

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations et des sigles.....	xiii
Remerciements.....	xv
Avant-propos	xvii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 La sclérose latérale amyotrophique	1
1.1.1 Description générale de la maladie.....	1
1.1.2 SLA familiale.....	3
1.1.3 SLA sporadique	4
1.1.4 Caractéristiques pathologiques de la SLA	5
1.1.5 Traitements disponibles.....	6
1.1.6 Biomarqueurs et méthodes de diagnostic.....	7
1.2 La peau pour étudier la SLA	9
1.2.1 Lien entre la peau et le SNC : le développement embryonnaire	10
1.2.2 Avantages et inconvénients d'étudier la peau	12
1.3 La peau	13
1.4 Le génie tissulaire.....	15
1.5 Spectroscopie infrarouge.....	16
1.5.1 Théorie et fonctionnement	17
1.5.2 Utilité en chimie	25
1.5.3 Utilité en biologie	26
1.5.4 Application possible avec les peaux reconstruites	28
1.6 Problématique et hypothèse de recherche.....	30
1.6.1 Problématique	30
1.6.2 Hypothèse de recherche.....	31
1.6.3 Objectifs de recherche.....	32
1.6.4 Impact des potentielles découvertes sur le diagnostic de la maladie	32
Chapitre 2 : Differential diagnosis of idiopathic amyotrophic lateral sclerosis using Fourier-transform spectrochemical analysis of patient-derived skins.....	35
2.1 Résumé.....	37
2.2 Abstract	38
2.3 Introduction.....	39
2.4 Materials and methods	40
2.4.1 Subjects, cells isolation and culture	40
2.4.2 Tissue-engineered skin production	40
2.4.3 Fourier-transform infrared spectroscopy analysis	41
2.4.4 ELISA	42
2.5 Results	43
2.5.1 FTIR spectroscopy analysis of the TES structural properties	43
2.5.2 PCA and HCA analysis.....	50
2.6 Discussion	53
2.7 Acknowledgements.....	55
2.8 Author contributions.....	55
2.9 References	55

Chapitre 3 :	Discussion.....	61
Chapitre 4 :	Conclusions et perspectives.....	63
Bibliographie.....		67

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Les trois différents feuillets embryonnaires et les tissus qui découleront de ces feuillets.....	11
Tableau 2.1 : Parameters of the different absorbance filters used for spectra filtering and their purpose.....	42
Tableau 2.2 : Summary of the changes observed in ALS and control TES	49

Liste des figures

Figure 1.1 : Neurones moteurs qui subissent de la dégénérescence dans la SLA	2
Figure 1.2 : Gènes impliqués dans la SLA	4
Figure 1.3 : Différentes couches de la peau normale humaine (hypoderme, derme et épiderme) ainsi que certains éléments présents dans ces couches.	13
Figure 1.4 : Couches que forme l'épiderme d'une peau normale humaine	14
Figure 1.5 : Spectre électromagnétique	17
Figure 1.6 : Certaines vibrations possibles entre des atomes et visibles en infrarouge	19
Figure 1.7 : Schématisation de l'absorption de rayonnements en spectroscopie infrarouge, Raman et en fluorescence	20
Figure 1.8 : Composantes optiques présentes dans un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier	21
Figure 1.9 : Spectre infrarouge des rayonnements émis par un corps noir.....	22
Figure 1.10 : Aspect du détecteur de type FPA et informations qu'il permet d'obtenir	23
Figure 1.11 : Différents types d'analyses possibles en infrarouge	24
Figure 1.12 : Transformation possible d'un spectre infrarouge afin de faciliter son analyse	25
Figure 1.13 : Spectre typique de matériel biologique contenant différents types de biomolécules.....	27
Figure 1.14 : Exemple de PCA avec des données en 2D pour illustrer le placement des PC	30
Figure 2.1 : FTIR spectra of tissue-engineered skin with variable thickness (2-25 μm)	44
Figure 2.2 : The FTIR absorption spectrum of human tissue-engineered skins	44
Figure 2.3 : Second derivative FTIR spectra of tissue-engineered skin samples on different targeted regions.....	46
Figure 2.4 : PCA and HCA based on wavenumbers surrounding the Amide II band (1499-1511, 1586-1598 cm^{-1}).....	50
Figure 2.5 : PCA and HCA analysis from wavenumbers attributed to lipid and extracellular matrix protein composition (2900-2916, 3001-3016, 3097-3109, 3116-3132 cm^{-1}).....	51
Figure 2.6 : TDP-43 delocalisation in ALS-derived TES quantified by ELISA	53

Liste des abréviations et des sigles

2D : Deux dimensions
3D : Tridimensionnel
ALS : Amyotrophic lateral sclerosis
ATR : Attenuated total reflection
BMAA : β -N-Méthylamino-L-alanine
CaF₂ : Fluorure de calcium
FDA : Food and Drug Administration
FPA : Focal plane array
FTIR : Fourier-transform infrared spectroscopy
HCA : Hierarchical cluster analysis
IGF : Insulin-like growth factor
IR : Infrarouge
IRM : Imagerie par résonance magnétique
IUPAC : International union of pure and applied chemistry
LCS : Liquide cérébrospinal
LOEX : Laboratoire d'organogénèse expérimentale
ME : Moelle épinière
MMP : Métalloprotéases matricielles
MNs : Neurones moteurs
OCT : Optimal cutting temperature compound
PC : Principal component
PCA : Principal component analysis
PRL : Peaux reconstruites en laboratoire
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SLAf : Sclérose latérale amyotrophique familiale
SLAs : Sclérose latérale amyotrophique sporadique
SLP : Sclérose latérale primaire
SNC : Système nerveux central
SOD1 : Superoxide dismutase [Cu-Zn]
TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43
TES : Tissue-engineered skin
UV : Ultraviolet
VEGF : Vascular endothelial growth factor
ZnSe : Séléniure de zinc

Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur de recherche, Dr François Gros-Louis, pour m'avoir accepté comme étudiant à la maîtrise, et ce, bien que mes connaissances antérieures soient assez différentes de celles des étudiants qu'il accepte normalement, ayant moi-même un baccalauréat en chimie. Je le remercie pour la liberté et la confiance qu'il m'a accordées tout au long de mon cheminement académique.

Par la suite, je tiens à remercier le Dr Asharf A. Ismail, un chercheur de l'Université McGill avec qui nous avons collaboré. Merci de m'avoir permis d'utiliser l'appareil de spectroscopie infrarouge sur lequel j'ai effectué les analyses de mes tissus reconstruits, pour le prêt de la lame de microscope compatible avec ce type d'analyse, ainsi que pour ses recommandations et son assistance en lien avec les analyses. Merci également à Tamao Tsutsumi, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr Ismail, qui m'a grandement aidé pour l'utilisation de l'appareil ainsi que pour le traitement et l'analyse des données spectroscopiques.

Je remercie également Lydia Touzel Deschênes, assistante de recherche de l'équipe, pour la formation en culture cellulaire qu'elle a su me dispenser ainsi que sur les différentes techniques de biologie cellulaire et moléculaire qu'elle m'a expliquées sur le plan théorique, ainsi que sur ses conseils pour les réaliser sur le plan pratique en laboratoire. Merci également d'avoir répondu à mes nombreuses questions tout au long de mon séjour dans le laboratoire et de m'avoir aidé dans certaines de mes manipulations.

J'aimerais aussi remercier Bastien Paré et Vincent Roy, les deux étudiants au doctorat de mon équipe de recherche qui ont su, tout comme Lydia, répondre à un grand nombre de mes questions. Ils ont tous les deux contribué à ma formation en me permettant de les aider dans certains aspects de leurs projets de recherche respectifs.

Je remercie également Sabrina Bellenfant (assistante de recherche) et Marie-Josée Baudet (professionnelle de recherche) de mon équipe de recherche élargie (équipe du Dr François Berthod) pour avoir répondu à mes questions lorsque Lydia était absente, ainsi qu'Aurélié Louit et Thiéry De Serres-Bérard, également de l'équipe du Dr François Berthod, pour les conversations que nous avons en salle de culture plusieurs fois par semaine.

Je remercie également énormément mon père, François Martel, ainsi que Sonia Engberts, pour leur soutien et leurs conseils de vie tout au long de mon parcours scolaire. Je remercie mon père de m'avoir permis de rester à la maison durant mon baccalauréat et ma maîtrise sans exiger de contribution financière. Cela m'a grandement aidé à rester concentré sur mon objectif à atteindre afin de terminer mes études universitaires. Je te remercie de m'avoir encouragé dans la poursuite de mes études et pour m'avoir rassuré dans mes moments de doutes.

Pour terminer, j'aimerais remercier mon copain David qui a toujours su garder une oreille attentive pour écouter mes péripéties de laboratoire. Merci de m'avoir aidé à rester motivé tout au long de ma maîtrise ainsi que pour avoir contribué à ensoleiller mes journées depuis notre rencontre. Mon existence serait bien moins plaisante sans toi à mes côtés.

Avant-propos

Le chapitre 2 de ce mémoire est un article qui porte le titre : « *Differential diagnosis of idiopathic amyotrophic lateral sclerosis using Fourier-transform spectrochemical analysis of patient-derived skins* ». Celui-ci sera soumis dans *FASEB Neurology* au cours des prochains mois.

J'ai produit la totalité des équivalents cutanés qui ont été utilisés pour les analyses. J'ai également généré les figures de cet article, j'ai écrit la première version et j'ai contribué à sa correction. J'ai par ailleurs contribué à l'acquisition des spectres infrarouges et j'ai analysé les résultats.

