL. The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2005; 10:194–7.
6. Gordon James A, Abraham KH, Cox DS, et al. Metabolic analysis of the cutaneous fungi *Malassezia globosa* and *M. restricta* for insights on scalp condition and dandruff. *Int J Cosmet Sci* 2013; 35:169–75.
7. Vijayaraghavan S, Vedula SK, Bourokba N, et al. Relationship between scalp histamine levels and dandruff within an Indian population: A confirmation study using LC/MS/MS method. *Exp Dermatol* 2022; 31:814–8.
8. Ambaw YA, Pagac MP, Irudayaswamy AS, et al. Host/*Malassezia* Interaction: A Quantitative, Non-Invasive Method Profiling Oxylipin Production Associates Human Skin Eicosanoids with *Malassezia*. *Metabolites* 2021; 11:700.
9. Chu H, Kim SM, Kim WJ, Park CO. Head and neck dermatitis is exacerbated by *Malassezia furfur* colonization, skin barrier disruption, and immune dysregulation. *Front Immunol* 2023; 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1114321.
10. Rousel J, Nădăban A, Saghari M, et al. Lesional skin of seborrheic dermatitis patients is characterized by skin barrier dysfunction and correlating alterations in the stratum corneum ceramide composition. *Exp Dermatol* 2024; 33:e14952.
11. Turlier V, Viode C, Durbise E, et al. Clinical and Biochemical Assessment of Maintenance Treatment in Chronic Recurrent Seborrheic Dermatitis: Randomized Controlled Study. *Dermatol Ther* 2014; 4:43–59.
12. Dall'Oglio F, Nasca MR, Gerbino C, Micali G. An Overview of the Diagnosis and Management of Seborrheic Dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2022; 15:1537–48.
13. Mangion SE, Mackenzie L, Roberts MS, Holmes AM. Seborrheic dermatitis: topical therapeutics and formulation design. *Eur J Pharm Biopharm* 2023; 185:148–64.
14. Fatou B, Saudemont P, Leblanc E, et al. In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application. *Sci Rep* 2016; 6:25919.
15. Ogrinc N, Saudemont P, Balog J, et al. Water-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for minimally invasive in vivo and real-time surface analysis using SpiderMass. *Nat Protoc* 2019; 14:3162–82.

16. Maître M, Baradat S, Froliger M, et al. Scalp Microbiome Dynamics Can Contribute to the Clinical Effect of a Novel Antiseborrheic Dermatitis Shampoo Containing Patented Antifungal Actives: A Randomized Controlled Study. *Dermatol Ther* 2025; 15:2077–97.
17. Maître M, Baradat S, Froliger M, et al. Scalp microbiome dynamics can contribute to the clinical effect of a novel anti-seborrheic dermatitis shampoo containing patented antifungal actives: a randomized controlled study. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2025.
18. Fatou B, Ziskind M, Saudemont P, et al. Remote Atmospheric Pressure Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry (Remote IR-MALDI MS) of Proteins. *Mol Cell Proteomics MCP* 2018; 17:1637–49.
19. Saudemont P, Quanico J, Robin Y-M, et al. Real-Time Molecular Diagnosis of Tumors Using Water-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Technology. *Cancer Cell* 2018; 34:840-851.e4.
20. Singh A, Shannon CP, Gautier B, et al. DIABLO: an integrative approach for identifying key molecular drivers from multi-omics assays. *Bioinformatics* 2019; 35:3055–62.
21. Borda LJ, Perper M, Keri JE. Treatment of seborrheic dermatitis: a comprehensive review. *J Dermatol Treat* 2019; 30:158–69.
22. Ogrinc N, Attencourt C, Colin E, et al. Mass Spectrometry-Based Differentiation of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma and Nontumor Regions With the SpiderMass Technology. *Front Oral Health* 2022; 3. URL <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/froh.2022.827360> [accessed on 8 December 2023].
23. Ilves L, Ottas A, Kaldvee B, et al. Metabolomic Analysis of Skin Biopsies from Patients with Atopic Dermatitis Reveals Hallmarks of Inflammation, Disrupted Barrier Function and Oxidative Stress. *Acta Derm Venereol* 2021; 101:adv00407–adv00407.
24. Zhou M, Yang M, Zheng Y, et al. Skin surface lipidomics revealed the correlation between lipidomic profile and grade in adolescent acne. *J Cosmet Dermatol* 2020; 19:3349–56.
25. Camera E, Ludovici M, Tortorella S, et al. Use of lipidomics to investigate sebum dysfunction in juvenile acne. *J Lipid Res* 2016; 57:1051–8.
26. Łuczaj W, Wroński A, Domingues P, et al. Lipidomic Analysis Reveals Specific Differences between Fibroblast and Keratinocyte Ceramide Profile of Patients with Psoriasis Vulgaris. *Molecules* 2020; 25:630.
27. Ilves L, Ottas A, Kaldvee B, et al. Metabolomic Differences between the Skin and Blood Sera of Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Int J Mol Sci* 2022; 23:13001.
28. Sorg O, Nocera T, Fontao F, et al. Lipid Droplet Proteins in Acne Skin: A Sound Target for the Maintenance of Low Comedogenic Sebum and Acne-Prone Skin Health. *JID Innov* 2021; 1:100057.
29. Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res* 2013; 52:141–64.
30. Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jakob T, et al. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:831–8.
31. Rattanakaemakorn P, Suchonwanit P. Scalp Pruritus: Review of the Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *BioMed Res Int* 2019; 2019:e1268430.

32. Al-Kenani HQM. Detection Of Some Immunological And Biochemical Markers In Seborrheic Dermatitis Patients. *J Pharm Negat Results* 2022; 13. doi:10.47750/pnr.2022.13.S02.30.
33. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm* 2018; 2018:e9524075.
34. Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, et al. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy* 2013; 68:37–47.
35. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1:43–8.
36. Riethmuller C, McAleer MA, Koppes SA, et al. Filaggrin breakdown products determine corneocyte conformation in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:1573-1580.e2.
37. Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneums. *J Lipid Res* 2008; 49:1466–76.
38. Bikman BT, Summers SA. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J Clin Invest* 2011; 121:4222–30.
39. Maceyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 2014; 510:58–67.
40. Pralhada Rao R, Vaidyanathan N, Rengasamy M, et al. Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. *J Lipids* 2013; 2013:e178910.

Figures

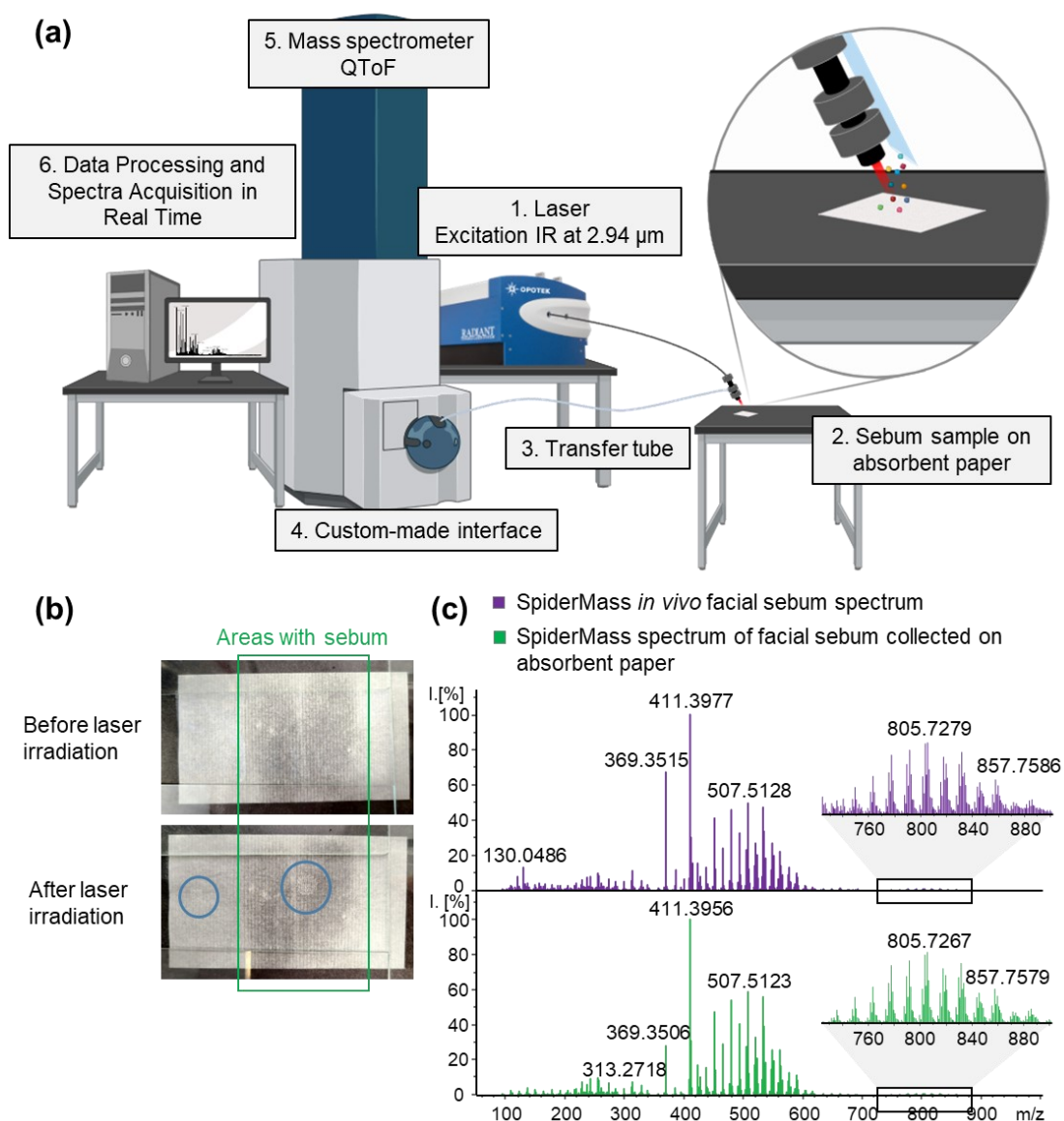


Figure 1 SpiderMass. (a) Schematic representation of the SpiderMass setup for scalp sebum analysis. The SpiderMass system was equipped with a fibered laser micro-sampling device, an ion transfer tube, and a custom-made APCI-like interface with a QToF MS. (b) Photograph of sebum-impregnated absorbent paper, before and after laser irradiation. Laser micro-etching did not damage the substrate: only slight white marks are visible at the impact points. (c) MS spectra acquired by SpiderMass under *in vivo* conditions by direct application to the face (violet spectrum), and from a sebum sample collected on absorbent paper, taken from the same patient (green spectrum). APCI, Atmospheric-pressure chemical ionization; I, Intensity; IR, infrared; MS, Mass Spectrometry; m/z , mass to charge ratio; QToF MS, quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometer.

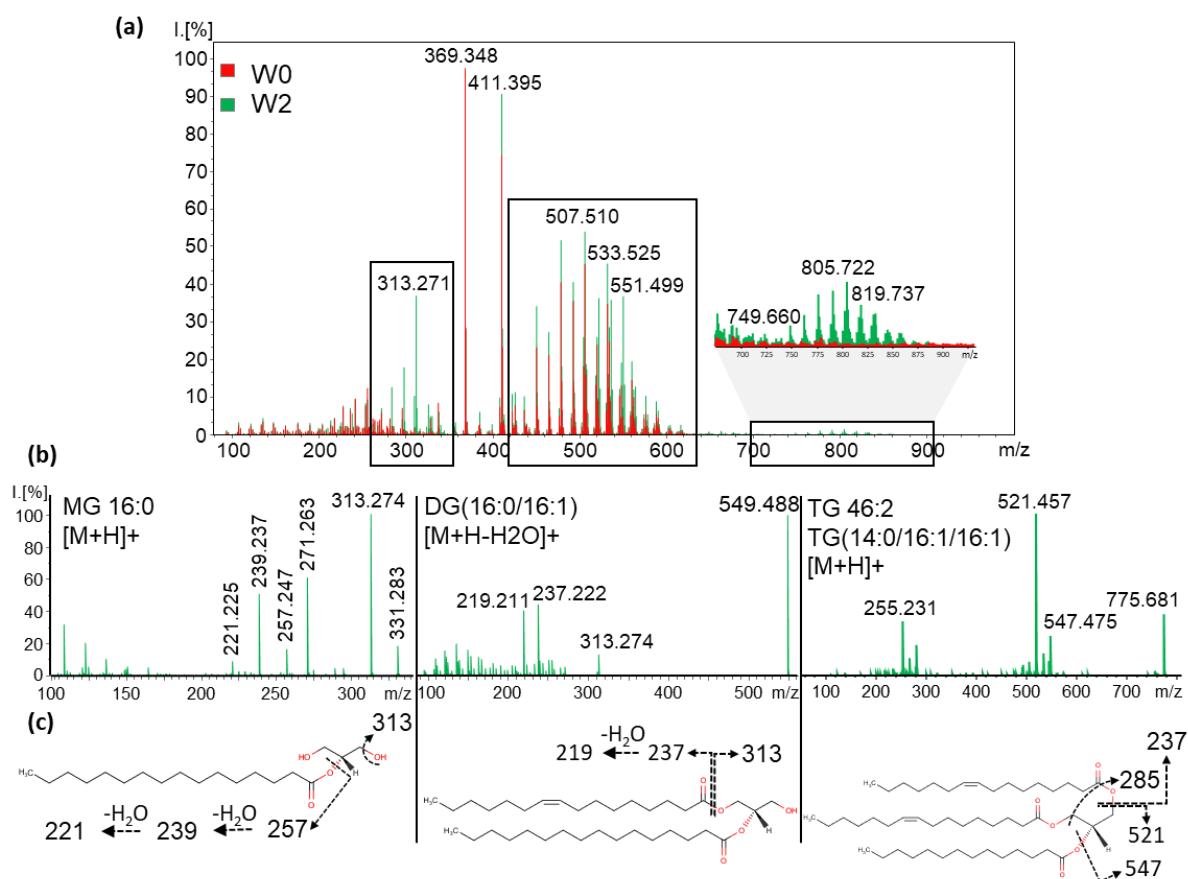


Figure 2 SpiderMass spectra and assignments. (a) SpiderMass MS spectra of the scalp sebum obtained by analysing samples collected on adsorbent paper from subjects with SD at W0 before application of the study shampoo (red) and after 2 weeks of using the study product 3 times/week (W2; green); (b) MS² spectra of 3 glycerolipids. These lipids followed a precise fragmentation pattern giving similar fragmentation spectra. (c) Fragmentation scheme of the 3 glycerolipids: a monoglyceride (MG), a diglyceride (DG), and a triglyceride (TG). I, Intensity; m/z , mass to charge ratio; MS, Mass Spectrometry; MS², Fragmentation by tandem mass spectrometry; SD, Seborrheic Dermatitis; W, Week.