Tamao Tsutsumi a contribué à acquérir les spectres infrarouges, ainsi qu'à l'analyse de certains résultats. Bastien Paré a, quant à lui, contribué à ce projet lors de l'étape préliminaire en produisant des équivalents cutanés et en participant à l'acquisition des spectres infrarouges qui ont été utiles pour la mise au point de la technique.

Ashraf A. Ismail est le spécialiste en spectroscopie infrarouge à l'Université McGill et avec lequel nous avons collaboré. Il a contribué à ce projet avec son expertise dans le domaine pour guider le projet, en aidant à l'acquisition des spectres infrarouges, ainsi que pour leurs analyses.

Hélène T. Khuong est la neurochirurgienne responsable du prélèvement de la biopsie cutanée chez les patients ainsi que chez les individus sains afin que nous puissions en extraire les cellules et produire les tissus reconstruits. Nicolas Dupré est le neurologue qui suit les patients SLA et qui les invite à participer à ce projet de recherche. François Gros-Louis est mon directeur de recherche. Il a supervisé et guidé le travail effectué, en plus de participer à l'écriture de l'article et à sa correction.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La sclérose latérale amyotrophique

1.1.1 Description générale de la maladie

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative des motoneurones. Elle fut décrite pour la première fois par Charcot en 1874, et porte parfois le nom de Maladie de Charcot. Aux États-Unis, cette maladie est souvent nommée la maladie de Lou Gehrig, en l'honneur du célèbre joueur de baseball des Yankees de New York qui en est décédé en 1941. L'incidence est très faible pour les individus âgés de moins de 40 ans.¹ En Europe, en 2010, 2,16 personnes sur 100 000 ont été diagnostiquées avec cette maladie.² Aux États-Unis, la prévalence de cette maladie était estimée à 3,9 cas sur 100 000 en 2010-2011.³ En 2012, elle était de 4,7 cas sur 100 000 et de 5,0 cas sur 100 000 en 2013.⁴ Cette augmentation du nombre de cas de SLA pourrait s'expliquer par le vieillissement de la population, car il s'agit d'une maladie qui se développe tardivement. Un vieillissement de la population pourrait donc entraîner avec lui une élévation du nombre de cas rapportés.^{5,6}

La SLA se caractérise par la dégénérescence progressive des neurones moteurs (MNs) du cerveau et de la moelle épinière (ME), ce qui entraîne alors des faiblesses et de l'atrophie musculaire. La figure 1.1 permet de visualiser les neurones moteurs, supérieurs et inférieurs, qui seront affectés chez les patients atteints de la SLA. Ce sont ces neurones moteurs qui dégénéreront avec le temps.⁷ Les premières manifestations de la maladie peuvent être de nature bulbaire ou spinale.⁸ Dans 65 % des cas, les premiers symptômes des patients se développent dans leurs extrémités. Dans 30 % des cas, ils développent des symptômes de dysarthrie ou de dysphasie. Le 5 % des cas restants débutent par des symptômes de nature respiratoire.⁸ Les patients ont de plus en plus de problèmes de motricité, et ils décèdent généralement de paralysie respiratoire ou de pneumonie secondaire concomitante dans les deux à cinq ans suivant le diagnostic qui a été posé par le neurologue.⁸⁻¹⁰ Seulement 5 à 10 % des individus survivront plus de 10 ans.¹¹

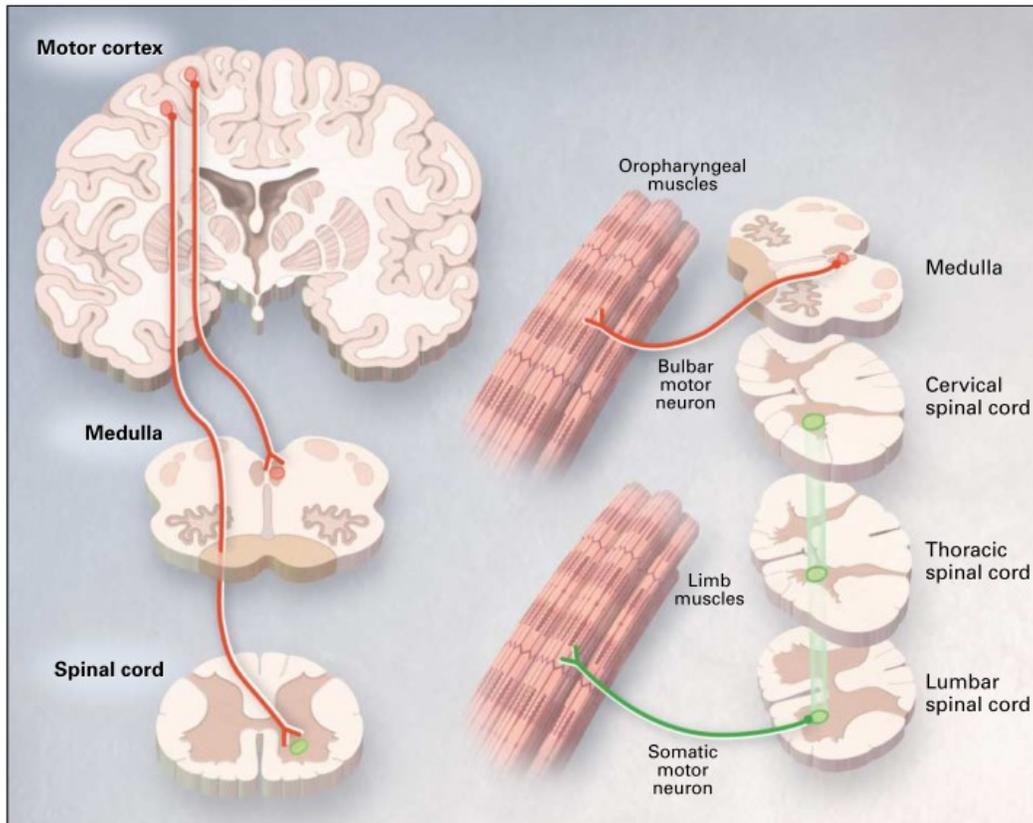


Figure 1.1 : Neurones moteurs qui subissent de la dégénérescence dans la SLA

Il est possible d'observer les neurones moteurs qui sont impliqués dans l'acheminement des influx nerveux provenant du cerveau et de la moelle épinière pour se rendre jusqu'aux muscles. Dans la SLA, les MNs supérieurs (du cerveau vers la ME), et les MNs inférieurs (de la ME vers les muscles), dégèrent ou sont affectés. Ce sont ces neurones moteurs qui dégèrent chez les patients atteints de la SLA. (image tirée de ⁷)

Contrairement à la sclérose latérale primaire (SLP) qui ne présente que des dommages aux neurones moteurs supérieurs, la SLA atteint également les neurones moteurs inférieurs. Les dommages aux neurones moteurs supérieurs affectent principalement les mouvements faciaux, la parole et la déglutition. Les dommages aux motoneurones inférieurs vont quant à eux principalement causer des problèmes de motricité au niveau des extrémités ainsi qu'au niveau de la respiration.¹²

La SLA est une maladie pour laquelle les causes sont toujours incertaines et pourraient être multifactorielles. Parmi les causes possibles pouvant mener à la SLA, les pistes étudiées sont le stress oxydatif, l'excitotoxicité de composés comme le glutamate, le dysfonctionnement mitochondrial, des anomalies au niveau d'éléments du cytosquelette et

du transport axonal, l'agrégation de protéines, la cascade inflammatoire, l'interaction avec les cellules non neuronales, ainsi que l'apoptose.¹³⁻¹⁵

Cette maladie se présente sous deux formes, la SLA familiale (SLAf) et la SLA sporadique (SLAs). Les patients sont diagnostiqués avec la SLAf dans les cas où des mutations génétiques connues comme causant la SLA sont présentes chez ces individus. Les autres cas sont quant à eux classés comme sporadiques en absence de mutations génétiques connues et en absence d'antécédents familiaux connus.¹⁶

1.1.2 SLA familiale

La forme familiale de la SLA représente 5 à 10 % de tous les cas de SLA.¹⁷ Elle se caractérise par des mutations au niveau de différents gènes. Environ 20 % des gens atteints de SLAf présentent une mutation du gène de la *superoxyde dismutase [Cu-Zn]* (*SOD1*), alors que les cas restants (80 %) impliquent d'autres gènes. Parmi les autres gènes impliqués les plus importants, il est possible de retrouver l'expansion de répétitions dans le gène de la protéine *C9ORF72*¹⁸, de même que des mutations sur les gènes associés à *TARDBP* et *FUS*.¹⁹ Il y a près de 25 gènes dans lesquels des mutations associées à la SLA ont été identifiées.^{20,21} Les différentes mutations connues à ce jour et impliquées dans la SLA sont présentées à la figure 1.2.

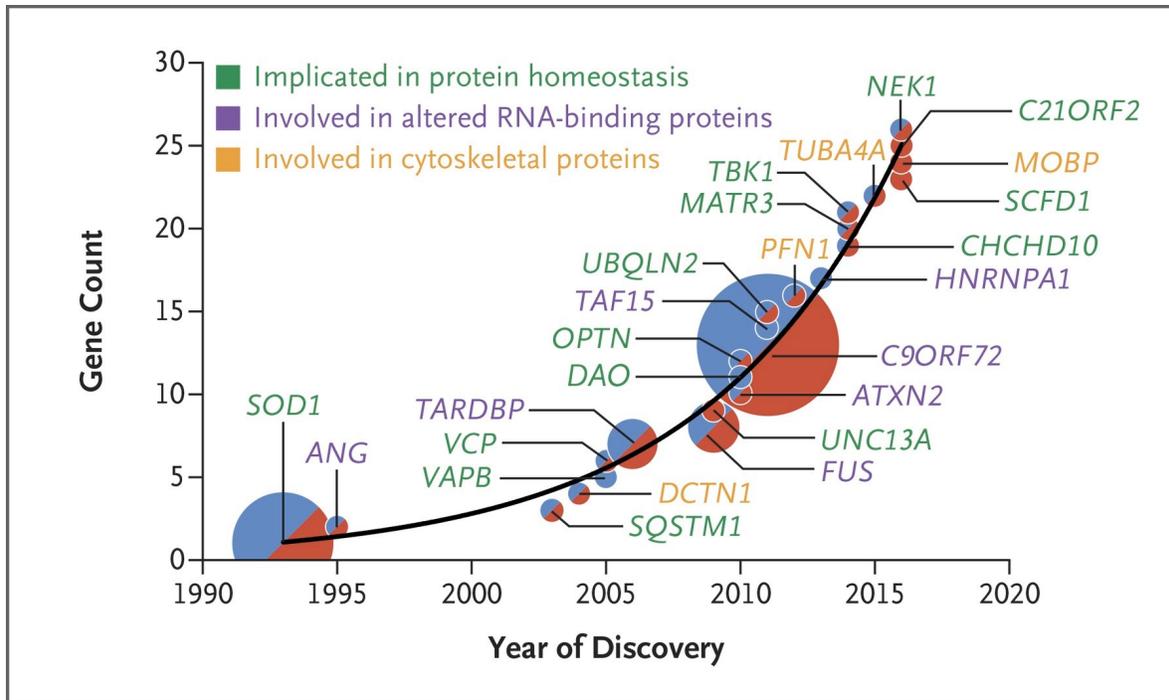


Figure 1.2 : Gènes impliqués dans la SLA

Représentation graphique du nombre de gènes associés à la SLA ainsi que l'année de leur découverte. La taille des cercles est proportionnelle à la quantité de cas de SLA correspondant à ce gène. Les cercles bleus correspondent à des gènes associés uniquement à la SLAf, les rouges uniquement à la SLAs, et ceux qui sont des deux couleurs sont associés à la fois à la SLAf et la SLAs. (image tirée de ²¹)

1.1.3 SLA sporadique

La forme sporadique correspond à la vaste majorité des cas, soit de 90 à 95 %.²² Il n'y a pas d'antécédents familiaux de SLA, et ce sur 3 générations, lorsque les cas sont classés comme sporadiques. Les causes favorisant l'apparition de cette forme de la maladie semblent être multifactorielles, dont plusieurs facteurs étant de nature environnementale. Parmi ces éléments, plusieurs facteurs ont été étudiés, comme la cyanotoxine β -N-Méthylamino-L-alanine (BMAA)²³, les métaux lourds tels que le plomb, le mercure et le sélénium, ainsi que l'exposition aux pesticides. Les liens de causalité ne sont cependant pas encore clairement établis.²⁴ Il existe également d'autres causes possibles qui seraient également associées à la SLAs. Par exemple, des traumatismes crâniens, la diète, ainsi que des facteurs de comportement et d'occupation.²⁵ Pour qu'une forme de SLA soit dite sporadique, les générations précédentes ne doivent pas présenter de mutations au niveau des gènes présentés à la figure 1.2.²⁶ Certains cas de SLAs pourraient cependant être des cas de SLAf pour lesquelles il n'y a pas d'antécédents familiaux, de par une pénétrance

des mutations inférieure à 100 %, ou par des familles contenant peu d'individus.²⁷ Des chercheurs ont élaboré un modèle statistique permettant de déterminer les pourcentages de SLAs et SLAf en fonction de la taille des familles ainsi que de la pénétrance. En fonction de ces deux paramètres, le nombre de cas sporadiques en apparence varie grandement. Selon ce modèle, un variant avec une pénétrance de 0,5 causera une SLA apparente dans 12 % des cas dans une famille de 10, alors que le pourcentage est de 80 % si la taille de la famille est d'un seul individu.²⁷ Une pénétrance faible d'un gène causant la SLA et une famille de petite taille feront donc en sorte que des cas de SLAf ne seront pas visibles.²⁸ Selon certaines études, dans 50 à 75 % des cas de SLAf, seulement deux membres de la famille étaient atteints.^{29,30} Ce faible nombre d'individus atteints dans une même famille permet de constater la complexité de la détection de cas familiaux et permet d'expliquer le nombre élevé de cas apparemment sporadiques. Dans une famille, une personne d'une génération antérieure peut également être décédée d'une autre cause que la SLA avant l'apparition des premiers symptômes. De ce fait, les générations futures peuvent être porteuses de mutations connues causant la SLA sans pour autant avoir connaissance de cas familiaux. Un manque d'informations sur les antécédents familiaux mène donc à une mauvaise stratification des patients.²⁶

1.1.4 Caractéristiques pathologiques de la SLA

La SLA entraîne la dégénérescence et la mort des MNs du cerveau et de la ME. Elle s'accompagne de neuroinflammation qui se caractérise par l'infiltration de cellules immunitaires, de même que par l'activation des microglies et des astrocytes.^{19,31,32} Par exemple, des recherches ont montré que les astrocytes sécrèteraient des facteurs neurotoxiques qui entraîneraient sélectivement la mort des neurones moteurs.³³ Par ailleurs, les oligodendrocytes auraient également un rôle à jouer dans la pathologie de la SLA.³⁴

L'agrégation de protéines cytoplasmiques est une caractéristique commune aux cas de SLA familiale et sporadique. Notamment, plus de 90 % des patients SLAs présentent une délocalisation de la protéine TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), en plus de tous les patients SLAf à l'exception des cas positifs SOD1.³⁵ Habituellement, cette protéine se retrouve majoritairement dans le noyau des cellules. Chez les patients SLA, TDP-43 se retrouve en plus grande proportion dans le cytoplasme et elle a tendance à former des agrégats.^{36,37} Les causes et les conséquences de cette délocalisation sont cependant

encore obscures et peu connues.³⁸ Il a aussi été observé que les inclusions cytoplasmiques de la protéine TDP-43 sont ubiquitinées dans les neurones moteurs de la moelle épinière.³⁹ Le système nerveux central (SNC) serait d'ailleurs particulièrement sensible au mauvais repliement de cette protéine.⁴⁰ Un mauvais fonctionnement de la voie ubiquitine pourrait par ailleurs être impliqué dans la SLA, de même que pour d'autres maladies neurodégénératives.⁴¹ Des recherches ont également été menées sur les neurofilaments, et il semblerait que les niveaux des chaînes légères et lourdes dans le liquide cérébro-spinal pourraient être utilisés comme de potentiels biomarqueurs de la SLA.⁴²

Comme pour la forme familiale de la maladie, la protéine SOD1 est aussi impliquée dans un certain nombre de cas.⁴³ Cette protéine adopte souvent un mauvais repliement dans la SLA. Certaines mutations du gène entraînent des changements au niveau de la conformation de SOD1, qui sont toxiques pour l'organisme, et qui pourraient être responsables du déclenchement de la maladie.⁴⁴ Des recherches ont également démontrées que ces mauvais repliements étaient également retrouvés dans des cas de SLAs.^{43,45}

1.1.5 Traitements disponibles

Il n'existe à l'heure actuelle aucun médicament efficace permettant de guérir la SLA.⁴⁶ Cependant, un seul médicament est présentement utilisé pour prolonger la vie des patients : le Riluzole. Son efficacité est toutefois très limitée, puisqu'il permet uniquement de prolonger l'espérance de vie de certains patients de deux à trois mois.⁴⁷ Le fonctionnement de ce médicament est aussi toujours mal compris et il n'est pas clair si le médicament fonctionne uniquement chez certains groupes de patients ou s'il fonctionne uniquement sur des cas qui sont encore en début de progression.⁴⁸ Un nouveau médicament, Edaravone (Radicava), vient récemment d'être approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis pour le traitement de la SLA. Il était déjà approuvé depuis deux ans au Japon et en Corée du Sud.⁴⁹ Cependant, son efficacité est limitée, tout comme le Riluzole, et les résultats ne sont pas probants.⁵⁰

Le faible nombre de substances thérapeutiques en essais présentement est d'une part dû au faible nombre de cibles validées pour de potentiels médicaments, et d'autre part à l'absence de biomarqueurs, qu'ils soient pour stratifier adéquatement les patients, pour détecter précocement la maladie et pour suivre la progression de la maladie lors d'études

cliniques.^{51,52} Pour qu'une étude clinique soit significative, il est nécessaire d'avoir des groupes contenant des individus présentant des manifestations similaires de la maladie ainsi que des marqueurs prédictifs de l'évolution de la maladie autre que la survie des patients. Chez les patients atteints de la SLA, le diagnostic parfois incertain et le manque de biomarqueurs fiables pour stratifier les patients rendent difficile la formation de groupes homogènes.^{51,53} De plus, le diagnostic peut prendre jusqu'à un an avant d'être posé par le neurologue, ce qui retarde significativement l'entrée dans une étude clinique ou un traitement à l'aide du Riluzole.^{53,54}

Différentes recherches se font actuellement afin de trouver de nouveaux composés qui pourraient s'avérer efficaces. Des chercheurs étudient l'effet de différents facteurs de croissance, comme l'insulin-like growth factor (IGF) ou le brain-derived growth factor, sur des modèles reproduisant la SLA. Les effets positifs qui étaient observés dans les modèles n'ont malheureusement pas montré de résultats significatifs lors d'études cliniques chez l'humain.^{46,55,56} Une autre approche présentement étudiée est l'utilisation de cellules souches pour fournir aux cellules les facteurs trophiques nécessaires ainsi que pour préserver ou remplacer des cellules qui pourraient être endommagées.^{46,56-58}