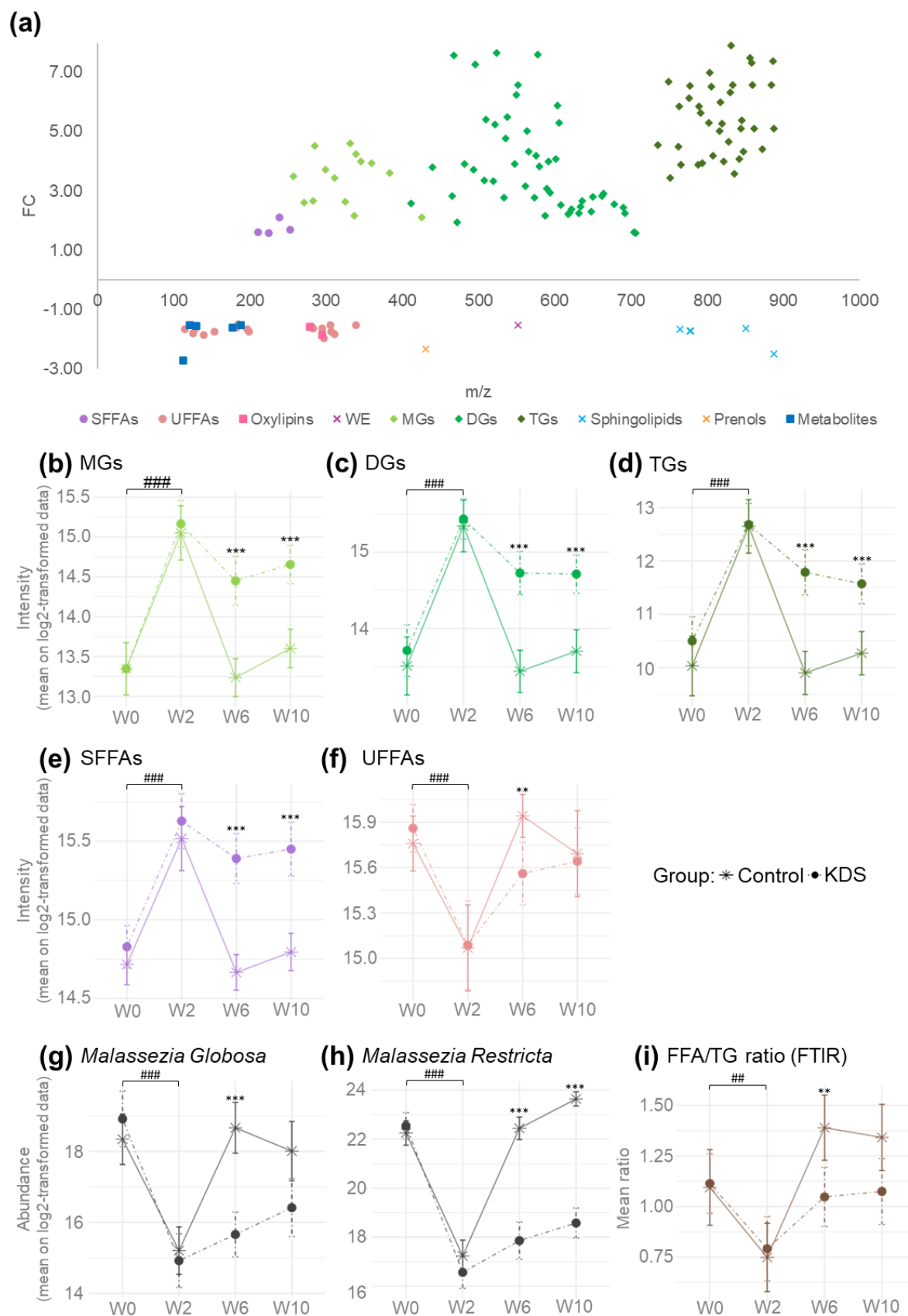


Figure 3 Analysis of significantly modulated molecules (a) Fold change (FC) distribution of each of the 135 molecules identified as significantly modulated between W0 (before application of the

study product) and W2 (after 2 weeks of study shampoo application). A positive FC value indicates an increase in the production of the lipid/metabolite after 2 weeks of study product application, whereas a negative FC value indicates a decrease in molecule production. **(b-f)** Changes in the levels glycerolipids and free fatty acids: **(b)** monoglycerides (MGs), **(c)** diglycerides (DGs) and **(d)** triglycerides (TGs), as well as **(e)** saturated (SFFAs) and **(f)** unsaturated free fatty acids (UFFAs) quantified by SpiderMass. **(g-h)** time course of log₁₀ *Malassezia* **(g)** *restricta* and **(h)** *globosa* populations. **(i)** FFA/TG ratio obtained by FTIR during the intensive phase (W0 to W2) in the global study population and during the maintenance phase (W2 to W10) in control and KDS group subjects. All results are expressed as the mean $\pm$ SEM. Comparisons were conducted for both groups pooled between W0 and W2: #p < 0.05, ##p < 0.01 and ###p < 0.001; and between the KDS and control groups *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001. FC, Fold change; FFA, Free fatty acids; FTIR, Fourier Transform Infra-red; KDS, Kelual DS®; W, week.

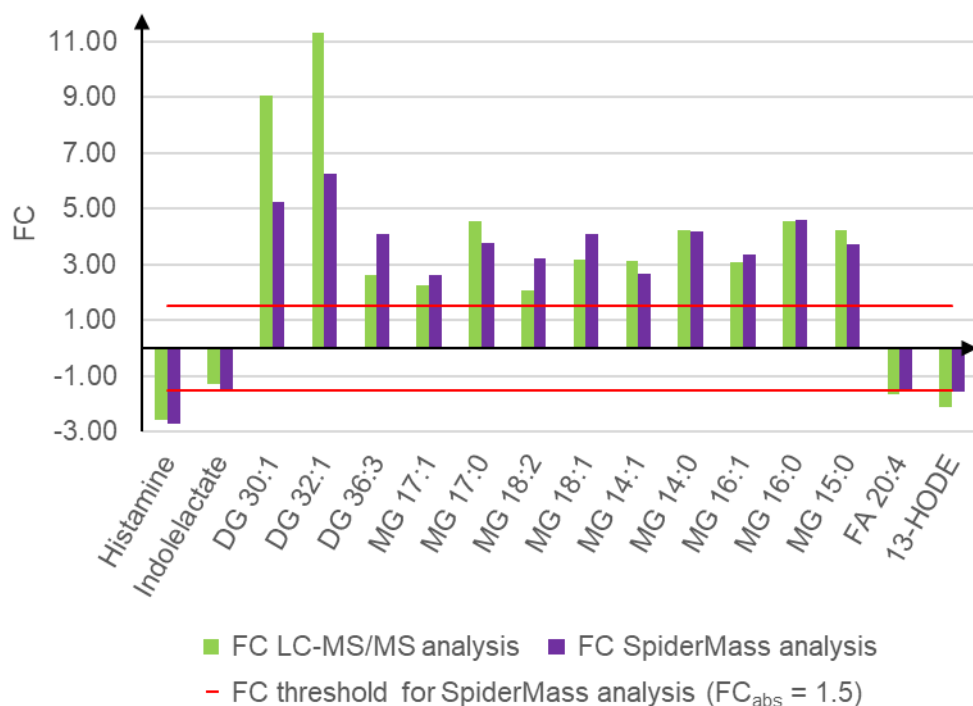


Figure 4 **Comparison of the SpiderMass and LC-MS metabolomic analyses.** Data shown are the calculated fold change values for 16 of the 21 metabolites/lipids analysed and identified as being significantly modulated (Fold Change (FC) ≥ 1.5) in both the liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and SpiderMass analyses according to the results of Genies et al. (under submission). DG, diglyceride; FA, Fatty acids; FC, fold change; FC_{abs} , Fold Change Absolute; MG, monoglyceride.

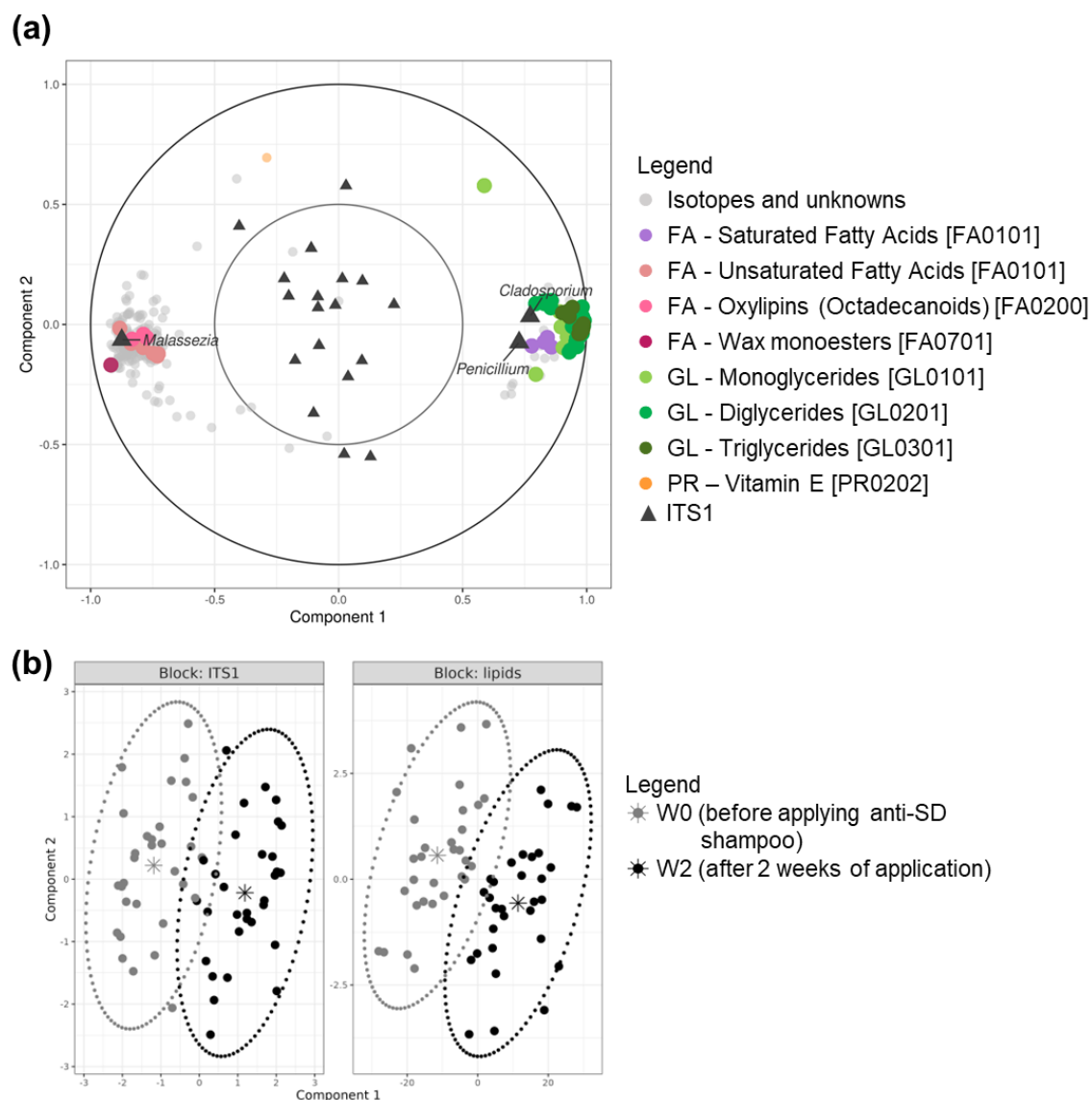


Figure 5 SpiderMass/ITS1 Integration Analysis. (a) Fungi-molecule circle correlation plot.

The DIABLO analysis included metagenomic and lipidomic datasets obtained from the 42 SD subjects at W0 (before application of study product) and W2 (after 2 weeks of study shampoo application) (**Supplementary information S2**). Triangles represent fungi and colored dots represent identified molecules contributing to the construction of the components while the grey dots represent the unidentified molecules from this study. Dots in close proximity to each other, as well as close to the external circular boundaries and of the value 0 of component 2, indicate co-variance of the molecules and fungi. **(b)** Positioning of sample in the fungal (left) and lipid (right) subspaces according to components 1 and 2. DIABLO, Data Integration Analysis for Biomarker discovery using Latent cOmponents; SD, Seborrheic dermatitis; W, Week.

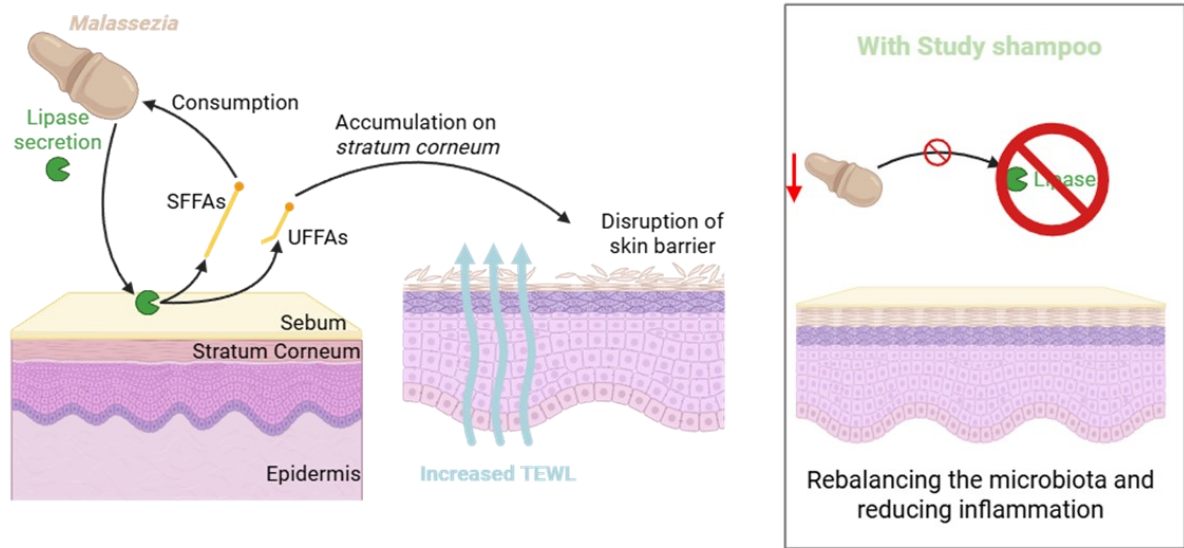


Figure 6 Schematic model illustrating the role of *Malassezia* in seborrheic dermatitis and the effects of the anti-SD shampoo. Lipases secreted by *Malassezia* break down scalp sebum lipids, mainly glycerolipids (mono-, di- and triglycerides), into saturated free fatty acids (SFFA) and unsaturated free fatty acids (UFFA). SFFA are consumed by *Malassezia* as a carbon source, whereas UFFA accumulate on the stratum corneum. This accumulation leads to dysregulation and erythema of the stratum corneum. KelualDS shampoo, which contains ciclopiroxolamine and piroctone olamine, reduces the amount of *Malassezia* present on the scalp and consequently the release of irritating UFFA.

11.11 Annexe 11 : Critères d'éligibilité de RetinoSpider

CRITERES D'INCLUSION

Peuvent être inclus les sujets présentant l'ensemble des critères suivants :

Critères relatifs à la population :

- Femme âgée de 40 à 65 ans inclus
- Sujet ayant donné son consentement écrit à sa participation à l'étude
- Sujet affilié à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime
- Sujet présentant un phototype I, II, III ou IV selon la classification de Fitzpatrick
- Pour les femmes susceptibles de procréer :
 - Utilisation d'une méthode de contraception évaluée comme efficace par le/la technicien.ne de l'étude depuis au moins 1 mois précédant la visite d'inclusion
 - Acceptant de la poursuivre pendant toute la durée de l'étude

Critères relatifs aux pathologies / affections cutanées :

- Sujet ne souffrant d'aucune dermatose sur le visage (hormis des signes de aging et photoaging)

CRITERES DE NON-INCLUSION

Les sujets présentant au moins un des critères suivants ne sont pas inclus :

Critères relatifs à la population :

- Pour les femmes susceptibles de procréer : grossesse ou allaitement.
- Sujet dans l'incapacité linguistique ou psychique de comprendre l'information donnée et de signer le consentement éclairé.
- Sujet privé de liberté par décision judiciaire ou administrative, sous tutelle ou sous curatelle
- Sujet qui, selon l'avis du/de la technicien.ne de recherche clinique, est dans l'incapacité de se conformer aux exigences du protocole
- Sujet participant et/ou ayant participé dans les semaines ou mois précédents ou prévoyant une participation à un autre essai clinique susceptible d'interférer avec l'étude, selon l'avis du/de la technicien.ne de recherche clinique
- Sujet susceptible de représenter un conflit d'intérêts avec un membre de la famille de toute personne impliquée dans la conduite de l'étude (secrétaire, infirmière, technicien, ...) du site investigateur
- Sujet ayant subi une exposition aux UVs artificiels, ou une exposition intense ou prolongée aux UVs naturels au niveau du visage dans les 4 semaines précédant la visite d'inclusion ou prévoyant de l'être pendant l'étude

Critères relatifs aux pathologies / affections cutanées :

- Sujet présentant un érythème solaire sur le visage.
- Sujet présentant un tatouage ou une cicatrice ou tout autre signe dermatologique sur le visage susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur.
- Sujet présentant tout type de complication sur le visage (du type excoriation, infection bactérienne primaire, virale, fongique ou parasitaire, etc.) selon l'avis de l'investigateur.
- Sujet ayant eu une intervention chirurgicale sur le visage, dans les semaines ou les mois précédant susceptible d'interférer avec l'étude selon l'avis de l'investigateur

Critères relatifs aux traitements et/ou aux produits :

- Photothérapie effectuée dans les 4 semaines précédant la visite d'inclusion ou prévu pendant l'étude ;
- Sujet présentant des antécédents connus d'allergie ou d'intolérance à l'un des produits utilisés pour la recherche ;
- Traitement topique au niveau du visage ou oral instauré ou modifié au cours des semaines précédant la visite d'inclusion ou prévu d'être établi ou modifié pendant l'étude, susceptible d'interférer avec l'étude, selon l'avis du/de la technicien.ne de recherche clinique ;
- Application d'un traitement topique sur le visage contenant de l'acide rétinoïque ou dérivés dans les 4 semaines précédant la visite d'inclusion ou prévu pendant l'étude ;
- Prise d'un traitement de rétinoïdes oraux durant les 3 mois précédant le jour de l'inclusion ou prévu durant l'étude ;
- Tout traitement et/ou produit topique appliqué sur le visage après la dernière toilette la veille au soir avant la visite d'inclusion ;
- Eau appliquée sur le visage dans les 8h précédant la visite ;
- Tout produits coiffants pouvant interférer avec l'étude (tels que laque, démêlant, masque, shampoing sec, ...) **après la veille au matin de la visite ;** **Erreur ! Nom de propriété de document inconnu.**

11.12 Annexe 12 : Assignations RetinoSpider

Liste des molécules significativement modulées ($FC_{abs} \geq 1,4$) et identifiées par fragmentation (niveau 1 ou 2) dans l'étude RetinoSpider, comparant le groupe ayant appliqué quotidiennement un produit contenant du RAL au groupe témoin utilisant uniquement la base excipiente, après 8 semaines de traitement. [FA] : Fatty Acyls ; [GL] : Glycerolipids ; [SP] : Sphingolipids ; [ST] : Sterol Lipids ; [OA] : Organic acids and derivatives ; [OC] : Organoheterocyclic compounds ; [OO] : Organic oxygen compounds.