Il reste donc beaucoup de chemin à parcourir avant de parvenir au moment où un médicament efficace sera disponible. De nombreuses recherches se font présentement pour découvrir de nouvelles cibles sur lesquelles des substances thérapeutiques pourraient agir. Parmi les cibles ou les avenues étudiées, il est possible de retrouver des cibles du glutamate, l'accumulation, l'agrégation et l'élimination de protéines, les espèces réactives d'oxygènes, l'inflammation, les cibles d'ARN, les facteurs de croissance, la thérapie cellulaire à l'aide de cellules souches, les vaccins, ou les muscles.⁵⁹⁻⁶¹

1.1.6 Biomarqueurs et méthodes de diagnostic

Les biomarqueurs peuvent se regrouper en différentes catégories : les biomarqueurs de diagnostic, génétiques, de pronostic, prédictifs et pharmacodynamiques. Tout comme les biomarqueurs génétiques, les biomarqueurs de diagnostic permettent de déterminer que le patient est atteint d'une maladie précise. Ceux de pronostic permettent de suivre l'évolution de la maladie et ceux de prédiction permettent de prédire l'évolution de la maladie.⁶²⁻⁶⁴ Dans le développement de nouveaux médicaments, il y a les biomarqueurs pharmacodynamiques qui permettent de mesurer la réponse biologique à un nouveau traitement et qui permettent de vérifier que le médicament agit sur la cible désirée.⁵³

Une multitude de biomarqueurs peuvent être étudiés et ils se retrouvent dans différents endroits du corps humain. Il est possible de penser aux fluides biologiques comme le liquide cébrospinal (LCS), le sang ou l'urine, à la peau, aux muscles, aux marqueurs électrophysiologiques, et d'autres qui sont détectables par des techniques d'imagerie neuronale comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM).^{15,52,63,65} Il est parfois utile et nécessaire de combiner plusieurs biomarqueurs pour être en mesure de diagnostiquer certaines pathologies.⁶³ Pour la SLA cependant, il n'existe actuellement aucun biomarqueur permettant un diagnostic, de même que pour prédire l'apparition de la maladie ou pour mesurer les effets d'un traitement pharmacologique.⁶²

La recherche de biomarqueurs est un domaine très important pour cette maladie. Une étude publiée en 2000 a démontré que 23 % des individus ont reçu un diagnostic « probable » de SLA.⁶⁶ Cette incertitude sur le diagnostic montre qu'il est important de trouver des techniques permettant de diagnostiquer la maladie de manière plus précise. Un modèle de prédiction de la SLA a d'ailleurs été développé permettant un classement malade/non-malade de 90,4 %. Ce modèle incorpore des éléments comme la consommation d'alcool, les habitudes fumeurs ou non-fumeurs des participants, l'expression du gène *VEGF* (vascular endothelial growth factor), et bien d'autres.⁶⁷ Cependant, cela reste de la prédiction et il ne s'agit pas d'une technique de diagnostic fiable et assurée.

Le diagnostic se fait présentement par un neurologue qui se base sur l'historique familial du patient, sur divers examens physiques et électrophysiologiques, ainsi que sur des techniques d'imagerie.^{68,69} Les critères *El Escorial* sont utilisés pour standardiser le diagnostic parmi tous les praticiens.⁷⁰ Les techniques d'imagerie comme l'IRM sont employées régulièrement afin d'éliminer certaines maladies qui peuvent provoquer des symptômes similaires à ceux de la SLA.⁷¹ Les patients voient en moyenne jusqu'à trois médecins différents avant que le diagnostic ne tombe, et 52 % des patients ont reçu au préalable un diagnostic alternatif avant celui de la SLA. En moyenne, le délai avant de recevoir un diagnostic est de 11,5 mois.⁷² De plus, selon l'endroit de départ de la maladie, le délai de diagnostic peut aller jusqu'à 2,5 ans pour les cas qui ont débuté au niveau des membres et de 1,25 an pour les cas partant du bulbe.⁷³ Des faux positifs et négatifs peuvent survenir et plusieurs années peuvent passer avant que le diagnostic approprié soit posé.⁷⁴ Le premier médecin consulté est un généraliste dans la majorité des cas, et

une part importante du délai de diagnostic est dû au temps requis pour que le généraliste suggère la consultation d'un neurologue.⁷⁵

Un meilleur diagnostic permettrait aux patients d'être intégrés plus facilement et rapidement aux études cliniques en cours ou futures.^{52,66} Cela permettrait de diagnostiquer plus rapidement la maladie et de tester de nouvelles approches thérapeutiques.⁵⁶ Comme le diagnostic est souvent incertain pendant de nombreux mois, les patients ne peuvent pas prendre part à des études cliniques. Dix pourcent des patients décédés de la SLA lors d'une étude de population n'étaient pas éligibles à prendre part à une étude clinique due au diagnostic « probable » ou « suspecté » qu'ils ont reçu.⁶⁶

1.2 La peau pour étudier la SLA

La SLA est une maladie qui affecte les neurones moteurs.⁷⁶ Ceux-ci sont difficiles à étudier sur un individu en vie. Il est possible d'obtenir des biopsies, mais elles sont relativement complexes à obtenir en plus d'y avoir possibilités de complications.⁷⁷ Des études se penchent déjà sur les neurones moteurs⁷⁸, alors que d'autres se penchent plutôt sur l'étude de structures qui sont reliées et qui permettraient d'approfondir les connaissances de cette maladie. Par exemple, des équipes se penchent sur l'étude de la barrière hématoencéphalique afin d'étudier les interactions entre les différents types cellulaires, les structures formant cette barrière ainsi que leurs liens avec la pathologie⁷⁹. D'autres équipes ont, quant à elles, étudié la SLA dans la peau.^{80,81} Pour certaines maladies neurologiques, une biopsie de peau peut d'ailleurs être prélevée pour aider à diagnostiquer certaines pathologies.⁸²

Le reste des tissus du système nerveux s'obtient une fois le patient décédé, ce qui est utile pour étudier les conséquences de la maladie et découvrir les effets sur le corps humain.¹⁰ Cependant, ce n'est pas d'une grande utilité dans le cas où il est souhaité tester l'effet de nouveaux médicaments pour prévenir ou retarder la mort, ou afin d'essayer de diagnostiquer la maladie sur un individu en vie.

Il est donc nécessaire de disposer de différents modèles pour reproduire la pathologie en laboratoire afin d'éviter des procédures risquées et douloureuses pour le patient. Il existe des modèles animaux qui sont couramment utilisés pour l'étude de cette pathologie, comme l'utilisation de souris ou de rats.⁸³ Ils ont l'avantage de reproduire un environnement complexe comme celui du corps humain tout en étant faciles à étudier.

Ces modèles possèdent cependant des désavantages, comme celui d'être beaucoup plus dispendieux que d'autres méthodes d'analyses.⁸⁴

1.2.1 Lien entre la peau et le SNC : le développement embryonnaire

Au lieu d'étudier directement les neurones moteurs, il est intéressant de se tourner vers d'autres sources de matériel biologique provenant de l'humain. Il serait possible de travailler sur l'urine ou le sang afin de tenter de trouver de nouveaux biomarqueurs dans ces fluides. En effet, ceux-ci sont plus faciles d'accès que les neurones moteurs ou le liquide cérébro-spinal. C'est d'ailleurs ce sur quoi portent de nombreuses recherches au sein de groupes de recherche étudiant des maladies neurodégénératives.^{62,85} Puisque ces fluides sont déjà abondamment étudiés, il est intéressant de se tourner vers un autre type de matériel biologique afin d'étudier la SLA : la peau. Bien que différente du tissu du SNC, la peau présente de nombreuses similitudes avec les tissus du système nerveux.

Lors du développement embryonnaire, plusieurs étapes sont requises afin de former un organisme pluricellulaire. Tout d'abord, il y a l'étape de la fécondation qui permet la formation du zygote. Vient ensuite la segmentation qui permet au zygote de passer du stade d'une cellule à celui de plusieurs cellules. Il y aura ensuite formation de la blastula, suivie de la gastrulation qui permet la formation de la gastrula. Celle-ci est composée de trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La dernière étape, l'organogénèse, permettra aux différents feuillets embryonnaires de former les différents organes et structures de l'organisme. Le tableau 2.1 illustre les différents tissus qui découleront de chacun de ces feuillets.^{86,87}

Tableau 1.1 : Les trois différents feuillets embryonnaires et les tissus qui découleront de ces feuillets

Différents feuillets embryonnaires et les tissus qui sont issus de chacun de ces feuillets. Il est possible d'observer que l'ectoderme formera l'épiderme de la peau ainsi que les tissus du système nerveux. (tableau produit à partir de ⁸⁶)

Ectoderme (couche externe)	Mésoderme (couche intermédiaire)	Endoderme (couche interne)
<ul style="list-style-type: none"> • Épiderme de la peau et annexes cutanées (notamment glandes sébacées, follicules pileux) • Système nerveux • Hypophyse, médulla surrénale • Mâchoire et dents • Cellules germinales 	<ul style="list-style-type: none"> • Systèmes osseux et musculaire • Systèmes cardiovasculaire et lymphatique • Systèmes reproducteur et urinaire (sauf les cellules germinales) • Derme de la peau • Cortex surrénal 	<ul style="list-style-type: none"> • Muqueuses du tube digestif et organes annexes (foie, pancréas) • Muqueuses du système respiratoire, du système urinaire et des voies génitales • Glande thyroïde, glandes parathyroïdes, thymus

Comme illustré au tableau 2.1, le feuillet de l'ectoderme est celui qui permettra de former, entre autres, l'épiderme de la peau et les tissus du SNC. Puisque les deux types de tissus proviennent du même feuillet, cela leur confère des similitudes. Cela représente donc une avenue intéressante pour l'étude de maladies neurodégénératives provoquant des dommages au niveau du SNC. L'hypothèse derrière l'utilisation de la peau comme matériel biologique plus accessible pour l'étude de la SLA vient donc du fait que des changements au niveau de la peau pourraient être présents tout comme il y a présence de changements au niveau des tissus du SNC.