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignment	Formule brute	RAL vs CTL	
						FC	p-value
[FA]	Fatty Acids and Conjugates [FA01]	Hydroxy fatty acids [FA0105]	FA 10:5;O		C10H10O3	3.58	0.036
	Fatty esters [FA07]	Wax monoesters [FA0701]	WE 28:0 : WE(14:0/14:0) ; WE(12:0/16:0)		C28H56O2	1.49	0.035
			WE 40:3 : WE(24:2/16:1)		C40H74O2	-1.48	0.021
			WE 40:4 : WE(24:3/16:1) ; WE(16:3/24:1)		C40H72O2	-1.44	0.034
			WE 41:1 : WE(24:0/16:1)		C41H80O2	-1.40	0.021
			WE 41:2 : WE(23:1/18:1)		C41H78O2	-1.41	0.024
			WE 41:3 : WE(25:2/16:1)		C41H76O2	-1.47	0.022
			WE 42:2 : WE(24:1/18:1) ; WE(24:0/18:2) WE(26:1/16:1)		C42H80O2	-1.51	0.019
			WE 42:3 : WE(24:2/18:1) ; WE(22:0/20:3) ; WE(24:1/18:2) WE(24:0/18:3)		C42H78O2	-1.56	0.017
			WE 43:2 : WE(27:1/16:1)		C43H82O2	-1.41	0.027
[GL]	Monoradylglycerols [GL01]	Monoacylglycerols [GL0101]	MG 14:0		C17H34O4	-1.41	0.023
	Diradylglycerols [GL02]	Diacylglycerols [GL0201]	MG 16:1		C19H36O4	-1.49	0.016
			DG 38:4 : DG(18:2_20:2) ; DG(16:2_22:2)		C41H72O5	-1.49	0.021
			DG 39:1 : DG(15:1_24:0) ; DG(18:1_21:0)		C42H80O5	-1.40	0.045
			DG 40:0 : DG(16:0_24:0) ; DG(18:0_22:0)		C43H84O5	-1.43	0.031
			DG 40:1 : DG(16:1_24:0) ; DG(18:1_22:0) ; DG(15:1_25:0)		C43H82O5	-1.46	0.031
			DG 41:1 : DG(16:1_25:0) ; DG(18:1_23_0) ; DG(17:1_24:0) ; DG(19:1_26:0)		C44H84O5	-1.41	0.042
			DG 42:0 : DG(16:0_26:0) ; DG(18:0_24:0) ; DG(19:0_23:0) ; DG(17:0_25:0) ; DG(15:0_27:0)		C45H88O5	-1.42	0.034
			DG 42:1 : DG(18:1_24:0)		C45H86O5	-1.46	0.034
			DG 44:1 : DG(21:1_23:0)		C47H90O5	-1.42	0.034

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignation	Formule brute	RAL vs CTL	
						FC	p-value
[GL]	Triradylglycerols [GL03]	Triacylglycerols [GL0301]		TG 48:0 : TG(16:0_16:0_16:0)	C51H98O6	-1.46	0.046
				TG 48:1 : TG(16:0_16:0_16:1) ; TG(14:0_16:0_18:1)	C51H96O6	-1.44	0.044
				TG 48:2 : TG(16:0_16:1_16:1) ; TG(14:0_16:1_18:1)	C51H94O6	-1.46	0.034
				TG 48:3 : TG(16:1_16:1_16:1)	C51H92O6	-1.40	0.043
				TG 49:0 : TG(16:0_16:0_17:0) ; TG(15:0_17:0_17:0)	C52H100O6	-1.47	0.042
				TG 49:1 : TG(16:0_16:0_17:1) ; TG(16:0_16:1_17:0) ; TG(15:0_16:0_18:1) ; TG(15:0_16:1_18:0) ; TG(14:0_17:0_18:1) ; TG(14:0_17:1_18:0) ; TG(15:1_16:0_18:0) ; TG(14:0_16:1_19:0) ; TG(14:0_16:0_19:1) ; TG(15:0_17:0_17:1) ; TG(15:1_17:0_17:0) ; TG(14:0_15:1_20:1)	C52H98O6	-1.46	0.040
				TG 49:2 : TG(15:0_16:1_18:1) ; TG(15:0_17:1_17:1)	C52H96O6	-1.45	0.039
				TG 49:3 : TG(16:1_16:1_17:1)	C52H94O6	-1.41	0.041
				TG 50:0 : TG(16:0_16:0_18:0) ; TG(15:0_17:0_18:0) ; TG(15:0_16:0_19:0) ; TG(15:0_15:0_20:0)	C53H102O6	-1.40	0.045
				TG 50:2 : TG(16:0_16:1_18:1) ; TG(16:0_16:1_18:2)	C53H98O6	-1.45	0.028
				TG 50:3 : TG(16:1_16:1_18:1) ; TG(16:0_16:1_18:2)	C53H96O6	-1.44	0.027
				TG 50:4 : TG(16:1_16:1_18:2) ; TG(16:0_16:1_18:3)	C53H94O6	-1.40	0.039
				TG 51:0 : TG(14:0_17:0_20:0) ; TG(14:0_18:0_19:0) ; TG(15:0_17:0_19:0) ; TG(15:0_18:0_18:0)	C54H102O6	-1.46	0.038
				TG 51:1 : TG(16:0_17:0_18:1)	C54H100O6	-1.46	0.036
				TG 51:2 : TG(15:0_18:1_18:1) ; TG(16:0_17:1_18:1) ; TG(16:1_17:0_18:1) ; TG(17:0_17:1_17:1)	C54H98O6	-1.44	0.038
				TG 51:3 : TG(15:0_18:1_18:2) ; TG(16:1_17:1_18:1)	C54H96O6	-1.45	0.034
				TG 51:4	C54H94O6	-1.41	0.045
				TG 53:3 : TG(17:0_18:1_18:2) ; TG(17:0_17:1_19:2) ; TG(16:1_18:2_19:0) ; TG(15:0_19:1_19:2) ; TG(14:0_19:0_20:3)	C56H102O6	-1.42	0.043
				TG 58:1	C61H116O6	-1.44	0.036
				TG 60:1	C63H120O6	-1.43	0.043
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	Sphing-4-enines (Sphingosines) [SP0101]	[S]	SPB 18:1;O2 (Sphingosine)	C18H37NO2	1.46	0.044
		Sphinganines [SP0102]	[DS]	SPB 18:0;O2 (Dihydrosphingosine)	C18H39NO2	1.41	0.038

Catégories	Classes Principales	Sous-Classes	Familles	Assignation	Formule brute	RAL vs CTL	
						FC	p-value
[SP]	Sphingoid bases [SP01]	Sphingoid base homologs and variants [SP0104]	[DS]	SPB 21:0;O2	C21H45NO2	1.50	0.018
				SPB 22:0;O2	C22H47NO2	1.82	0.021
				SPB 23:0;O2	C23H49NO2	1.44	0.047
			[H]	SPB 18:1;O3 (6-hydroxysphingosine)	C18H37NO3	1.40	0.043
			[P]	SPB 20:0;O3	C20H43NO3	1.49	0.042
	Ceramides [SP02]	N-acylsphingosines (ceramides) [SP0201]	[NS]	Cer 41:1;O2 : Cer(17:1;O2/24:0) ; Cer(18:1;O2/23:0)	C41H81NO3	-1.43	0.019
			[AS]	Cer 34:1;O3 : Cer(18:1;O2/16:0;O)	C34H67NO4	1.51	0.007
		N-acylsphinganines (dihydroceramides) [SP0202]	[NDS]	Cer 44:0;O2 : Cer(20:0;O2/24:0)	C44H89NO3	1.40	0.034
				Cer 46:0;O2 : Cer(22:0;O2/24:0)	C46H93NO3	1.41	0.035
			[ADS]	Cer 48:0;O3 : Cer(22:0;O3/26:0)	C48H97NO4	1.48	0.034
		N-acyl-4-hydroxysphinganines (phytoceramides) [SP0203]	[NP]	Cer 46:0;O3 : Cer(22:0;O3/24:0) ; Cer(20:0;O3/26:0)	C46H93NO4	1.48	0.042
			[AP]	Cer 44:0;O4 : Cer(18:0;O3/26:0;O)	C44H89NO5	1.42	0.037
				Cer 46:0;O4 : Cer(22:0;O3/24:0;O) ; Cer(20:0;O3/26:0;O)	C46H93NO5	1.45	0.032
[ST]	Sterols [ST01]	Cholesterol and derivatives [ST0101]		ST 30:2;O2 : 32-hydroxylanosterol	C30H50O2	1.41	0.004
		Steryl esters [ST0102]		CE 17:0	C44H78O2	-1.40	0.016
	Secosteroids [ST03]	Vitamin D3 and derivatives [ST0302]	25-hydroxyvitamin D3 (Calcidiol)		C27H44O2	1.54	0.025
			Tachysterol3 (Prévitamine D3)		C27H44O	1.41	0.034
[OA]	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	L-alpha-amino acids	Glutamine	C5H10N2O3	1.54	0.034
			Proline and derivatives	Proline	C5H9NO2	1.41	0.047
			Dipeptides	Gly-Pro	C7H12N2O3	1.53	0.034
				His-Pro	C11H16N4O3	1.55	0.032
				Val-Pro	C10H18N2O3	1.48	0.004
				Val-Ser	C8H16N2O4	1.47	0.016
[OC]	Indoles and derivatives	Adrenochrome o-semiquinone		C8H6O4	2.15	0.047	
		Indoles		Indoleacrylic acid	C11H9NO2	1.41	0.032
		Indolyl carboxylic acids and derivatives		Indolelactic acid	C9H10NO3	1.47	0.045
[OO]	Organoxygen compounds	Carbonyl compounds	P-benzoquinones	Benzoquinoneacetic acid	C8H6O4	2.34	0.047

11.13 Annexe 13 : Protocole de mise en culture des bactéries cutanées : *C. acnes*, *S. aureus* et *S. epidermidis*

1. Mise en suspension de 1 pastille de bactéries dans 9ml de diluant Ph Eur ([Ref. AX011144 VWR](#)) préalablement chauffé à 37°C. Attendre jusqu'à solubilisation complète de la pastille soit environ 30min à 37°C sous agitation.
2. Ensemencer par étalement à l'aide d'une cœse de 10µL sur géloses :
 - Trypticase soja ([Ref. 43011 BioMérieux](#)) pour *S. epidermidis* et *S. aureus*
 - Columbia au sang ([Ref. 43041 BioMérieux](#)) pour *C. acnes*
3. Après étalement sur géloses :
 - Incubation à 35°C pendant 24h pour *S. aureus*
 - Incubation à 35°C d'au moins 48h-72h pour *S. epidermidis*.
 - Incubation à 35°C pendant 72h pour *C. acnes* en anaérobiose grâce à un sachet GenBag ([Ref.45534 BioMérieux](#)) avec générateur d'anaérobiose.

NB : mettre les géloses couvercles vers le bas dans l'incubateur.

4. Étaler sur un papier à cigarettes plusieurs colonies de manière à obtenir un dépôt d'environ 1cm²

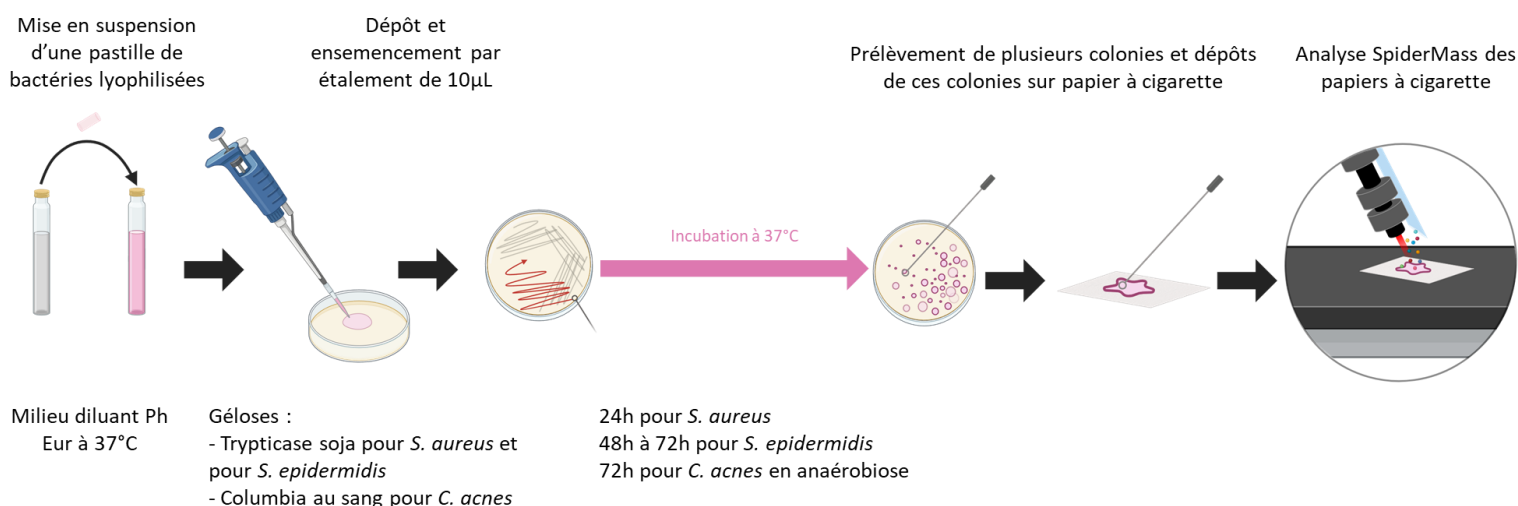


Figure 56 : Protocole de mise en culture et d'analyse des souches de bactérie lyophilisée au SpiderMass

12 Bibliographie

1. Agrawal, K. *et al.* Effects of atopic dermatitis and gender on sebum lipid mediator and fatty acid profiles. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **134**, 7–16 (2018).
2. Ni Raghallaigh, S., Bender, K., Lacey, N., Brennan, L. & Powell, F. C. The fatty acid profile of the skin surface lipid layer in papulopustular rosacea. *Br. J. Dermatol.* **166**, 279–287 (2012).
3. Smeden, J. van & Bouwstra, J. A. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Skin Barrier Funct.* **49**, 8–26 (2016).
4. Berkenkamp, S., Karas, M. & Hillenkamp, F. Ice as a matrix for IR-matrix-assisted laser desorption/ionization: mass spectra from a protein single crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7003–7007 (1996).
5. Leisner, A., Rohlfing, A., Berkenkamp, S., Hillenkamp, F. & Dreisewerd, K. Infrared laser post-ionization of large biomolecules from an IR-MALD(I) plume. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 934–941 (2004).
6. Witt, L. *et al.* Water ice is a soft matrix for the structural characterization of glycosaminoglycans by infrared matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal. Chem.* **86**, 6439–6446 (2014).
7. Fatou, B. *et al.* In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application. *Sci. Rep.* **6**, 25919 (2016).
8. The Nobel Prize in Physics 1906. *NobelPrize.org*
<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1906/summary/>.
9. The Nobel Prize in Chemistry 1922. *NobelPrize.org*
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1922/summary/>.
10. Squires, G. Francis Aston and the mass spectrograph. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3893–3900 (1998) doi:10.1039/A804629H.
11. Karas, Michael., Bachmann, Doris. & Hillenkamp, Franz. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **57**, 2935–2939 (1985).

12. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459 (1984).
13. Verenchikov, A. N., Krasnov, N. V. & Shkurov, V. A. Electrospray ionization developed by Lidija Gall's group. *Int. J. Mass Spectrom.* **490**, 117067 (2023).
14. Cooks, R. G., Ouyang, Z., Takats, Z. & Wiseman, J. M. Ambient Mass Spectrometry. *Science* **311**, 1566–1570 (2006).
15. Takáts, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B. & Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* **306**, 471–473 (2004).
16. Cody, R. B., Laramée, J. A. & Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **77**, 2297–2302 (2005).
17. Griffiths, J. A brief history of mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 5678–5683 (2008).
18. Horning, E. C. *et al.* Atmospheric Pressure Ionization (API) Mass Spectrometry. Solvent-Mediated Ionization of Samples Introduced in Solution and in a Liquid Chromatograph Effluent Stream. *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 725–729 (1974).
19. Hoffmann, E. de & Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. (John Wiley & Sons, 2007).
20. Byrdwell, W. C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* **36**, 327–346 (2001).
21. Cody, R. B., Laramée, J. A., Nilles, J. M. & Durst, H. D. Direct Analysis in Real Time (DARTtm) Mass Spectrometry. **36**, (2001).
22. Sekimoto, K. Chapter 2 - Direct analysis in real time. in *Ambient Ionization Mass Spectrometry in Life Sciences* (ed. Zaitsev, K.) 33–75 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-817220-9.00002-3.
23. Wang, Y. Recent advances in the application of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in food analysis. *Food Res. Int.* **188**, 114488 (2024).
24. Wang, Y. & Liu, S. Recent application of direct analysis in real time mass spectrometry in plant materials analysis with emphasis on traditional Chinese herbal medicine. *Mass Spectrom. Rev.* **43**, 1150–1171 (2024).

25. Sharma, B. & Gadi, R. Analytical Tools and Methods for Explosive Analysis in Forensics: A Critical Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **55**, 251–277 (2025).
26. Venter, A. R. Protein analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1**, (2024).
27. Morato, N. M. & Cooks, R. G. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry: 20 Years. *Acc. Chem. Res.* **56**, 2526–2536 (2023).
28. Mondal, S. & Banerjee, S. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging for Cancer Diagnosis. in *Biochemical and Biophysical Methods in Molecular and Cellular Biology* (ed. Tripathy, U.) 219–255 (Springer Nature, Singapore, 2025). doi:10.1007/978-981-96-2088-3_9.
29. Nguyen, S. N., Liyu, A. V., Chu, R. K., Anderton, C. R. & Laskin, J. Constant-Distance Mode Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging of Biological Samples with Complex Topography. *Anal. Chem.* **89**, 1131–1137 (2017).
30. Nguyen, S. N. *et al.* Towards High-Resolution Tissue Imaging Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Coupled to Shear Force Microscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **29**, 316–322 (2018).
31. Jiang, L.-X. *et al.* Nanospray Desorption Electrospray Ionization (Nano-DESI) Mass Spectrometry Imaging with High Ion Mobility Resolution. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **34**, 1798–1804 (2023).
32. Iqfath, M., Wali, S. N., Amer, S., Hernly, E. & Laskin, J. Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (nano-DESI MSI): A Tutorial Review. *ACS Meas. Sci. Au* **4**, 475–487 (2024).
33. Venter, A. & Cooks, R. G. Desorption Electrospray Ionization in a Small Pressure-Tight Enclosure. *Anal. Chem.* **79**, 6398–6403 (2007).
34. Bereman, M. S., Nyadong, L., Fernandez, F. M. & Muddiman, D. C. Direct high-resolution peptide and protein analysis by desorption electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3409–3411 (2006).
35. Sampson, J. S., Hawkrigde, A. M. & Muddiman, D. C. Generation and Detection of Multiply-Charged Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization

- (MALDESI) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1712–1716 (2006).
36. Nemes, P. & Vertes, A. Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure molecular imaging mass spectrometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **656**, 159–171 (2010).
 37. Li, Y., Shrestha, B. & Vertes, A. Atmospheric Pressure Molecular Imaging by Infrared MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 523–532 (2007).
 38. Sampson, J. S., Murray, K. K. & Muddiman, D. C. Intact and top-down characterization of biomolecules and direct analysis using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization coupled to FT-ICR mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 667–673 (2009).
 39. Sampson, J. S., Hawkridge, A. M. & Muddiman, D. C. Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1712–1716 (2006).
 40. Li, H., Smith, B. K., Shrestha, B., Márk, L. & Vertes, A. Automated Cell-by-Cell Tissue Imaging and Single-Cell Analysis for Targeted Morphologies by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. in *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules* (ed. He, L.) 117–127 (Springer, New York, NY, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-1357-2_12.
 41. Eisenberg, S. M., Joignant, A. N., Knizner, K. T., Manni, J. G. & Muddiman, D. C. Obtaining 20 µm Spatial Resolution with a 2940 nm Laser by IR-MALDESI Mass Spectrometry Imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **35**, 2942–2949 (2024).
 42. Harper, J. D. *et al.* Low-Temperature Plasma Probe for Ambient Desorption Ionization. *Anal. Chem.* **80**, 9097–9104 (2008).
 43. Jackson, A. U. *et al.* Analysis of drugs of abuse in biofluids by low temperature plasma (LTP) ionization mass spectrometry. *Analyst* **135**, 927–933 (2010).
 44. Wiley, J. S. *et al.* Screening of agrochemicals in foodstuffs using low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Analyst* **135**, 971–979 (2010).

45. Beneito-Cambra, M., Pérez-Ortega, P., Molina-Díaz, A. & García-Reyes, J. F. Rapid determination of multiclass fungicides in wine by low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Anal. Methods* **7**, 7345–7351 (2015).
46. Torres-Ortega, R. *et al.* In Vivo Low-Temperature Plasma Ionization Mass Spectrometry (LTP-MS) Reveals Regulation of 6-Pentyl-2H-Pyran-2-One (6-PP) as a Physiological Variable during Plant-Fungal Interaction. *Metabolites* **12**, 1231 (2022).
47. Song, Y., Talaty, N., Datsenko, K., Wanner, B. L. & Cooks, R. G. In vivo recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analyst* **134**, 838–841 (2009).
48. Nemes, P. & Vertes, A. Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure, in Vivo, and Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 8098–8106 (2007).
49. Stolee, J. A. & Vertes, A. Toward Single-Cell Analysis by Plume Collimation in Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 3592–3598 (2013).
50. Takáts, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B. & Cooks, R. G. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* **306**, 471–473 (2004).
51. Chen, C.-H. *et al.* Development of a Mass Spectrometry Sampling Probe for Chemical Analysis in Surgical and Endoscopic Procedures. *Anal. Chem.* **85**, 11843–11850 (2013).
52. Schäfer, K.-C. *et al.* In vivo, in situ tissue analysis using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 8240–8242 (2009).
53. Schäfer, K.-C. *et al.* Real Time Analysis of Brain Tissue by Direct Combination of Ultrasonic Surgical Aspiration and Sonic Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 7729–7735 (2011).
54. Balog, J. *et al.* Identification of Biological Tissues by Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 7343–7350 (2010).
55. Marcus, D. *et al.* Point-of-Care Diagnosis of Endometrial Cancer Using the Surgical Intelligent Knife (iKnife)—A Prospective Pilot Study of Diagnostic Accuracy. *Cancers* **14**, 5892 (2022).
56. Phelps, D. L. *et al.* The use of biomarkers to stratify surgical care in women with ovarian cancer. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **129**, e66–e74 (2022).

57. Manoli, E. *et al.* Validation of Ultrasonic Harmonic Scalpel for Real-Time Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **93**, 5906–5916 (2021).
58. Fatou, B. *et al.* In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application. *Sci. Rep.* **6**, 25919 (2016).
59. Ogrinc, N. *et al.* Water-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for minimally invasive in vivo and real-time surface analysis using SpiderMass. *Nat. Protoc.* **14**, 3162–3182 (2019).
60. Fatou, B. *et al.* Remote Atmospheric Pressure Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry (Remote IR-MALDI MS) of Proteins. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **17**, 1637–1649 (2018).
61. Ogrinc, N. *et al.* Fast Cancer Molecular Diagnosis from FFPE Tissues Based on Metabolic Profiles Using SpiderMass Technology. SSRN Scholarly Paper at <https://doi.org/10.2139/ssrn.3732373> (2020).
62. Ogrinc, N. *et al.* Sarcoma Molecular Pathological Diagnosis of FFPE Tissues without Dewaxing based on Lipidomic Profiles using SpiderMass Technology. Preprint at <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-157940/v1> (2021).
63. Ogrinc, N. *et al.* Mass Spectrometry-Based Differentiation of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma and Nontumor Regions With the SpiderMass Technology. *Front. Oral Health* **3**, (2022).
64. Saudemont, P. *et al.* Real-Time Molecular Diagnosis of Tumors Using Water-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Technology. *Cancer Cell* **34**, 840-851.e4 (2018).
65. Zhang, J. *et al.* Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
66. Sans, M. *et al.* Performance of the MasSpec Pen for Rapid Diagnosis of Ovarian Cancer. *Clin. Chem.* **65**, 674–683 (2019).
67. Brown, H. M., Pirro, V. & Cooks, R. G. From DESI to the MasSpec Pen: Ambient Ionization Mass Spectrometry for Tissue Analysis and Intrasurgical Cancer Diagnosis. *Clin. Chem.* **64**, 628–630 (2018).

68. Heiles, S. Advanced tandem mass spectrometry in metabolomics and lipidomics—methods and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **413**, 5927–5948 (2021).
69. Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 451–459 (2016).
70. Han, X. Lipidomics for studying metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 668–679 (2016).
71. Mattoli, L., Gianni, M. & Burico, M. Mass spectrometry-based metabolomic analysis as a tool for quality control of natural complex products. *Mass Spectrom. Rev.* **42**, 1358–1396 (2023).
72. Cao, G. *et al.* Large-scale targeted metabolomics method for metabolite profiling of human samples. *Anal. Chim. Acta* **1125**, 144–151 (2020).
73. Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 473–484 (2016).
74. Sadowski, T. *et al.* Large-scale human skin lipidomics by quantitative, high-throughput shotgun mass spectrometry. *Sci. Rep.* **7**, 43761 (2017).
75. Johnson, A. R. & Carlson, E. E. Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation. *Anal. Chem.* **87**, 10668–10678 (2015).
76. Zhou, Z. *et al.* Ion mobility collision cross-section atlas for known and unknown metabolite annotation in untargeted metabolomics. *Nat. Commun.* **11**, 4334 (2020).
77. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J.-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063–1072 (2008).
78. Nemes, Z. & Steinert, P. M. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* **31**, 5–19 (1999).
79. Yardley, H. J. & Summerly, R. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol. Ther.* **13**, 357–383 (1981).
80. Duplan, H. & Nocera, T. [Skin hydration and hydrating products]. *Ann. Dermatol. Venereol.* **145**, 376–384 (2018).
81. Sütterlin, T., Tsingos, E., Bensaci, J., Stamatias, G. N. & Grabe, N. A 3D self-organizing multicellular epidermis model of barrier formation and hydration with realistic cell morphology based on EPISIM. *Sci. Rep.* **7**, 43472 (2017).

82. Schürer, N. pH and Acne. *Curr. Probl. Dermatol.* **54**, 115–122 (2018).
83. Yazdanparast, T. *et al.* Comparison of biophysical, biomechanical and ultrasonographic properties of skin in chronic dermatitis, psoriasis and lichen planus. *Med. J. Islam. Repub. Iran MJIRI* **32**, 630–634 (2018).
84. Cundell, A. M. Microbial Ecology of the Human Skin. *Microb. Ecol.* **76**, 113–120 (2018).
85. Chen, Y. E. & Tsao, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. *J. Am. Acad. Dermatol.* **69**, 143-155.e3 (2013).
86. Schuessler, M., Astecker, N., Herzig, G., Vorisek, G. & Schuster, I. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids* **66**, 399–408 (2001).
87. Boncheva, M. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* **36**, 505–515 (2014).
88. Becam, J. *et al.* Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic *Neisseria*. *Sci. Rep.* **7**, 17627 (2017).
89. Wertz, P. W. Lipids and the Permeability and Antimicrobial Barriers of the Skin. *J. Lipids* **2018**, e5954034 (2018).
90. Knox, S. & O'Boyle, N. M. Skin lipids in health and disease: A review. *Chem. Phys. Lipids* **236**, 105055 (2021).
91. Knox, S. & O'Boyle, N. M. Skin lipids in health and disease: A review. *Chem. Phys. Lipids* **236**, 105055 (2021).
92. 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. *J. Lipid Res.* **61**, 884–895 (2020).
93. Školová, B., Kováčik, A., Tesař, O., Opálka, L. & Vávrová, K. Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1859**, 824–834 (2017).
94. Li, Q., Fang, H., Dang, E. & Wang, G. The role of ceramides in skin homeostasis and inflammatory skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* **97**, 2–8 (2020).

95. Rerek, M. E. *et al.* Phytosphingosine and Sphingosine Ceramide Headgroup Hydrogen Bonding: Structural Insights through Thermotropic Hydrogen/Deuterium Exchange. *J. Phys. Chem. B* **105**, 9355–9362 (2001).
96. Guo, S., Moore, T. C., Iacovella, C. R., Strickland, L. A. & McCabe, C. Simulation Study of the Structure and Phase Behavior of Ceramide Bilayers and the Role of Lipid Headgroup Chemistry. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 5116–5126 (2013).
97. Školová, B. *et al.* Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **29**, 15624–15633 (2013).
98. De Luca, C. & Valacchi, G. Surface Lipids as Multifunctional Mediators of Skin Responses to Environmental Stimuli. *Mediators Inflamm.* **2010**, e321494 (2010).
99. Pappas, A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* **1**, 72–76 (2009).
100. Smith, K. R. & Thiboutot, D. M. Thematic review series: Skin Lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid Res.* **49**, 271–281 (2008).
101. Lovászi, M., Szegedi, A., Zouboulis, C. C. & Törőcsik, D. Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermatoendocrinol.* **9**, e1375636 (2017).
102. Radner, F. P. W. & Fischer, J. The important role of epidermal triacylglycerol metabolism for maintenance of the skin permeability barrier function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 409–415 (2014).
103. Yen, C.-L. E., Brown, C. H., Monetti, M. & Farese, R. V. A human skin multifunctional O-acyltransferase that catalyzes the synthesis of acylglycerols, waxes, and retinyl esters. *J. Lipid Res.* **46**, 2388–2397 (2005).
104. Nicolaides, N., Fu, H. C., Ansari, M. N. A. & Rice, G. R. The fatty acids of wax esters and sterol esters from vernix caseosa and from human skin surface lipid. *Lipids* **7**, 506–517 (1972).
105. Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E. & Mastrofrancesco, A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol.* **1**, 68–71 (2009).
106. 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. *J. Lipid Res.* **51**, 3377–3388 (2010).

107. Pham, D.-M., Boussouira, B., Moyal, D. & Nguyen, Q. I. Oxidization of squalene, a human skin lipid: a new and reliable marker of environmental pollution studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* **37**, 357–365 (2015).
108. Chapman, A. C. XC.—Spinacene: its oxidation and decomposition. *J. Chem. Soc. Trans.* **123**, 769–779 (1923).
109. Passi, S., De Pità, O., Puddu, P. & Littarru, G. P. Lipophilic antioxidants in human sebum and aging. *Free Radic. Res.* **36**, 471–477 (2002).
110. Riethmuller, C. *et al.* Filaggrin breakdown products determine corneocyte conformation in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1573-1580.e2 (2015).
111. Newsholme, E. A., Crabtree, B. & Ardawi, M. S. M. Glutamine Metabolism in Lymphocytes: Its Biochemical, Physiological and Clinical Importance. *Q. J. Exp. Physiol.* **70**, 473–489 (1985).
112. Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R. & Newsholme, P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients* **10**, 1564 (2018).
113. Koivukangas, V. *et al.* Increased collagen synthesis in psoriasis in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 171–175 (1995).
114. Seo, S.-K. & Kwon, B. Immune regulation through tryptophan metabolism. *Exp. Mol. Med.* **55**, 1371–1379 (2023).
115. Wlodarska, M. *et al.* Indoleacrylic Acid Produced by Commensal Peptostreptococcus Species Suppresses Inflammation. *Cell Host Microbe* **22**, 25-37.e6 (2017).
116. Yu, J. *et al.* A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 2108-2119.e12 (2019).
117. Branco, A. C. C. C., Yoshikawa, F. S. Y., Pietrobon, A. J. & Sato, M. N. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2018**, e9524075 (2018).
118. Bikle, D. D. Vitamin D: Newer Concepts of Its Metabolism and Function at the Basic and Clinical Level. *J. Endocr. Soc.* **4**, bvz038 (2020).

119. Packer, L., Weber, S. U. & Thiele, J. J. Sebaceous Gland Secretion is a Major Physiologic Route of Vitamin E Delivery to Skin. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 1006–1010 (1999).
120. Thiele, J. J. & Ekanayake-Mudiyanselage, S. Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol. Aspects Med.* **28**, 646–667 (2007).
121. Heath, C. R. & Usatine, R. P. Seborrheic dermatitis. *J. Fam. Pract.* **70**, E3–E4 (2021).
122. Quéréux, G. Dermatite séborrhéique. *EMC - Dermatol.-Cosmétologie* **2**, 147–159 (2005).
123. Palamaras, I., Kyriakis, K. p. & Stavrianeas, N. g. Seborrheic dermatitis: lifetime detection rates. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **26**, 524–526 (2012).
124. Sanders, M. G. H., Pardo, L. M., Franco, O. H., Ginger, R. S. & Nijsten, T. Prevalence and determinants of seborrhoeic dermatitis in a middle-aged and elderly population: the Rotterdam Study. *Br. J. Dermatol.* **178**, 148–153 (2018).
125. Tucker, D. & Masood, S. Seborrheic Dermatitis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
126. Gordon James, A., Abraham, K. H., Cox, D. S., Moore, A. E. & Pople, J. E. Metabolic analysis of the cutaneous fungi *Malassezia globosa* and *M. restricta* for insights on scalp condition and dandruff. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 169–175 (2013).
127. Park, M., Park, S. & Jung, and W. H. Skin Commensal Fungus *Malassezia* and Its Lipases. *J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 637–644 (2021).
128. Vijayaraghavan, S. *et al.* Relationship between scalp histamine levels and dandruff within an Indian population: A confirmation study using LC/MS/MS method. *Exp. Dermatol.* **31**, 814–818 (2022).
129. Ambaw, Y. A. *et al.* Host/*Malassezia* Interaction: A Quantitative, Non-Invasive Method Profiling Oxylipin Production Associates Human Skin Eicosanoids with *Malassezia*. *Metabolites* **11**, 700 (2021).
88. Rousel, J. *et al.* Lesional skin of seborrheic dermatitis patients is characterized by skin barrier dysfunction and correlating alterations in the stratum corneum ceramide composition. *Exp. Dermatol.* **1**, e14952 (2024).

131. Kamamoto, C. S. L. *et al.* Cutaneous fungal microbiome: *Malassezia* yeasts in seborrheic dermatitis scalp in a randomized, comparative and therapeutic trial. *Dermatoendocrinol.* **9**, e1361573 (2017).
132. Langan, S. M., Irvine, A. D. & Weidinger, S. Atopic dermatitis. *The Lancet* **396**, 345–360 (2020).
133. Løset, M., Brown, S. J., Saunes, M. & Hveem, K. Genetics of Atopic Dermatitis: From DNA Sequence to Clinical Relevance. *Dermatology* **235**, 355–364 (2019).
134. Palmer, C. N. A. *et al.* Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* **38**, 441–446 (2006).
135. Smits, J. P. H. *et al.* Targeting the Cutaneous Microbiota in Atopic Dermatitis by Coal Tar via AHR-Dependent Induction of Antimicrobial Peptides. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 415–424.e10 (2020).
136. Kim, B. E. *et al.* Side-by-Side Comparison of Skin Biopsies and Skin Tape Stripping Highlights Abnormal Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 2387–2389.e1 (2019).
137. Imokawa, G. *et al.* Decreased Level of Ceramides in Stratum Corneum of Atopic Dermatitis: An Etiologic Factor in Atopic Dry Skin? *J. Invest. Dermatol.* **96**, 523–526 (1991).
138. Matsumoto, M., Umemoto, N., Sugiura, H. & Uehara, M. Difference in Ceramide Composition between ‘Dry’ and ‘Normal’ Skin in Patients with Atopic Dermatitis. | EBSCOhost. vol. 79 246 (1999).
139. Berdyshev, E. *et al.* Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI Insight* **3**, e98006 (2014).
140. Janssens, M. *et al.* Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* **53**, 2755–2766 (2012).
141. Park, Y.-H. *et al.* Decrease of Ceramides with Very Long-Chain Fatty Acids and Downregulation of Elongases in a Murine Atopic Dermatitis Model. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 476–9 (2011).

142. Danso, M. *et al.* Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition. *J. Dermatol. Sci.* **88**, 57–66 (2017).
143. Shen, C.-P. *et al.* Skin Ceramide Profile in Children With Atopic Dermatitis. *Dermatitis* **29**, 219–222 (2018).
144. Ishikawa, J. *et al.* Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *Journal of Investigative Dermatology* **130**, 2511–2514 (2010).
145. Joo, K.-M. *et al.* Relationship of ceramide–, and free fatty acid–cholesterol ratios in the stratum corneum with skin barrier function of normal, atopic dermatitis lesional and non-lesional skins. *J. Dermatol. Sci.* **77**, 71–74 (2015).
146. Yokose, U. *et al.* The ceramide [NP]/[NS] ratio in the stratum corneum is a potential marker for skin properties and epidermal differentiation. *BMC Dermatol.* **20**, 6 (2020).
147. Kim, J. *et al.* Alterations of Epidermal Lipid Profiles and Skin Microbiome in Children With Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **15**, 186–200 (2023).
148. Toncic, R. J. *et al.* Altered Levels of Sphingosine, Sphinganine and Their Ceramides in Atopic Dermatitis Are Related to Skin Barrier Function, Disease Severity and Local Cytokine Milieu. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1958 (2020).
149. Grice, E. A. & Segre, J. A. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 244–253 (2011).
150. Shi, B. *et al.* The skin microbiome is different in pediatric versus adult atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1233–1236 (2016).
151. Mohammad, S. *et al.* Atopic dermatitis: Pathophysiology, microbiota, and metabolome – A comprehensive review. *Microbiol. Res.* **281**, 127595 (2024).
152. Fyhrquist, N. *et al.* Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat. Commun.* **10**, 4703 (2019).
153. Alexander, H. *et al.* The role of bacterial skin infections in atopic dermatitis: expert statement and review from the International Eczema Council Skin Infection Group. *Br. J. Dermatol.* **182**, 1331–1342 (2020).

154. Clausen, M.-L. *et al.* Association of Disease Severity With Skin Microbiome and Filaggrin Gene Mutations in Adult Atopic Dermatitis. *JAMA Dermatol.* **154**, 293–300 (2018).
155. Williams, M. R., Nakatsuji, T., Sanford, J. A., Vrbanc, A. F. & Gallo, R. L. *Staphylococcus aureus* Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 377–384 (2017).
156. Berube, B. J. & Wardenburg, J. B. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins* **5**, 1140–1166 (2013).
157. Nakatsuji, T. *et al.* Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaah4680 (2017).
158. Iwase, T. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* **465**, 346–349 (2010).
159. Rademacher, F. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Activates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in Human Keratinocytes: Implications for Cutaneous Defense. *J. Innate Immun.* **11**, 125–135 (2018).
160. Liu, Q. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Contributes to Healthy Maturation of the Nasal Microbiome by Stimulating Antimicrobial Peptide Production. *Cell Host Microbe* **27**, 68-78.e5 (2020).
161. Ommori, R. *et al.* Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microb. Pathog.* **56**, 35–39 (2013).
162. Chng, K. R. *et al.* Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. *Nat. Microbiol.* **1**, 1–10 (2016).
163. Simanski, M., Erkens, A.-S., Rademacher, F. & Harder, J. *Staphylococcus epidermidis*-induced Interleukin-1 Beta and Human Beta-defensin-2 Expression in Human Keratinocytes is Regulated by the Host Molecule A20 (TNFAIP3). *Acta Derm. Venereol.* **99**, 181–187 (2019).
164. Ochlich, D., Rademacher, F., Drerup, K. A., Gläser, R. & Harder, J. The influence of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis* on the epidermal barrier and inflammation: Implications for atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* **32**, 555–561 (2023).

165. Cau, L. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* protease EcpA can be a deleterious component of the skin microbiome in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **147**, 955-966.e16 (2021).
166. Williams, M. R. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* activates keratinocyte cytokine expression and promotes skin inflammation through the production of phenol-soluble modulins. *Cell Rep.* **42**, (2023).
167. Totté, J. E. E. *et al.* Nasal and skin microbiomes are associated with disease severity in paediatric atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **181**, 796–804 (2019).
168. Bjerre, R. D. *et al.* Skin dysbiosis in the microbiome in atopic dermatitis is site-specific and involves bacteria, fungus and virus. *BMC Microbiol.* **21**, 256 (2021).
169. Hon, K. L., Tsang, Y. C. K., Pong, N. H., Leung, T. F. & Ip, M. Exploring *Staphylococcus epidermidis* in atopic eczema: friend or foe? *Clin. Exp. Dermatol.* **41**, 659–663 (2016).
170. Navarro-Triviño, F. J. & Ayén-Rodríguez, Á. Study of Hypersensitivity to *Malassezia furfur* in Patients with Atopic Dermatitis with Head and Neck Pattern: Is It Useful as a Biomarker and Therapeutic Indicator in These Patients? *Life* **12**, 299 (2022).
171. Eichenfield, L. F. *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J. Am. Acad. Dermatol.* **71**, 116–132 (2014).
172. Hon, K. L., Kung, J. S. C., Ng, W. G. G. & Leung, T. F. Emollient treatment of atopic dermatitis: latest evidence and clinical considerations. *Drugs Context* **7**, 212530 (2018).
132. Zuuren, E. J. van, Fedorowicz, Z., Christensen, R., Lavrijsen, A. P. & Arents, B. W. Emollients and moisturisers for eczema. *Cochrane Database of Systemic Reviews.* **2**, Art. No.: CD012119 (2017).
174. Sidbury, R. *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches. *J. Am. Acad. Dermatol.* **71**, 1218–1233 (2014).
175. Sidbury, R. *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. *J. Am. Acad. Dermatol.* **71**, 327–349 (2014).

176. Deleanu, D. & Nedelea, I. Biological therapies for atopic dermatitis: An update (Review). *Exp. Ther. Med.* **17**, 1061–1067 (2019).
177. Beck, L. A. *et al.* Dupilumab Treatment in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **371**, 130–139 (2014).
178. Shirley, M. Dupilumab: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1115–1121 (2017).
179. Drucker, A. M. *et al.* Systemic Immunomodulatory Treatments for Atopic Dermatitis: Update of a Living Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* **158**, 523–532 (2022).
180. Drucker, A. M. *et al.* Systemic Immunomodulatory Treatments for Atopic Dermatitis: Living Systematic Review and Network Meta-Analysis Update. *JAMA Dermatol.* **160**, 936–944 (2024).
181. Weidinger, S. *et al.* Early Achievement of High Treatment Targets in Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis with Upadacitinib: Real-World Evidence from the Observational UP-TAINED Study. *Dermatol. Ther.* **15**, 919–931 (2025).
182. Lo, Y., Cheng, T.-T., Huang, C.-J., Cheng, Y.-C. & Chyuan, I.-T. Advancing Therapeutic Strategies in Atopic Dermatitis: Emerging Targets and Personalized Approaches. *Biomolecules* **15**, 838 (2025).
183. Tham, E. H., Koh, E., Common, J. E. A. & Hwang, I. Y. Biotherapeutic Approaches in Atopic Dermatitis. *Biotechnol. J.* **15**, 1900322 (2020).
184. World Health Organization. *Global Report on Psoriasis*. (World Health Organization, Geneva, 2016).
185. Mehrmal, S., Uppal, P., Nedley, N., Giesey, R. L. & Delost, G. R. The global, regional, and national burden of psoriasis in 195 countries and territories, 1990 to 2017: A systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2017. *J. Am. Acad. Dermatol.* **84**, 46–52 (2021).
186. Iskandar, I. Y. K., Parisi, R., Griffiths, C. E. M., Ashcroft, D. M., & on behalf of the Global Psoriasis Atlas. Systematic review examining changes over time and variation in the incidence and prevalence of psoriasis by age and gender*. *Br. J. Dermatol.* **184**, 243–258 (2021).
187. Parisi, R., Symmons, D. P. M., Griffiths, C. E. M. & Ashcroft, D. M. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 377–385 (2013).

188. Parisi, R. *et al.* National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ* **369**, m1590 (2020).
189. Wilkinson, J. D. & Williamson, E. M. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* **45**, 87–92 (2007).
190. Günther, C., Carballido-Perrig, N., Kaesler, S., Carballido, J. M. & Biedermann, T. CXCL16 and CXCR6 Are Upregulated in Psoriasis and Mediate Cutaneous Recruitment of Human CD8+ T Cells. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 626–634 (2012).
191. Pietrzak, A., Michalak-Stoma, A., Chodorowska, G. & Szepietowski, J. C. Lipid Disturbances in Psoriasis: An Update. *Mediators Inflamm.* **2010**, e535612 (2010).
192. Kamiya, K., Kishimoto, M., Sugai, J., Komine, M. & Ohtsuki, M. Risk Factors for the Development of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4347 (2019).
193. Chen, Y., Zhuang, Z. & Rao, Z. Causal Relationship of Skin Microbiota on Psoriasis: A Mendelian Randomization Study. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **17**, 2089–2096 (2024).
194. Gao, Z., Tseng, C., Strober, B. E., Pei, Z. & Blaser, M. J. Substantial Alterations of the Cutaneous Bacterial Biota in Psoriatic Lesions. *PLOS ONE* **3**, e2719 (2008).
195. Prinz, J. C. Bedeutung von Streptokokken für die Psoriasispathogenese. *Hautarzt* **60**, 109–115 (2009).
196. Weisenseel, P. *et al.* Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. *J. Med. Genet.* **39**, 767–768 (2002).
197. Drago, L. *et al.* Skin microbiota of first cousins affected by psoriasis and atopic dermatitis. *Clin. Mol. Allergy* **14**, 2 (2016).
198. Celoria, V. *et al.* The Skin Microbiome and Its Role in Psoriasis: A Review. *Psoriasis Targets Ther.* **13**, 71–78 (2023).
199. Drakou, K., Tsianni, A., Vrani, F., Kefala, V. & Rallis, E. Revealing the Correlation between Altered Skin Lipids Composition and Skin Disorders. *Cosmetics* **8**, 88 (2021).
200. Xiong, Q. *et al.* LC–MS metabolomics reveal skin metabolic signature of psoriasis vulgaris. *Exp. Dermatol.* **32**, 889–899 (2023).