Certaines études ont d'ailleurs démontré que la peau des patients atteints de la SLA présentait des caractéristiques différentes par rapport à celle d'individus sains.⁸⁸ Elle présente des altérations au niveau des tissus conjonctifs et des vaisseaux sanguins.⁸⁰ Des peaux reconstruites en laboratoire par génie tissulaire ont permis d'observer une différenciation épidermique anormale, des défauts dans la structure de la peau reconstruite au niveau de la jonction dermo-épidermique, une délamination, une infiltration de kératinocytes dans le derme, une désorganisation des fibres de collagènes ainsi qu'une délocalisation de la protéine TDP-43 du noyau vers le cytoplasme.⁸¹ Une autre équipe de

recherche a également étudié la protéine TDP-43 dans des biopsies cutanées provenant de patients SLA, et a observé la délocalisation de la protéine au niveau de la couche basale chez un des patients.⁸⁹ Bien que la protéine voyage constamment du noyau au cytoplasme, sa localisation principale est au noyau.⁹⁰ Une autre équipe de recherche étudiant la SLA a montré que l'expression de la protéine TDP-43 était plus importante dans la peau des patients SLA.⁹¹ Des études sur des souris ont également permis de mettre en relation le niveau de certaines métalloprotéases matricielles (MMP), MMP-2 et MMP-9, dans la moelle épinière et dans la peau.^{92,93} Ces éléments illustrent donc un lien entre le SNC et la peau, ce qui montre qu'elle est utile pour l'étude de maladies neurodégénératives.

1.2.2 Avantages et inconvénients d'étudier la peau

La peau possède de nombreux avantages à être étudiée par rapport aux tissus nerveux. Tout d'abord, elle est beaucoup plus facile d'accès. Il est plus facile d'obtenir une biopsie cutanée de peau que d'en obtenir une de tissus nerveux alors que le patient est toujours en vie.⁹⁴⁻⁹⁶ Cette biopsie de peau est peu douloureuse pour le patient, ce qui présente un avantage énorme lors du recrutement de nouveaux patients pour participer à des projets de recherche.⁹⁷

La culture de cellules de peau, que ce soit les kératinocytes de l'épiderme⁹⁸ ou les fibroblastes du derme^{99,100}, est aisée à mettre en place.^{101,102} Une petite biopsie de quelques millimètres seulement permet d'obtenir un très grand nombre de cellules, puisqu'elles peuvent être cultivées sur plusieurs passages. Ces cellules peuvent par la suite être utilisées pour procéder à des analyses biochimiques et biologiques.¹⁰³ Une biopsie de 1 cm² peut être amplifiée jusqu'à 10 000 fois pour obtenir une superficie de cellules similaire à celle du corps humain adulte.¹⁰⁴ Leur culture est aussi moins dispendieuse et complexe que la culture de neurones moteurs, ce qui représente un autre avantage considérable.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Cela permet d'obtenir du matériel biologique renouvelable afin d'éviter de prélever des échantillons à répétition sur le patient, ce qui rend cette technique très avantageuse pour leur qualité de vie.

Bien sûr, l'étude de la peau présente des désavantages. Puisqu'il ne s'agit pas du même tissu que le tissu nerveux, il existe des différences au niveau des types cellulaires présents. Des signes de la maladie visibles dans les tissus du SNC peuvent ne pas être visibles dans la peau des patients. Cependant, l'inverse est vrai également et des

éléments de la SLA pourraient être visibles dans la peau, alors qu'ils ne le sont pas dans le SNC. L'utilisation de la peau reste donc une alternative très intéressante afin d'obtenir des cellules pour l'étude de cette maladie.⁸⁰

1.3 La peau

La peau se compose de trois couches distinctes : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Ces différentes couches sont illustrées à la figure 1.3.

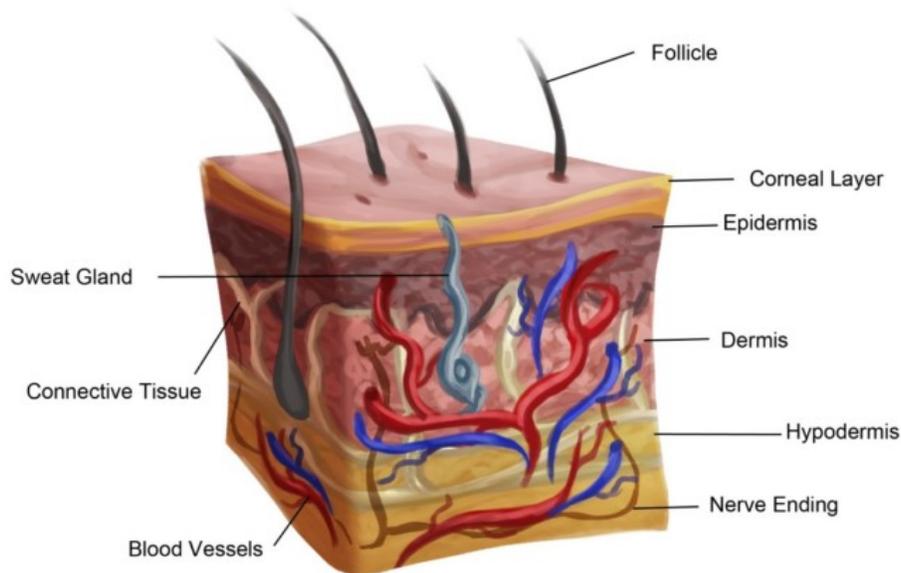


Figure 1.3 : Différentes couches de la peau normale humaine (hypoderme, derme et épiderme) ainsi que certains éléments présents dans ces couches.

Les trois couches de la peau (hypoderme, derme et épiderme) sont visibles, ainsi que certaines structures essentielles, comme les vaisseaux sanguins, les glandes sudoripares, les poils et les nerfs. (image tirée de ¹⁰⁸)

L'hypoderme est principalement composé de tissus adipeux assurant isolation et amortissement entre la peau, les muscles et les os.¹⁰⁸ Le derme permet quant à lui de faire la connexion entre l'hypoderme et l'épiderme.¹⁰⁹ Il est principalement constitué de fibroblastes ainsi que de tissus conjonctifs. Ce tissu conjonctif porte couramment le nom de matrice extracellulaire, et se compose majoritairement de collagène de type I ainsi que d'élastine, deux protéines qui sont essentielles au maintien des propriétés mécaniques.¹¹⁰ Il y a aussi présence de glandes sébacées, de glandes sudoripares, de follicules pileux ainsi que de capillaires sanguins.^{108,111}

La couche externe de la peau est l'épiderme. Son rôle est d'être l'intermédiaire entre le monde extérieur et l'intérieur du corps humain. Il a d'abord un rôle de protection en agissant comme barrière.¹⁰⁸ De plus, il est aussi sensible aux activités se déroulant à l'extérieur du corps, comme les changements de température, les contacts physiques ou les contacts avec divers agents chimiques.^{112,113} L'épiderme est principalement composé de kératinocytes et de mélanocytes. Les mélanocytes permettent la synthèse de pigments de mélanines afin de protéger le corps contre les rayonnements ultraviolets (UV).^{114,115} Les kératinocytes sont les cellules qui vont former la majorité de l'épiderme. Elles vont proliférer et se différencier en cinq couches distinctes qui sont schématisées à la figure 1.4. Les cinq couches sont la lame basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche de transition ainsi que la couche cornée.⁹⁸

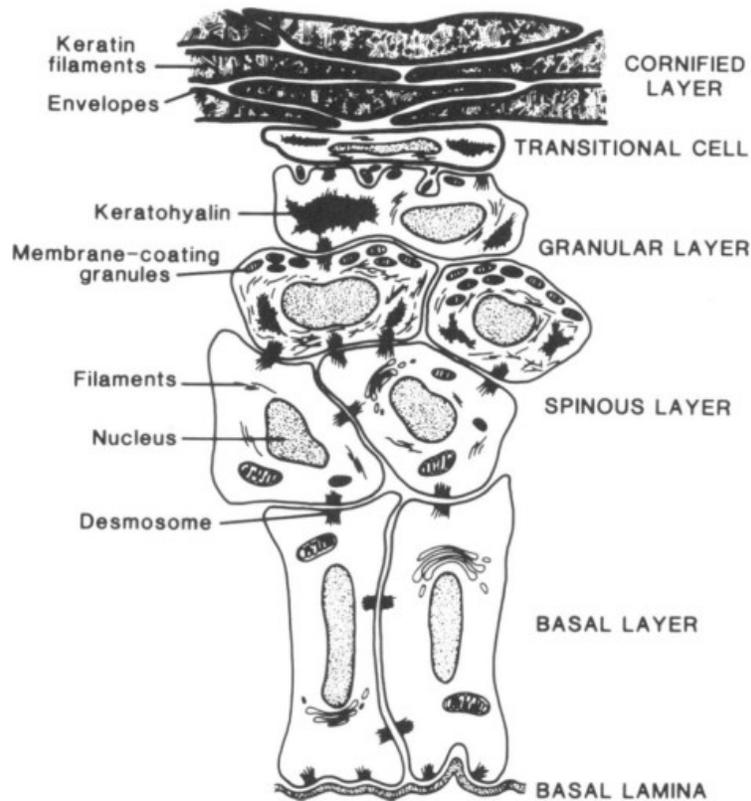


Figure 1.4 : Couches que forme l'épiderme d'une peau normale humaine

Cette figure illustre les cinq couches qui composent l'épiderme de la peau humaine. La couche cornée, la couche de transition, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale y sont illustrées. Ces différentes couches sont formées à partir des kératinocytes se situant au niveau de la couche basale. Ceux-ci vont migrer et se différencier en se déplaçant vers l'extérieur du corps. (image tirée de ⁹⁸)