201. Baran, A., Kiluk, P., Myśliwiec, H. & Flisiak, I. The role of lipids in psoriasis. *Dermatol. Rev. Dermatol.* **104**, 619–635 (2017).
202. Shih, C.-M. *et al.* The Roles of Lipoprotein in Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 859 (2020).
203. Ramic, L. & Sator, P. Topical treatment of psoriasis vulgaris. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **21**, 631–642 (2023).
204. Seuve, É., Eyraud, A. & Desmoulière, A. Les traitements du psoriasis. *Actual. Pharm.* **62**, 43–48 (2023).
205. Rønholt, K. & Iversen, L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2297 (2017).
206. Estevinho, T., Lé ,Ana Maria & and Torres, T. Deucravacitinib in the treatment of psoriasis. *J. Dermatol. Treat.* **34**, 2154122 (2023).
207. van Zuuren, E. J. *et al.* Rosacea: New Concepts in Classification and Treatment. *Am. J. Clin. Dermatol.* **22**, 457–465 (2021).
208. Powell Frank C. Rosacea. *N. Engl. J. Med.* **352**, 793–803 (2005).
209. Sharma, A. *et al.* Rosacea management: A comprehensive review. *J. Cosmet. Dermatol.* **21**, 1895–1904 (2022).
210. Melnik, B. & Chen, W. Acne and Rosacea. in *Braun-Falco's Dermatology* (eds. Plewig, G., French, L., Ruzicka, T., Kaufmann, R. & Hertl, M.) 1–33 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2020). doi:10.1007/978-3-662-58713-3_71-1.
211. Baldwin, H. *et al.* Evidence of Barrier Deficiency in Rosacea and the Importance of Integrating OTC Skincare Products into Treatment Regimens. *J. Drugs Dermatol.* **20**, 384–392 (2021).
212. Zhang, Y. *et al.* Integrated Omics Reveal the Molecular Characterization and Pathogenic Mechanism of Rosacea. *J. Invest. Dermatol.* (2023) doi:10.1016/j.jid.2023.05.028.
213. Pye, R. j., Meyrick, G. & Burton, J. I. Skin surface lipid composition in rosacea. *Br. J. Dermatol.* **94**, 161–164 (1976).
214. Holmes, A. D. Potential role of microorganisms in the pathogenesis of rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* **69**, 1025–1032 (2013).

215. O'Reilly, N., Menezes, N. & Kavanagh, K. Positive correlation between serum immunoreactivity to Demodex-associated Bacillus proteins and erythematotelangiectatic rosacea. *Br. J. Dermatol.* **167**, 1032–1036 (2012).
216. Whitfeld, M., Gunasingam, N., Leow, L. J., Shirato, K. & Preda, V. *Staphylococcus epidermidis*: A possible role in the pustules of rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.* **64**, 49–52 (2011).
217. Fatou, B. *et al.* Real time and in vivo pharmaceutical and environmental studies with SpiderMass instrument. *J. Biotechnol.* **281**, 61–66 (2018).
218. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res.* **50**, D622–D631 (2022).
219. Conroy, M. J. *et al.* LIPID MAPS: update to databases and tools for the lipidomics community. *Nucleic Acids Res.* **52**, D1677–D1682 (2024).
220. Fahy, E., Sud, M., Cotter, D. & Subramaniam, S. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res.* **35**, W606–W612 (2007).
221. Wang, F. *et al.* CFM-ID 4.0 – a web server for accurate MS-based metabolite identification. *Nucleic Acids Res.* **50**, W165–W174 (2022).
222. Ruttkies, C., Schymanski, E. L., Wolf, S., Hollender, J. & Neumann, S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J. Cheminformatics* **8**, 3 (2016).
223. Tolleson, A. & Frithz, A. Transepidermal water loss and water content in the stratum corneum in infantile seborrheic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **73**, 18–20 (1993).
224. Wikramanayake, T. C., Borda, L. J., Miteva, M. & Paus, R. Seborrheic dermatitis-Looking beyond Malassezia. *Exp. Dermatol.* **28**, 991–1001 (2019).
225. Janssens, M. *et al.* Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients[S]. *J. Lipid Res.* **53**, 2755–2766 (2012).
226. Berdyshev, E. *et al.* Dupilumab significantly improves skin barrier function in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Allergy* **77**, 3388–3397 (2022).
227. Rawlings, A. V. & Harding, C. R. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* **17 Suppl 1**, 43–48 (2004).

228. Choi, H. K., Cho, Y. H., Lee, E. O., Kim, J. W. & Park, C. S. Phytosphingosine enhances moisture level in human skin barrier through stimulation of the filaggrin biosynthesis and degradation leading to NMF formation. *Arch. Dermatol. Res.* **309**, 795–803 (2017).
229. Kleuser, B. & Bäumer, W. Sphingosine 1-Phosphate as Essential Signaling Molecule in Inflammatory Skin Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1456 (2023).
230. Rousel, J. *et al.* Lesional skin of seborrheic dermatitis patients is characterized by skin barrier dysfunction and correlating alterations in the stratum corneum ceramide composition. *Exp. Dermatol.* **33**, e14952 (2024).
231. Fukuda, R. *et al.* Association of lipid abnormalities in the stratum corneum and TGF- β 1 and 2 in colostrum and the development of infantile seborrheic dermatitis: A prospective birth cohort study. *J. Dermatol. Sci.* **112**, 39–42 (2023).
232. Wood, P. L. Fatty Acyl Esters of Hydroxy Fatty Acid (FAHFA) Lipid Families. *Metabolites* **10**, 512 (2020).
233. Riecan, M., Paluchova, V., Lopes, M., Brejchova, K. & Kuda, O. Branched and linear fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFA) relevant to human health. *Pharmacol. Ther.* **231**, 107972 (2022).
234. Hirabayashi, T. *et al.* PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* **8**, 14609 (2017).
235. Nădăban, A. *et al.* Effect of sphingosine and phytosphingosine ceramide ratio on lipid arrangement and barrier function in skin lipid models. *J. Lipid Res.* **64**, 100400 (2023).
236. Gupta, J. & Margolis, D. J. Filaggrin Gene Mutations with Special Reference to Atopic Dermatitis. *Curr. Treat. Options Allergy* **7**, 403–413 (2020).
237. Hoyer, A. *et al.* Filaggrin mutations in relation to skin barrier and atopic dermatitis in early infancy*. *Br. J. Dermatol.* **186**, 544–552 (2022).
238. Winget, J. *et al.* Quantitative proteomic analysis of Stratum Corneum dysfunction in adult chronic Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1732–1735 (2016).
239. Nicolaou, A. Eicosanoids in skin inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **88**, 131–138 (2013).

240. Schäfer, L. & Kragballe, K. Abnormalities in Epidermal Lipid Metabolism in Patients with Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 10–15 (1991).
241. Ruzicka, T., Simmet, T., Peskar, B. A. & Ring, J. Skin Levels of Arachidonic Acid-Derived Inflammatory Mediators and Histamine in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **86**, 105–108 (1986).
242. Fogh, K., Herlin, T. & Kragballe, K. Eicosanoids in skin of patients with atopic dermatitis: Prostaglandin E2 and leukotriene B4 are present in biologically active concentrations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 450–455 (1989).
243. Bertino, L. *et al.* Oxidative Stress and Atopic Dermatitis. *Antioxidants* **9**, 196 (2020).
244. Nachbar, F. & Korting, H. C. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J. Mol. Med.* **73**, 7–17 (1995).
245. Packer, L. & Valacchi, G. Antioxidants and the Response of Skin to Oxidative Stress: Vitamin E as a Key Indicator. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **15**, 282–290 (2002).
246. Oh, S.-Y., Chung, J., Kim, M.-K., Kwon, S. O. & Cho, B.-H. Antioxidant nutrient intakes and corresponding biomarkers associated with the risk of atopic dermatitis in young children. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**, 245–252 (2010).
247. Hoppu, U., Salo-Väänänen, P., Lampi, A.-M. & Isolauri, E. Serum Alpha- and Gamma-Tocopherol Levels in Atopic Mothers and Their Infants Are Correlated. *Biol. Neonate* **88**, 24–26 (2005).
248. Hozyasz, K. K., Chelchowska, M., Laskowska-Klita, T., Ruszkowska, L. & Milanowski, A. [Low concentration of alpha-tocopherol in erythrocytes of atopic dermatitis patients]. *Med. Wieku Rozwoj.* **8**, 963–969 (2004).
249. Antille, C., Sorg, O., Lübke, J. & Saurat, J.-H. Decreased Oxidative State in Non-Lesional Skin of Atopic Dermatitis. *Dermatology* **204**, 69–71 (2002).
250. *Vitamin E in Health and Disease: Interactions, Diseases and Health Aspects.* (BoD – Books on Demand, 2021).

251. Nagui, N. A., El-Tartoushy, S. A., Rashed, L. A. & Elmasry, M. F. Assessment of prostaglandin F2-alpha (PGF2 α) in lesional and nonlesional skin of vitiligo patients. *Int. J. Dermatol.* **61**, 1390–1396 (2022).
252. Töröcsik, D. *et al.* Transcriptomic and lipidomic profiling of eicosanoid/docosanoid signalling in affected and non-affected skin of human atopic dermatitis patients. *Exp. Dermatol.* **28**, 177–189 (2019).
253. Veer, W. L. C. Melanin and its precursors II. On adrenochrome. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **61**, 638–646 (1942).
254. Bu'Lock, J. D. 11. The formation of melanin from adrenochrome. *J. Chem. Soc. Resumed* 52–58 (1961) doi:10.1039/JR9610000052.
255. Bindoli, A., Deeble, D. J., Rigobello, M. P. & Galzigna, L. Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1016**, 349–356 (1990).
256. Wang, H. *et al.* Application of lipidomics to reveal differences of facial skin surface lipids between atopic dermatitis and healthy infants. *J. Cosmet. Dermatol.* **19**, 1528–1534 (2020).
257. Ilves, L. *et al.* Metabolomic Analysis of Skin Biopsies from Patients with Atopic Dermatitis Reveals Hallmarks of Inflammation, Disrupted Barrier Function and Oxidative Stress. *Acta Derm. Venereol.* **101**, adv00407–adv00407 (2021).
258. Jia, Y., Gan, Y., He, C., Chen, Z. & Zhou, C. The mechanism of skin lipids influencing skin status. *J. Dermatol. Sci.* **89**, 112–119 (2018).
259. Hammarström, S. *et al.* Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2alpha in epidermis of psoriasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 5130–5134 (1975).
260. Li, J. *et al.* LC-MS-based serum metabolomics reveals a distinctive signature in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **37**, 1493–1502 (2018).
261. Liu, R. *et al.* Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat. Med.* **23**, 859–868 (2017).

262. Doig, A. J. Positive Feedback Loops in Alzheimer's Disease: The Alzheimer's Feedback Hypothesis. *J. Alzheimers Dis.* **66**, 25–36 (2018).
263. Armstrong, A. W. *et al.* Metabolomics in psoriatic disease: pilot study reveals metabolite differences in psoriasis and psoriatic arthritis. *Fl000 Res.* **3**, 248 (2014).
264. Pohla, L. *et al.* Hyperproliferation is the main driver of metabolomic changes in psoriasis lesional skin. *Sci. Rep.* **10**, 3081 (2020).
265. Tarentini, E. *et al.* Integrated metabolomic analysis and cytokine profiling define clusters of immuno-metabolic correlation in new-onset psoriasis. *Sci. Rep.* **11**, 10472 (2021).
266. Ottas, A., Fishman, D., Okas, T.-L., Kingo, K. & Soomets, U. The metabolic analysis of psoriasis identifies the associated metabolites while providing computational models for the monitoring of the disease. *Arch. Dermatol. Res.* **309**, 519–528 (2017).
267. Janssens, M. *et al.* Lamellar Lipid Organization and Ceramide Composition in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Eczema. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 2136–2138 (2011).
268. van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S. & Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 295–313 (2014).
269. Motta, S. *et al.* Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1182**, 147–151 (1993).
270. Yan, D. *et al.* The metabolomics of psoriatic disease. *Psoriasis Targets Ther.* **7**, 1–15 (2017).
271. Newgard, C. B. Interplay between Lipids and Branched-Chain Amino Acids in Development of Insulin Resistance. *Cell Metab.* **15**, 606–614 (2012).
272. Jara, C. P. *et al.* Glutamic acid promotes hair growth in mice. *Sci. Rep.* **11**, 15453 (2021).
273. Solak Tekin, N., Tekin, I. O., Barut, F. & Yilmaz Sipahi, E. Accumulation of Oxidized Low-Density Lipoprotein in Psoriatic Skin and Changes of Plasma Lipid Levels in Psoriatic Patients. *Mediators Inflamm.* **2007**, 078454 (2007).
274. Wakkee, M. *Psoriasis: Comorbidity and Treatment.* (2010).
275. Luo, L., Guo, Y., Chen, L., Zhu, J. & Li, C. Crosstalk between cholesterol metabolism and psoriatic inflammation. *Front. Immunol.* **14**, (2023).

276. Ryu, H., Kim, J., Kim, D., Lee, J.-E. & Chung, Y. Cellular and Molecular Links between Autoimmunity and Lipid Metabolism. *Mol. Cells* **42**, 747–754 (2019).
277. Montero-Vilchez, T. *et al.* Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity. *J. Clin. Med.* **10**, 359 (2021).
278. Zhang, X. Genome-wide association study of skin complex diseases. *J. Dermatol. Sci.* **66**, 89–97 (2012).
279. Gerritsen, M. J. P., Elbers, M. E., de Jong, E. M. G. J. & van de Kerkhof, P. C. M. Recruitment of cycling epidermal cells and expression of filaggrin, involucrin and tenascin in the margin of the active psoriatic plaque, in the uninvolved skin of psoriatic patients and in the normal healthy skin. *J. Dermatol. Sci.* **14**, 179–188 (1997).
280. Suga, H. *et al.* Skin Barrier Dysfunction and Low Antimicrobial Peptide Expression in Cutaneous T-cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4339–4348 (2014).
281. Zhao, Y. *et al.* Filaggrin Null Alleles Are Not Associated with Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1878–1882 (2007).
282. Hüffmeier, U. *et al.* Loss-of-Function Variants of the Filaggrin Gene Are Not Major Susceptibility Factors for Psoriasis Vulgaris or Psoriatic Arthritis in German Patients. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1367–1370 (2007).
283. Tarcsa, E. *et al.* Protein Unfolding by Peptidylarginine Deiminase: SUBSTRATE SPECIFICITY AND STRUCTURAL RELATIONSHIPS OF THE NATURAL SUBSTRATES TRICHOHYALIN AND FILAGGRIN *. *J. Biol. Chem.* **271**, 30709–30716 (1996).
284. Senshu, T., Akiyama, K. & Nomura, K. Identification of citrulline residues in the V subdomains of keratin K1 derived from the cornified layer of newborn mouse epidermis. *Exp. Dermatol.* **8**, 392–401 (1999).
285. Senshu, T., Kan, S., Ogawa, H., Manabe, M. & Asaga, H. Preferential Deimination of Keratin K1 and Filaggrin during the Terminal Differentiation of Human Epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 712–719 (1996).

286. Ishida-Yamamoto, A. *et al.* Decreased Deiminated Keratin K1 in Psoriatic Hyperproliferative Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 701–705 (2000).
287. Tawada, C. *et al.* Interferon- γ Decreases Ceramides with Long-Chain Fatty Acids: Possible Involvement in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 712–718 (2014).
288. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P. & Jacobsson, A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* **49**, 186–199 (2010).
289. Ohno, Y. *et al.* ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18439–18444 (2010).
290. Rabionet, M., Gorgas, K. & Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 422–434 (2014).
291. Soupene, E. & Kuypers, F. A. Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Exp. Biol. Med.* **233**, 507–521 (2008).
292. Wolf, R., Orion, E., Ruocco, E. & Ruocco, V. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of psoriasis. *Clin. Dermatol.* **30**, 323–328 (2012).
293. Motta, S., Sesana, S., Ghidoni, R. & Monti, M. Content of the different lipid classes in psoriatic scale. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 691–694 (1995).
294. Khyshiktuev, B. S. & Falko, E. V. Alterations in the parameters of lipid metabolism in different biological objects in psoriatic patients during exacerbation and remission. *Vestn. Dermatol. Venerol.* **6**, 40–43 (2005).
295. Łuczaj, W., Wroński, A., Domingues, P., Domingues, M. R. & Skrzydlewska, E. Lipidomic Analysis Reveals Specific Differences between Fibroblast and Keratinocyte Ceramide Profile of Patients with Psoriasis Vulgaris. *Molecules* **25**, 630 (2020).
296. Moore, D. J. & Rawlings, A. V. The chemistry, function and (patho)physiology of stratum corneum barrier ceramides. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 366–372 (2017).
297. Checa, A. *et al.* Circulating levels of sphingosine-1-phosphate are elevated in severe, but not mild psoriasis and are unresponsive to anti-TNF- α treatment. *Sci. Rep.* **5**, 12017 (2015).

298. Moon, S.-H. *et al.* Altered Levels of Sphingosine and Sphinganine in Psoriatic Epidermis. *Ann. Dermatol.* **25**, 321–326 (2013).
299. Gerstein, W. The Phospholipids of Normal and Psoriatic Skin*. *J. Invest. Dermatol.* **40**, 105–109 (1963).
300. Tsambaos, D., Kalofoutis, A., Stratigos, J., Miras, C. & Capetanakis, J. Thin-layer chromatography of phospholipid components of normal and psoriatic epidermis. *Br. J. Dermatol.* **97**, 135–138 (1977).
301. Tsambaos, D. & Mahrle, G. The phospholipid pattern in the involved and the uninvolved psoriatic epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* **266**, 177–180 (1979).
302. BURTON, J. L., PYE, R. J., MEYRICK, G. & SHUSTER, S. The sebum excretion rate in rosacea. *Br. J. Dermatol.* **92**, 541–543 (1975).
303. Chung, H. Y. *et al.* Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *AGE* **20**, 127–140 (1997).
304. George, J. & Struthers, A. D. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc. Health Risk Manag.* **5**, 265–272 (2009).
305. Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* **24**, 184–197 (2005).
306. Iacomino, G., Picariello, G. & D’Agostino, L. DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1823**, 1745–1755 (2012).
307. Bae, D.-H., Lane, D. J. R., Jansson, P. J. & Richardson, D. R. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1862**, 2053–2068 (2018).
308. Lagishetty, C. V. & Naik, S. R. Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian J. Pharmacol.* **40**, 121–125 (2008).
309. Bjelaković, G. *et al.* Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. *Amino Acids* **39**, 29–43 (2010).
310. Minois, N. Molecular Basis of the ‘Anti-Aging’ Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines - A Mini-Review. *Gerontology* **60**, 319–326 (2014).

311. Ottaviani, M. *et al.* Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2430–2437 (2006).
312. Addor, F. A. S. Skin barrier in rosacea. *An. Bras. Dermatol.* **91**, 59–63 (2016).
313. Gupta, A. K. Ciclopirox: an overview. *Int. J. Dermatol.* **40**, 305–310 (2001).
314. Subissi, A., Monti, D., Togni, G. & Mailland, F. Ciclopirox. *Drugs* **70**, 2133–2152 (2010).
315. Kim, Y. *et al.* Increased In Vivo Efficacy of Lenalidomide by Addition of Piroctone Olamine. *In Vivo* **25**, 99–103 (2011).
316. Dubini, F., Bellotti, M. G., Frangi, A., Monti, D. & Saccomani, L. In vitro Antimycotic Activity and Nail Permeation Models of a Piroctone Olamine (Octopirox) Containing Transungual Water Soluble Technology. *Arzneimittelforschung* **55**, 478–483 (2005).
317. Zuther, K. *et al.* The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **68**, 152–172 (2008).
318. Kendall, A. C. & Nicolaou, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog. Lipid Res.* **52**, 141–164 (2013).
319. Traidl-Hoffmann, C. *et al.* Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 831–838 (2002).
320. Gschwandtner, M. *et al.* Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy* **68**, 37–47 (2013).
321. Rattanakaemakorn, P. & Suchonwanit, P. Scalp Pruritus: Review of the Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *BioMed Res. Int.* **2019**, e1268430 (2019).
322. Al-Kenani, H. Q. M. Detection Of Some Immunological And Biochemical Markers In Seborrheic Dermatitis Patients. *J. Pharm. Negat. Results* **13**, (2022).
323. Bikman, B. T. & Summers, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.* **121**, 4222–4230 (2011).
324. Maceyka, M. & Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **510**, 58–67 (2014).

325. Pralhada Rao, R. *et al.* Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. *J. Lipids* **2013**, e178910 (2013).
326. Azmitia, E. C. Serotonin Neurons, Neuroplasticity, and Homeostasis of Neural Tissue. *Neuropsychopharmacology* **21**, 33S-45S (1999).
327. Slominski, A. *et al.* On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* **27**, 137–147 (2005).
328. Nordlind, K., Azmitia, E. C. & Slominski, A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. *Exp. Dermatol.* **17**, 301–311 (2008).
329. Lundeberg, L. *et al.* Serotonin in human allergic contact dermatitis. An immunohistochemical and high-performance liquid chromatographic study. *Arch. Dermatol. Res.* **291**, 269–274 (1999).
330. Huang, J., Li, G., Xiang, J., Yin, D. & Chi, R. Immunohistochemical study of serotonin in lesions of chronic eczema. *Int. J. Dermatol.* **43**, 723–726 (2004).
331. Huang, J., Li, G., Xiang, J., Yin, D. & Chi, R. Immunohistochemical study of serotonin in lesions of psoriasis. *Int. J. Dermatol.* **43**, 408–411 (2004).
332. Thomsen, J. S. *et al.* Experimental itch in sodium lauryl sulphate-inflamed and normal skin in humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of histamine and other inducers of itch. *Br. J. Dermatol.* **146**, 792–800 (2002).
333. Yamaguchi, T., Nagasawa, T., Satoh, M. & Kuraishi, Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. *Neurosci. Res.* **35**, 77–83 (1999).
334. Takubo, M. *et al.* Characteristics of Scratching Behavior Induced by Some Chemical Mediators in Hairless Mice. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 285–288 (2006).
335. Ro, B. I. & Dawson, T. L. The Role of Sebaceous Gland Activity and Scalp Microfloral Metabolism in the Etiology of Seborrheic Dermatitis and Dandruff. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **10**, 194–197 (2005).
336. Mukherjee, S. *et al.* Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin. Interv. Aging* **1**, 327–348 (2006).
337. Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E. & Zouboulis, C. C. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol.* **4**, 308–319 (2012).

338. Spierings, N. M. K. Evidence for the Efficacy of Over-the-counter Vitamin A Cosmetic Products in the Improvement of Facial Skin Aging: A Systematic Review. *J. Clin. Aesthetic Dermatol.* **14**, 33–40 (2021).
339. Korf, A. *et al.* Three-dimensional Kendrick mass plots as a tool for graphical lipid identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **32**, 981–991 (2018).
340. Richardson, L. T., Neumann, E. K., Caprioli, R. M., Spraggins, J. M. & Solouki, T. Referenced Kendrick Mass Defect Annotation and Class-Based Filtering of Imaging MS Lipidomics Experiments. *Anal. Chem.* **94**, 5504–5513 (2022).
341. Fisher, G. J. & Voorhees, J. J. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J.* **10**, 1002–1013 (1996).
342. Gerber, L. E. & Erdman, J. W. Changes in lipid metabolism during retinoid administration. *J. Am. Acad. Dermatol.* **6**, 664–672 (1982).
343. Kosmadaki, M. & Katsambas, A. Topical treatments for acne. *Clin. Dermatol.* **35**, 173–178 (2017).
344. Landthaler, M., Kummermehr, J., Wagner, A. & Plewig, G. Inhibitory effects of 13-cis-retinoic acid on human sebaceous glands. *Arch. Dermatol. Res.* **269**, 297–309 (1980).
345. DALZIEL, K., BARTON, S. & MARKS, R. The effects of isotretinoin on follicular and sebaceous gland differentiation. *Br. J. Dermatol.* **117**, 317–323 (1987).
346. Geißler, S. E., Michelsen, S. & Plewig, G. Very low dose isotretinoin is effective in controlling seborrhea. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **1**, 952–958 (2003).
347. de Souza Leão Kamamoto, C., Sanudo, A., Hassun, K. M. & Bagatin, E. Low-dose oral isotretinoin for moderate to severe seborrhea and seborrheic dermatitis: a randomized comparative trial. *Int. J. Dermatol.* **56**, 80–85 (2017).
348. Zouboulis, C. C. *et al.* Effects of 13-Cis-Retinoic Acid, All-Trans-Retinoic Acid, and Acitretin on the Proliferation, Lipid Synthesis and Keratin Expression of Cultured Human Sebocytes In Vitro. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 792–797 (1991).

349. Tsukada, M. *et al.* 13-*cis* Retinoic Acid Exerts its Specific Activity on Human Sebocytes through Selective Intracellular Isomerization to All-*trans* Retinoic Acid and Binding to Retinoid Acid Receptors. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 321–327 (2000).
350. Nelson, A. M., Gilliland, K. L., Cong, Z. & Thiboutot, D. M. 13-*cis* Retinoic Acid Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human SEB-1 Sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2178–2189 (2006).
351. Zasada, M., Budzisz, E. & Erkiert-Polguj, A. A Clinical Anti-Ageing Comparative Study of 0.3 and 0.5% Retinol Serums: A Clinically Controlled Trial. *Skin Pharmacol. Physiol.* **33**, 102–116 (2020).
352. Abed, K., Foucher, A., Bernard, D., Tancrede-Bohin, E. & Cavusoglu, N. One-year longitudinal study of the stratum corneum proteome of retinol and all-trans-retinoic acid treated human skin: an orchestrated molecular event. *Sci. Rep.* **13**, 11196 (2023).
353. Sorg, O., Antille, C., Kaya, G. & Saurat, J.-H. Retinoids in cosmeceuticals. *Dermatol. Ther.* **19**, 289–296 (2006).
354. Shao, Y., He, T., Fisher, G. J., Voorhees, J. J. & Quan, T. Molecular basis of retinol anti-ageing properties in naturally aged human skin in vivo. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 56–65 (2017).
355. Xi, P. *et al.* Regulation of protein turnover by l-glutamine in porcine intestinal epithelial cells. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 1012–1017 (2012).
356. Kwon, H. S., Lee, J. H., Kim, G. M. & Bae, J. M. Efficacy and safety of retinaldehyde 0.1% and 0.05% creams used to treat photoaged skin: A randomized double-blind controlled trial. *J. Cosmet. Dermatol.* **17**, 471–476 (2018).
357. Zasada, M. & Budzisz, E. Retinoids: active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* **36**, 392–397 (2019).
358. Gui, M. *et al.* Decoding the anti-aging effect of retinol in reshaping the human skin microbiome niches. 2024.06.26.600860 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.06.26.600860> (2024).
359. Holick, M. F. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J. Nutr.* **135**, 2739S–48S (2005).

360. Holick, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* **116**, 2062–2072 (2006).
361. Oda, Y. *et al.* Vitamin D Receptor Is Required for Proliferation, Migration, and Differentiation of Epidermal Stem Cells and Progeny during Cutaneous Wound Repair. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 2423–2431 (2018).
362. Reichrath, J., Saternus, R. & Vogt, T. Challenge and perspective: the relevance of ultraviolet (UV) radiation and the vitamin D endocrine system (VDES) for psoriasis and other inflammatory skin diseases. *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 433–444 (2017).
363. Kragballe, K. *et al.* Calcipotriol cream with or without concurrent topical corticosteroid in psoriasis: tolerability and efficacy. *Br. J. Dermatol.* **139**, 649–654 (1998).
364. Bocheva, G., Slominski, R. M. & Slominski, A. T. The Impact of Vitamin D on Skin Aging. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9097 (2021).
365. Dusso, A. S., Brown, A. J. & Slatopolsky, E. Vitamin D. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **289**, F8–F28 (2005).
366. Marie, A., Darricau, M., Touyarot, K., Parr-Brownlie, L. C. & Bosch-Bouju, C. Role and Mechanism of Vitamin A Metabolism in the Pathophysiology of Parkinson’s Disease. *J. Park. Dis.* **11**, 949–970 (2021).
367. Zirem, Y. *et al.* Development of Molecular Digital Twins Based on Ambient Ionization Mass Spectrometry Imaging for Application in Cancer Surgery. 2024.12.08.627387 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.12.08.627387> (2024).
368. Zirem, Y. *et al.* Real-time glioblastoma tumor microenvironment assessment by SpiderMass for improved patient management. *Cell Rep. Med.* 101482 (2024) doi:10.1016/j.xcrm.2024.101482.
369. Goldman, S. *et al.* Annotating metabolite mass spectra with domain-inspired chemical formula transformers. *Nat. Mach. Intell.* **5**, 965–979 (2023).
370. Bui-Thi, D., Liu, Y., Lippens, J. L., Laukens, K. & De Vijlder, T. TransExION: a transformer based explainable similarity metric for comparing IONS in tandem mass spectrometry. *J. Cheminformatics* **16**, 61 (2024).

371. Schmid, R. *et al.* Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment. *Nat. Commun.* **12**, 3832 (2021).
372. Yu, G., Wang, L.-G., Yan, G.-R. & He, Q.-Y. DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis. *Bioinformatics* **31**, 608–609 (2015).
373. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
374. Liu, C.-H. *et al.* LipidSig 2.0: integrating lipid characteristic insights into advanced lipidomics data analysis. *Nucleic Acids Res.* **52**, W390–W397 (2024).
375. Vondrackova, M., Kopczynski, D., Hoffmann, N. & Kuda, O. LORA, Lipid Over-Representation Analysis Based on Structural Information. *Anal. Chem.* **95**, 12600–12604 (2023).
376. Molenaar, M. R. *et al.* LION/web: a web-based ontology enrichment tool for lipidomic data analysis. *GigaScience* **8**, giz061 (2019).
377. Clair, G. *et al.* Lipid Mini-On: mining and ontology tool for enrichment analysis of lipidomic data. *Bioinformatics* **35**, 4507–4508 (2019).
378. Ogrinc, N. *et al.* Water-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for minimally invasive in vivo and real-time surface analysis using SpiderMass. *Nat. Protoc.* **14**, 3162–3182 (2019).

13 Liste des publications et Brevets

13.1 Publications

Lipidomic Insights into Seborrheic Dermatitis: Clinical Evaluation of Sebum Changes Using SpiderMass in a Randomized Controlled Study

Lucille Darras, Eléonore Gravier, Célia Ipinazar, Aurélie Mercadie, Christophe Lauze, Aurélie Villaret, Martine Maitre, Camille Genies, Razvan Marinescu, Valérie Mengeaud, Isabelle Fournier, Gwendal Josse

13.2 Brevet

Numéro de dépôt : 2406033

Titre de l'invention : METHODE DE DIAGNOSTIC NON INVASIF DES DERMATOSES INFLAMMATOIRES

13.3 Présentations orales et Posters

29 mars 2022 : Journée Stratégique de la SFR-TSM – Hôtel Carlton, Lille (POSTER)

Darras L. *, Saudemont P., Salzet M., Josse G., Fournier I., *Etude de la peau par Spectrométrie de Masse - Approche in vivo par la technologie SpiderMass™*. Journées stratégiques de la SFR-TSM, Lille, France. March 29, 2022.

Du 05 au 08 Septembre 2022 : Congrès Analytics – Nantes, France (POSTER)

Darras L. *, Saudemont P., Salzet M., Josse G., Fournier I., *Molecular scoring of the severity of skin pathologies by real-time mass spectrometry using SpiderMass™ technology*. Analytics, Nantes, France. Septembre 06, 2022.

Du 16 au 19 septembre 2024 : Congrès SMAP – Lille, France (ORAL)

Lucille Darras*, Eléonore Gravier, Célia Ipinazar, Aurélie Mercadie, Aurélie Vilaret, Martine Maitre, Camille Genies, Razvan Marinescu, Valérie Mengeaud, Isabelle Fournier, Gwendal Josse
Studying skin seborrheic dermatitis dysbiosis by SpiderMass.