1.4 Le génie tissulaire

Le génie tissulaire est un domaine de recherche multidisciplinaire qui utilise du matériel biologique issu d'un individu afin de recréer ou de réparer un organe ou un tissu.^{104,116,117}

Ces tissus recréés peuvent ou non être destinés à une greffe à la suite de leurs productions.¹¹⁸

Un des usages très communs du génie tissulaire est la reconstruction tissulaire pour les grands brûlés. Une biopsie de peau est prélevée sur la personne brûlée à un endroit du corps qui n'a pas été endommagé par les flammes. Les cellules sont par la suite extraites, puis cultivées pour produire le tissu qui pourra être greffé.^{104,119}

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour la production des peaux reconstruites pour les greffes. Tout d'abord, les tissus peuvent être complètement autologues, c'est-à-dire qu'ils ne comportent aucun matériau exogène. Ces tissus ont l'avantage de ne pas être rejetés par l'organisme, puisque les éléments le constituant ont été extraits de l'organisme sur lequel il sera greffé. Il n'y a donc pas de risques de rejets. Certains tissus reconstruits peuvent aussi inclure des matériaux exogènes pour reproduire des éléments du tissu natif. Un matériau d'échafaudage peut être incorporé pour donner un support aux cellules.¹²⁰⁻¹²² Ces matériaux sont souvent présents pour reproduire la matrice extracellulaire. De nombreux composés existent pour remplir ce rôle. Parmi ceux-ci, le chitosane est très populaire pour former des cavités poreuses dans lesquelles peuvent se loger les cellules.^{121,123,124} Il est également possible de penser au MatrigelTM qui est employé très fréquemment aussi.¹²⁵⁻¹²⁷ Une autre alternative est d'utiliser des matrices décellularisées.¹²⁸⁻¹³¹ Des techniques de bioimpressions peuvent également être employées lors de la production de tissus reconstruits pour donner des formes et des propriétés particulières aux tissus.¹³²⁻¹³⁴

Cependant, l'ajout de composés exogènes rend les tissus plus risqués à greffer, de par les risques accrus de rejets. De plus, il est possible que ces composés entraînent une dérégulation de l'expression de certains gènes.¹³⁵ Pour pallier à ce problème, le modèle par autoassemblage développé au Laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX) permet de recréer un tissu à partir de cellules humaines sans ajout de composés exogènes.^{118,136} Cette technique permet de recréer une peau reconstruite similaire au niveau histologique à celle de la peau normale humaine.¹³⁷ Cette technique se base sur la

capacité de certaines cellules à sécréter leur propre matrice extracellulaire. C'est le cas des fibroblastes dermiques qui, en présence d'acide ascorbique, s'écèlent des protéines de la matrice extracellulaire. En les cultivant suffisamment longtemps, il est possible d'obtenir des feuillets manipulables qui peuvent par la suite être employés pour la greffe de grands brûlés, pour le développement de modèles tridimensionnels (3D) pour l'étude de différentes pathologies^{81,118,137} ou pour tester l'effet de substances chimiques.^{138,139}

Plusieurs types de peaux reconstruites peuvent être produits. En fonction des besoins et des applications visés par ces peaux, il est possible de reconstruire uniquement un derme, uniquement des cellules de l'épiderme, ou bien une bicouche composée d'un derme et d'un épiderme.¹⁰⁸ Différents modèles ont déjà été créés par génie tissulaire. Parmi ceux-ci, il est possible de retrouver le modèle phototype et l'irradiation UV, le modèle du mélanome, le modèle de guérison de plaies cutanées, le modèle psoriasique, le modèle de plaies cutanées, le modèle de peau pleine épaisseur et le modèle *ex vivo*.¹⁴⁰

L'exemple de la greffe n'est qu'un seul parmi d'autres qui permettent de comprendre l'utilité de la recherche dans le domaine du génie tissulaire. Différents types de tissus peuvent être d'ailleurs être produits selon les besoins et les recherches. Par exemple, il est possible de recréer du tissu adipeux¹⁴¹, des tissus osseux^{123,142}, des vaisseaux sanguins^{128,143-146}, des cornées¹⁴⁷, des tissus nerveux¹⁴⁸ ou même des valves cardiaques¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Il existe bien sûr d'autres utilités au génie tissulaire que celle de la production de tissus ou d'organes destinés à être greffés. Il est également possible de produire des modèles qui miment des maladies afin d'en étudier les fonctionnements, les mécanismes d'actions, et même de tester de nouvelles substances à potentiel thérapeutique.^{81,152}

1.5 Spectroscopie infrarouge

Dans tous les cas de SLA, des agrégats pathologiques sont retrouvés chez les patients atteints.^{21,36,76} Pour détecter de tels agrégats, la technique de spectroscopie infrarouge a été envisagée pour sonder les tissus biologiques et détecter ces agrégats. Cette technique permet d'observer, entre autres, des changements dans la structure secondaire des protéines qui accompagne l'agrégation de certaines d'entre-elles.¹⁵³⁻¹⁵⁵

1.5.1 Théorie et fonctionnement

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique d'analyse qui permet de sonder des échantillons avec des rayonnements dans le domaine de l'infrarouge. Des applications chimiques sont possibles pour obtenir des spectres d'absorbance permettant de déduire la structure d'un composé. Il est également possible d'obtenir des informations sur la composition en biomolécules dans le cas où l'échantillon est de nature biologique. Cette méthode est non destructive, c'est-à-dire que les échantillons peuvent être récupérés à la fin des analyses.¹⁵⁶

Le spectre électromagnétique se divise en plusieurs domaines distincts, comme il est possible d'observer à la figure 1.5. Chaque domaine possède une plage de longueurs d'onde ainsi qu'un nom plus commun qui le définit. Par exemple, la région la plus énergétique (à gauche sur la figure 1.5) correspond aux rayons gamma, qui sont très pénétrants et de très hautes énergies. À l'opposé sur le spectre, il est possible de retrouver des ondes de plus faible énergie, les microondes et les ondes radios. Nos yeux sont quant à eux capables de détecter les rayonnements de longueurs d'onde situées dans la région entre 400 et 760 nm.¹⁵⁷ Les rayons UV qui nous proviennent du soleil sont plus énergétiques que la lumière visible. Dans la spectroscopie infrarouge, il s'agit des infrarouges qui sont utilisés. Ceux-ci sont situés dans une région légèrement moins énergétique que les rayonnements visibles.¹⁵⁸

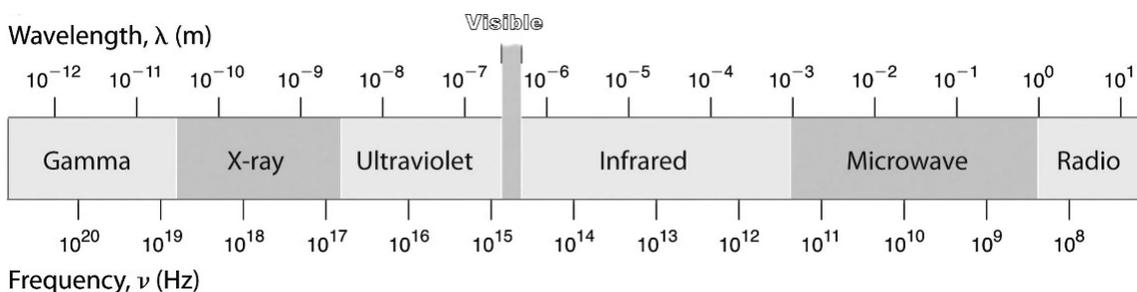


Figure 1.5 : Spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique peut se diviser en plusieurs grandes régions. Une région très importante et très restreinte du spectre correspond à la partie qui est visible par nos yeux, entre 400 et 760 nm¹⁵⁷. Les rayonnements infrarouges utilisés en spectroscopie infrarouge sont un peu moins énergétiques que les rayonnements visibles. (image tirée de ¹⁵⁸)

Différents types de rayonnements peuvent être utilisés pour sonder des échantillons. Des solutions colorées peuvent être analysées par spectroscopie visible pour effectuer des

dosages par exemple. Il est aussi possible d'utiliser les rayons UV pour générer de la fluorescence dans un composé et ainsi obtenir des spectres d'absorption et d'émission qui peuvent fournir des informations importantes sur la structure d'un composé. Dans le cas des rayonnements infrarouges, ils sont utilisés pour obtenir des spectres d'absorption permettant d'obtenir de l'information sur la structure d'un composé au niveau moléculaire.¹⁵⁹

Habituellement, les unités des spectres d'absorption infrarouges sont les nombres d'ondes, exprimés en cm^{-1} . Il s'agit de la réciproque de la longueur d'onde ($\nu = 1/\lambda$). De plus, par convention selon l'« International Union of Pure and Applied Chemistry » (IUPAC), les nombres d'ondes vont au augmentant de droite à gauche.¹⁵³

Le fonctionnement de la spectroscopie infrarouge se base sur le principe que les molécules ne sont pas statiques. À tout moment, les liaisons entre les molécules peuvent vibrer. L'absorption de photons avec des énergies précises provoquera la vibration de ces liaisons dans les molécules présentes dans l'échantillon analysé.¹⁵⁹ Un schéma des différentes vibrations possibles est présent à la figure 1.6 et permet d'observer visuellement celles-ci.

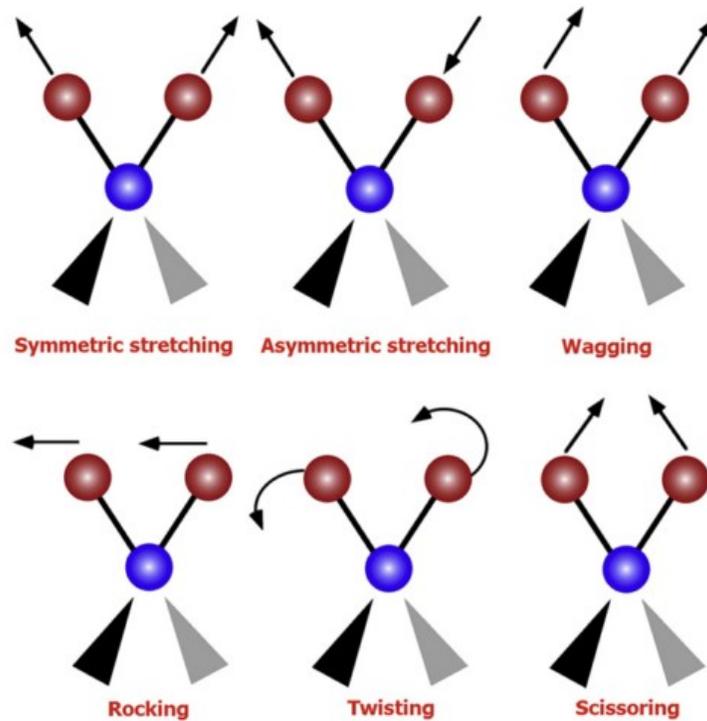


Figure 1.6 : Certaines vibrations possibles entre des atomes et visibles en infrarouge

Différents types de vibrations qui se produisent entre des atomes et qui sont visibles en infrarouge. Ces vibrations sont toutes actives en infrarouge si elles provoquent un changement dans le moment dipolaire de la molécule. (image tirée de ¹⁶⁰)

La figure 1.7 permet de comprendre le principe derrière la spectroscopie d'absorption. Cette figure illustre les différents niveaux énergétiques présents dans les molécules. Il y a présence du niveau fondamental dans lequel la molécule se trouve lorsqu'elle est au repos. Une excitation par des longueurs d'onde de différentes énergies permet d'exciter les molécules pour les faire monter dans un niveau énergétique supérieur. Pour passer à un niveau d'énergie supérieur, il faut que l'énergie d'une onde soit égale à la différence d'énergie entre ces deux niveaux. ^{159,160}

Le passage du niveau fondamental vers les niveaux électroniques supérieurs se fait par des rayonnements de plus fortes énergies, comme les rayons UV par exemple (figure 1.7, F). Les rayonnements infrarouges ont une énergie similaire à celle requise pour exciter les molécules et les faire monter dans un niveau rotationnel ou vibrationnel supérieur (figure 1.7, A). Si cette énergie est égale à la différence d'énergie entre les deux niveaux, il se produira une absorption et la molécule passera dans un état énergétique excité. Cette molécule retournera éventuellement à son état fondamental une fois l'énergie perdue sous

forme d'un photon.^{159,160} Certaines vibrations ne sont cependant pas visibles par spectroscopie infrarouge. Pour être visibles en infrarouge, les différentes vibrations doivent produire un changement dans le moment dipolaire de la molécule.^{159,160}

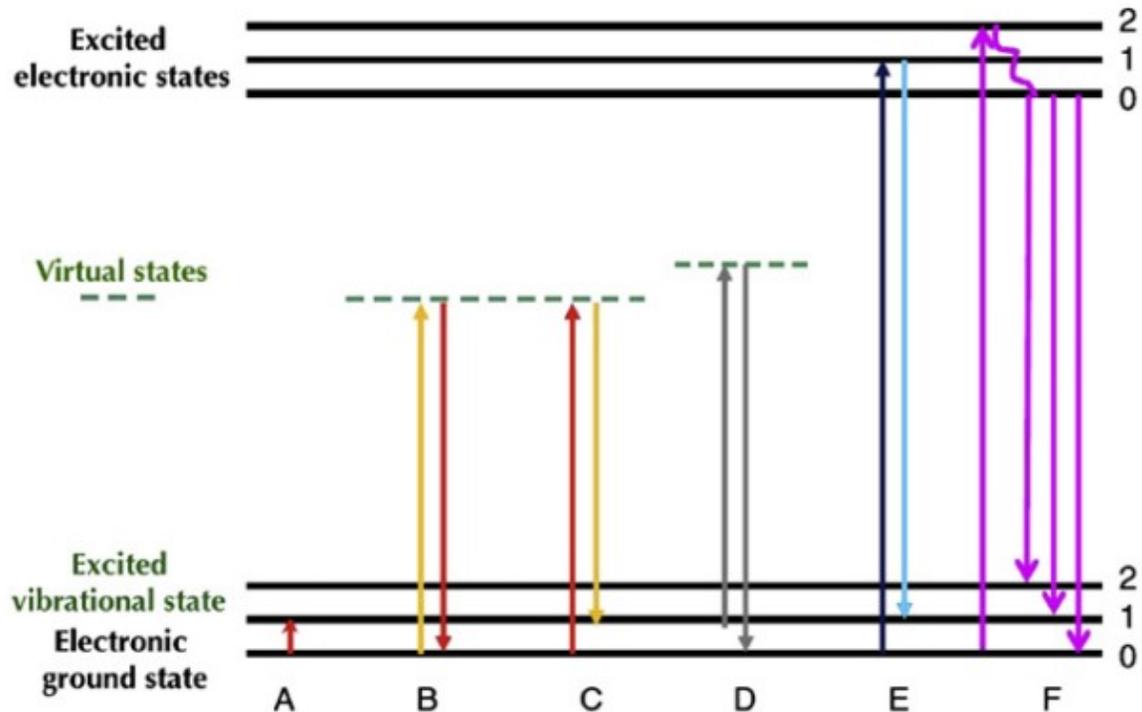


Figure 1.7 : Schématisation de l'absorption de rayonnements en spectroscopie infrarouge, Raman et en fluorescence

L'absorption de rayonnement infrarouge est illustrée en A. Les rayonnements infrarouges possèdent une énergie de l'ordre de grandeur des niveaux vibrationnels et rotationnels. Lorsqu'un photon est de même énergie que la différence entre deux niveaux, il y a absorption et la molécule passe à un état excité. Les schémas B) à E) correspondent à de l'absorption pour la spectroscopie Raman : B) Diffusion Rayleigh, C) Diffusion Stokes Raman, D) Diffusion anti-Stokes Raman, E) Diffusion Raman de résonance. F) correspond à de la fluorescence. (image tirée de ¹⁶⁰)

La technique de spectroscopie infrarouge la plus commune et la plus utilisée de nos jours est la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR en anglais, pour Fourier-transform infrared spectroscopy). Le schéma de l'appareil présenté à la figure 1.8 montre les différentes composantes optiques. L'appareil comporte un interféromètre de Michelson qui est composé d'un séparateur de faisceau, d'un miroir fixe et d'un miroir mobile. Ceci permet de générer le retard de l'onde, ce qui permet la modulation de la fréquence des ondes afin que les fluctuations d'intensités puissent être distinguées par le détecteur. L'encadré de gauche illustre quant à lui les composantes permettant d'acheminer les

rayons infrarouges vers l'échantillon, de les condenser, pour ensuite les mener au détecteur.^{154,161} Les ondes de la source passent par l'échantillon et atteignent le détecteur en même temps, puis peuvent être séparées par transformée de Fourier afin d'obtenir un spectre d'absorbance en fonction du nombre d'onde.

L'avantage de la FTIR est qu'il est possible d'obtenir des données spectroscopiques sur un large spectre simultanément comparativement à des spectromètres à dispersion qui ne peuvent acquérir des données que pour une seule longueur d'onde à la fois. Tous les éléments atteignent le détecteur simultanément, ce qui évite d'avoir à effectuer un balayage des longueurs d'onde. Cela permet d'acquérir un spectre en moins d'une seconde. La résolution est également supérieure de par le faible nombre de composantes optiques qui sont présentes dans l'appareil. En effet, il n'est pas requis d'utiliser un monochromateur ainsi qu'une fente de sortie pour la sélection des longueurs d'onde désirées.^{159,161,162}

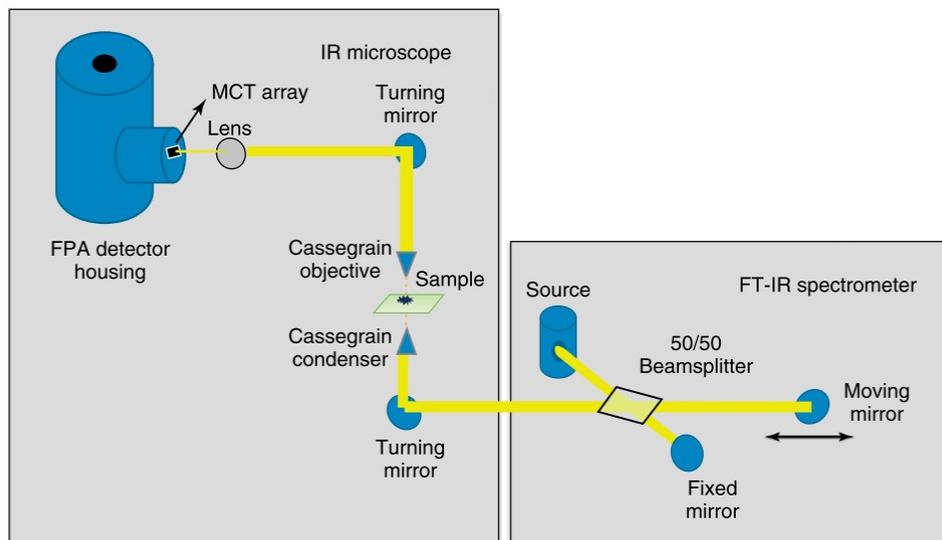


Figure 1.8 : Composantes optiques présentes dans un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Différentes composantes optiques dans un spectromètre infrarouge permettant de diriger les rayons infrarouges en plus de permettre les transformées de Fourier. Les composantes dans l'encadré de droite permettent le retard d'onde et les composantes dans l'encadré de gauche permettent d'acheminer les rayons infrarouges à l'échantillon, puis au détecteur. (image adaptée de ¹⁶¹)