14 Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le soutien, les conseils et la bienveillance de nombreuses personnes que je souhaite ici remercier chaleureusement.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. **Isabelle Fournier**, co-directrice du laboratoire PRISM et directrice de ma thèse, pour ta confiance, ton accompagnement et ton expertise tout au long de ces trois années. Ton encadrement rigoureux, mais toujours empreint de bienveillance, a été aussi formateur qu'inspirant. Tu as su être là dans les moments simples comme dans les plus exigeants, avec patience et générosité. Je me souviens en particulier de ton soutien précieux lors du congrès SMAP, de tes encouragements avant et après ma présentation, et de ta manière unique de faire naître la confiance là où parfois elle vacille. Merci pour ton regard scientifique, mais aussi profondément humain.

Je souhaite également exprimer toute ma reconnaissance au Dr. **Gwendal Josse**, mon co-encadrant de thèse chez Pierre Fabre Dermo-Cosmétique. Alors pour une fois, je vais faire une entorse à ta règle des « deux choses », car il y en aurait bien plus à dire. Merci pour ton expertise et pour m'avoir patiemment initiée à la complexité de la peau, pour ton exigence toujours constructive, et surtout pour ta présence constante. Ta bienveillance, ton écoute discrète mais sincère ont fait de cette aventure bien plus qu'un travail de recherche dans lequel j'ai pu avancer avec sérénité, même quand tout n'était pas simple.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude au Pr. **Michel Salzet**, directeur du laboratoire PRISM, pour m'avoir accueillie au sein de son unité. Merci pour ton soutien constant et pour l'environnement scientifique stimulant que tu as su créer, où rigueur, innovation et bienveillance se conjuguent au quotidien.

Ensuite je tiens également à remercier chaleureusement la Dr. **Sandrine Bessou-Touya**, qui m'a accueillie au sein de la Recherche Appliquée de Pierre Fabre Dermo-Cosmétique. Merci pour ton soutien constant. Ton suivi attentif de mes travaux et ta confiance m'ont beaucoup portée et motivée. Je suis également profondément reconnaissante pour les opportunités que tu m'as offertes.

Je souhaite adresser mes plus vifs remerciements à mes rapporteurs, le Dr. **Michel Simon** et la Dr. **Justine Bertrand-Michel**, pour le temps précieux que vous avez consacré à l'évaluation de mon manuscrit et pour la qualité de vos remarques, toujours précises, constructives et éclairantes. Vos retours m'ont non seulement permis d'améliorer et de clarifier certains aspects de mon travail, mais ils m'ont aussi poussée à réfléchir plus largement sur la portée et les perspectives de mes recherches.

Je tiens également à remercier chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury, le Dr. **Michel Simon**, la Dr. **Justine Bertrand-Michel**, le Dr. **Marc-Emmanuel Dumas** et le Dr. **Laurent Debrauwer**, pour votre présence et l'intérêt sincère que vous avez porté à mes travaux. J'ai particulièrement apprécié la richesse de nos échanges lors de la soutenance : au-delà de leur caractère constructif et stimulant, ces discussions ont été pour moi un véritable moment de partage scientifique. J'ai pris énormément de plaisir à échanger avec vous, et ces discussions resteront un souvenir marquant et très motivant pour la suite de mon parcours.

Je souhaite adresser un immense merci à l'ensemble du **laboratoire PRISM**. Même si je n'ai eu la chance de partager que quelques mois à vos côtés, j'ai découvert une équipe toujours dans l'entraide, la bonne humeur et avec le plaisir de travailler ensemble. Ces moments, bien que courts, m'ont profondément marquée et j'étais très heureuse de vous avoir tous retrouvés lors du congrès SMAP à Lille. Je tiens à faire une mention toute particulière à l'équipe SpiderMass : **Léa, Lucas, Nina** : merci pour votre patience, votre disponibilité et pour m'avoir formée sur cette technologie unique.

Un merci spécial à **Léa**, qui a toujours trouvé le temps de répondre à mes questions, même quand j'étais à des kilomètres. Enfin, je souhaite également remercier **Léa** et **Yanis** pour leur soutien et leur précieuse contribution sur le projet BactérioScore.

Je tiens à adresser un immense merci à toute l'**équipe 2BTN** vous avez été bien plus qu'une simple équipe de travail pour moi. Vous avez été une véritable deuxième famille professionnelle : toujours présents, bienveillants, avec vos sourires et vos rires (dont certains me manqueront à ne pas douter 😊), vos Carson et cette bonne humeur inépuisable qui a rendu mes journées si agréables. Un merci tout particulier à toi **Célia**, tu m'as transmis avec patience, perspicacité et générosité tout son savoir sur le SpiderMass, et tu continues encore aujourd'hui de m'accompagner et de m'aider sur cette technologie parfois capricieuse. Merci également à toi et **Jérôme** d'avoir pris le relais sur l'étude RétinoSpider quand je ne le pouvais pas, ça été un énorme soulagement d'avoir des personnes de confiance pour gérer ce projet. Je suis tellement heureuse de pouvoir poursuivre cette aventure avec vous deux chez PFDC : je suis certaine que nous aurons encore beaucoup de choses à vivre et à apprendre ensemble. Et bien évidemment merci aussi à vous, **Aimée** et **Auréli**, mes copines de bureau devenues bien plus que ça. Merci pour les rires, les soutiens dans les moments de galère, et tous ces instants qui rendent le quotidien si précieux. Merci aussi pour votre aide infinie avec les statistiques : ce n'était pas une mission facile, mais vous avez toujours trouvé une façon de me guider avec patience (et humour !).

Je souhaite également remercier chaleureusement toutes les personnes de Pierre Fabre avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer durant ces trois années, **Auréli**, **Sophie**, **Chloé**, **Mélanie**, **Hélène**, **Camille**, **Martine**, **Camille**, **Pedro**, **Thérèse**, **Ulrike** et tous les autres. Chacun de nos échanges, qu'ils soient scientifiques, techniques ou simplement humains, a contribué à enrichir mon parcours et à rendre cette thèse encore plus stimulante. J'ai toujours trouvé auprès de vous disponibilité, écoute et bienveillance, et cela m'a beaucoup portée tout au long de mon travail.

Je tiens à adresser un immense merci à **Marie-Christine** et **Magali** pour votre aide précieuse dans l'organisation de ma journée de soutenance. Votre disponibilité, vos conseils et votre efficacité m'ont énormément soulagée dans cette étape importante. Je ne sais sincèrement pas comment j'aurais fait sans vous, et je vous suis profondément reconnaissante d'avoir rendu cette journée plus sereine et mieux préparée.

Je souhaite également remercier très chaleureusement le Pr. **Sophie Ayciriex** et le Dr. **David Touboul**, mes rapporteurs de CSI, pour le rôle important que vous avez joué tout au long de ces trois années de thèse. Vos remarques toujours pertinentes, vos questionnements stimulants et vos conseils avisés m'ont beaucoup apporté. Grâce à nos échanges, j'ai pu prendre du recul sur mes travaux, envisager de nouvelles pistes et trouver des solutions lorsque je me sentais bloquée. Votre regard bienveillant et exigeant à la fois a été une aide précieuse dans mon cheminement scientifique.

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler avant cette thèse, car vous avez chacune à votre manière contribué à mon parcours. Merci à toi, **Romain**, de m'avoir transmis les bases de la spectrométrie de masse avec toujours autant de bonne humeur, entre buissons, bières et éclats de rire, tu as rendu cet apprentissage aussi formateur qu'inoubliable. Merci à toute mon équipe de Sanofi : **Alexandra**, **Stéphane**, **Carole**, **Patricia**, **Alain**, **Béatrice**, **Marie-Claude**, **Sylvie** et **Dominique** de m'avoir initiée au monde de l'entreprise, un univers que j'ai découvert grâce à vous et dont, visiblement, je n'ai plus envie de me détacher. Enfin, une pensée particulière pour ma « société secrète » de Sainté : **Sonia**, **Audrick**, **Olivier**, **Ludo** et **Valérie** pour votre soutien, vos encouragements, et surtout pour m'avoir « fortement conseillé » de choisir cette thèse car c'était sans aucun doute le meilleur choix que je pouvais faire.

Je voudrais adresser un merci tout particulier à mes meilleures amies, **Aline, Justine et Delphine**. C'est grâce à vous trois que je me suis lancée dans cette belle aventure. Aline, tu m'as ouvert les portes de la spectrométrie de masse en me conseillant ce stage à l'ISA, puis l'alternance à Sanofi. C'est à ce moment-là que j'ai commencé à rêver d'une thèse, mais aussi à douter de moi et de mes capacités. Et c'est grâce à vous trois, à vos encouragements répétés et à votre confiance inébranlable, que j'ai fini par sauter le pas. Vous m'avez convaincue que j'en étais capable, et vous aviez raison. Mais notre histoire ne s'arrête pas à la science. Nous nous sommes rencontrées au master, et depuis, nous avons fait ensemble les 400 coups : soirées, révisions, repas, voyages, moments de complicité inoubliables qui ont forgé une amitié rare et précieuse. Pendant toute ma thèse, vous avez continué à être là, toujours présentes, à m'épauler, me soutenir, et parfois même à m'aider professionnellement grâce à votre expertise en spectrométrie de masse. Bien au-delà des études et du travail, c'est notre amitié qui m'a portée : nos messages, nos câlins (que tu adores Delphine, on le sait), nos sourires, nos fous rires partagés, et aussi nos défis un peu fous : #Raid Amazones. Vous êtes bien plus que des amies, vous êtes pour moi de véritables sœurs de cœur. Et ce qui me rend heureuse, c'est de savoir que ce chemin ne s'arrête pas là : nous allons continuer à écrire ensemble de nombreux chapitres de nos vies, et à partager encore des moments forts, qu'ils soient scientifiques, sportifs ou tout simplement humains. Je sais que vous serez là pour les prochains grands moments de ma vie, tout comme je serai là pour les vôtres.

Je voudrais aussi remercier tous mes copains qui m'ont soutenu et accompagné dans cette aventure. **Clara**, ma binôme de poney, avec qui j'ai partagé tellement de souvenirs au poney. Tu es toujours à mes côtés malgré les années qui passent, et il y en a eu un paqué depuis les championnats de France où l'on chantait "Ah les crocrocro, les crocrocro, les crocodiles" sur le terrain de la finale. Et **Fatma**, merci pour tes récits de voyages aux quatre coins du monde qui m'ont offert une vraie bouffée d'air pendant ma thèse et m'ont permis de m'évader à travers toi.

Je tiens à remercier du fond du cœur **ma famille**, qui a toujours été à mes côtés et qui a joué un rôle essentiel dans cette aventure. Merci à mes parents, pour votre soutien indéfectible à chaque étape, depuis mes premières recherches de thèse jusqu'au choix de partir à l'autre bout de la France pour saisir une opportunité qui me tenait à cœur. Vous m'avez donné la force de suivre mes envies, même lorsqu'elles demandaient des sacrifices, et je vous suis infiniment reconnaissante pour cette confiance et cet amour constants. Je souhaite adresser un remerciement tout particulier à toi **Amaya**. Tu as été ma « graphiste attitrée » tout au long de ces années : toujours là pour transformer mes idées parfois brouillonnes en schémas clairs, pour donner vie à mes posters, mes présentations, et jusqu'à la décoration des pages de cette thèse. Même quand mes explications ressemblaient plus à un casse-tête qu'à un vrai cahier des charges, tu as su trouver exactement ce que je voulais et je sais que c'est des années d'entraînement 😊.

Enfin, je souhaite adresser mes derniers, mais sans doute mes plus profonds remerciements à toi **Franck**, mon compagnon et futur mari. Depuis notre rencontre à Lyon, tu as toujours été à mes côtés, et tu as su transformer ce qui aurait pu n'être qu'un chemin professionnel en une véritable aventure de vie partagée. Lorsque l'opportunité de cette thèse à Toulouse et Lille s'est présentée, tu n'as pas hésité une seconde à mettre ton propre travail en pause pour que je puisse suivre le projet qui me tenait le plus à cœur. Ce geste, qui en dit long sur ton soutien et ton amour, je ne l'oublierai jamais. Durant ces trois années, tu as été mon pilier : tu m'as encouragée dans mes choix, tu m'as soutenue dans les moments de doute et de fatigue, et tu as toujours trouvé la manière de rendre les jours plus légers, même quand ils étaient chargés. Grâce à toi, j'ai pu avancer, travailler et vivre cette thèse avec force et sérénité. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure avec autant de

patience, de générosité et d’amour. Rien de tout cela n’aurait eu la même saveur sans toi, et je suis infiniment reconnaissante de continuer à écrire la suite de notre histoire main dans la main.

Résumé

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain et constitue une interface essentielle entre notre organisme et l'environnement. Elle joue un rôle clé dans la protection contre les agressions extérieures, la régulation thermique, l'immunité et les fonctions sensorielles. Son équilibre fragile dépend de nombreux facteurs, tels que l'hydratation, l'alimentation, le microbiote cutané et l'exposition au soleil. Lorsqu'il est perturbé, un état inflammatoire peut s'installer, régulièrement activé lors de dermatoses chroniques courantes comme l'acné, la dermatite atopique ou séborrhéique, le psoriasis et la rosacée.

Ces pathologies résultent d'interactions complexes entre le microbiote cutané, le système immunitaire et la physiologie de la peau. Les lipides, constituants majeurs de la peau, jouent un rôle fondamental dans l'homéostasie cutanée et l'immunité, et les métabolites, essentiels à l'hydratation de la peau et aux interactions avec le microbiote, sont au cœur de cet équilibre. Leur analyse en métabolomique, a connu un essor considérable ces dernières années, notamment grâce à la spectrométrie de masse. En effet cette technologie, offre l'accès à des analyses non ciblées avec une sensibilité, une polyvalence et une reproductibilité élevées. Cependant, les méthodes conventionnelles, qu'elles soient basées sur un couplage LC-MS/MS ou sur les approches shot-gun nécessitent une préparation d'échantillon chronophages. Cette préparation d'échantillon peut induire une modification des lipides, telles que des oxydations, pouvant altérer les résultats. Par ailleurs, les analyses ex-vivo ne permettent pas de réaliser facilement des analyses et un suivi dans le temps. Il est donc essentiel de développer des approches in vivo permettant une analyse en temps réel et non invasive des lipides et métabolites cutanés.

La technologie SpiderMass, développé par le laboratoire PRISM depuis plus de dix ans, est une technologie innovante utilisant une source ambiante basée sur une désorption/ionisation laser dans le moyen IR par excitation résonnante des molécules d'eau des tissus, mini-invasive et permettant analyses en temps-réel. Tout d'abord développé pour l'analyse peropératoire in vivo, dans le cadre de la chirurgie des cancers, et en particulier la définition des marges d'exérèse, la technologie SpiderMass s'est révélée être un véritable atout pour l'analyse de la peau en temps réel, de manière non invasive. Une thèse précédente a permis d'adapter cette technologie aux applications dermo-cosmétiques.

Mon projet porte sur l'évaluation de l'efficacité du SpiderMass dans ce même domaine, et plus particulièrement sur l'étude des pathologies de l'épiderme. Pour cela, je me suis tout d'abord intéressée, à la caractérisation des profils moléculaires observables par SpiderMass en analysant les peaux atteintes des dermatoses inflammatoires chroniques les plus courantes afin d'identifier des biomarqueurs spécifiques. Par la suite, l'évolution de ces profils et des biomarqueurs a été étudiée après un traitement topique de la dermatite séborrhéique. L'application du SpiderMass dans plusieurs études cliniques, menées au Centre clinique Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, a mis en évidence des différences significatives entre peau saine et pathologique, ainsi que des évolutions notables au cours des traitements. Enfin, une étude clinique sur des volontaires sains appliquant quotidiennement une crème aux rétinoïdes cosmétiques pendant huit semaines a révélé des modifications moléculaires significatives par rapport au groupe témoin utilisant un placebo.

Les résultats de cette thèse démontrent le potentiel du SpiderMass pour l'étude de la physiopathologie cutanée et de son évolution, ainsi que pour l'identification de biomarqueurs d'intérêt. De plus, Cette technologie ouvre de nouvelles perspectives pour l'évaluation de l'efficacité des produits dermo-cosmétiques, notamment dans le cadre du vieillissement cutané et des maladies inflammatoires chroniques.