La source d'un spectromètre infrarouge est un corps noir chauffé, ce qui produit des rayonnements sur une grande plage de longueurs d'onde, comme il est possible d'observer à la figure 1.9. Toutes ces ondes sont acheminées, à l'aide de différents miroirs, vers le spécimen afin d'en acquérir les spectres infrarouges.^{154,159,163}

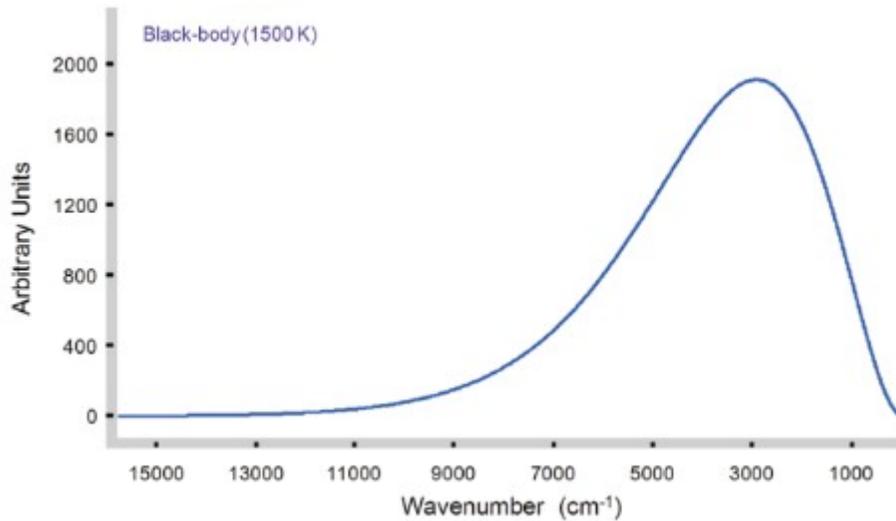


Figure 1.9 : Spectre infrarouge des rayonnements émis par un corps noir

La source d'un spectromètre infrarouge est un corps noir chauffé afin de produire les rayonnements infrarouges qui serviront aux analyses. (image tirée de ¹⁶⁴)

Plusieurs types de détecteurs peuvent être présents dans des spectromètres infrarouges. Parmi ces différents types, le Focal Plane Array (FPA) est très utilisé pour l'imagerie infrarouge. Ce détecteur permet de sonder une zone d'un échantillon et permet d'obtenir plusieurs spectres infrarouges correspondants à différents endroits dans cette zone d'analyse.¹⁶¹ Une illustration de ce type de détecteur est présentée à la figure 1.10 et permet de bien comprendre son fonctionnement. Il s'agit en fait d'un détecteur composé de plusieurs petits détecteurs qui pourront chacun recueillir un spectre infrarouge à différents emplacements dans la zone d'analyse. Une fois les spectres acquis, il est possible de sélectionner un endroit sur la zone d'analyse et d'obtenir le spectre infrarouge correspondant à cet endroit précis. Cette technique est très utile pour observer des différences au niveau d'un même tissu.^{160,165,166}

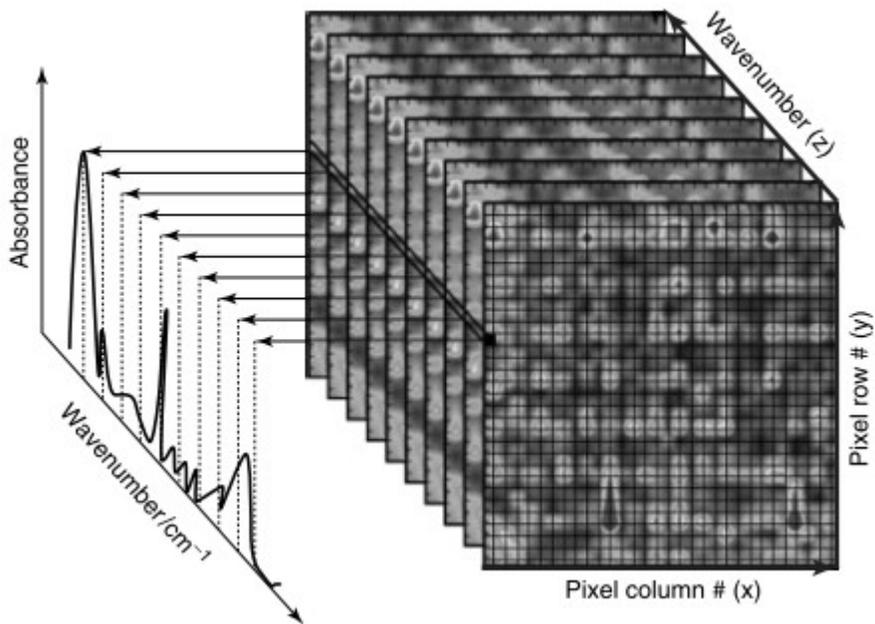


Figure 1.10 : Aspect du détecteur de type FPA et informations qu'il permet d'obtenir

Un détecteur de type FPA permet d'obtenir des spectres infrarouges sur une certaine surface grâce à des petits détecteurs qui forment un quadrillage. Chaque carré représente un de ces petits détecteurs et il contient un spectre infrarouge de cet endroit précis sur la zone d'analyse de l'échantillon. Il permet une acquisition rapide de spectres infrarouges sur une portion de l'échantillon. (image tirée de ¹⁶¹)

Pour analyser les échantillons, il est possible de le faire selon trois techniques différentes.¹⁶³ Celles-ci sont présentées à la figure 1.11. La première est la transmission qui consiste à faire passer le faisceau infrarouge au travers de l'échantillon en utilisant un substrat qui est transparent aux infrarouges (comme le Séléniure de Zinc (ZnSe) ou le fluorure de calcium (CaF₂)). En utilisant un substrat différent possédant une surface réfléchissante (comme de l'or), il est possible d'effectuer des analyses en transflection. Une troisième technique est la réflectance totale atténuée (ATR en anglais, pour Attenuated Total Reflection) qui consiste à envoyer le faisceau infrarouge sur un cristal possédant un indice de réfraction élevé. Sur l'autre face de ce cristal, l'échantillon est déposé. Une petite portion du faisceau infrarouge (appelée onde évanescente), est absorbée par cet échantillon.^{159,161,163}

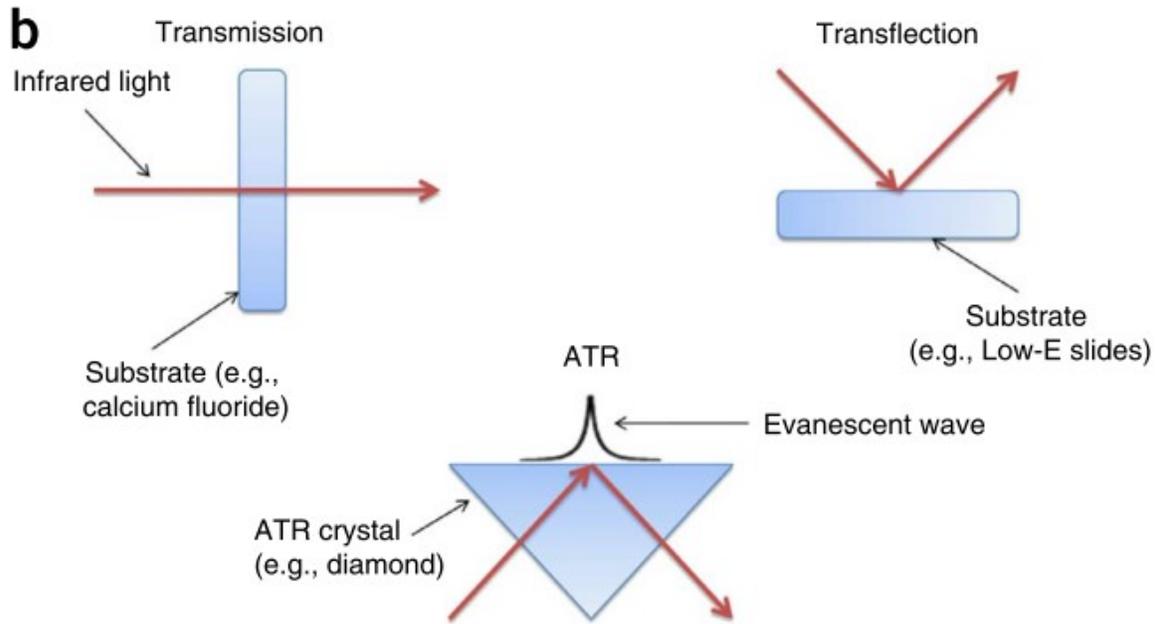


Figure 1.11 : Différents types d'analyses possibles en infrarouge

Il y a trois techniques possibles d'analyse en infrarouge. La première est la transmission et consiste à faire traverser le rayon infrarouge au travers de l'échantillon. La deuxième technique est la transflection qui consiste à faire passer le rayon au travers de l'échantillon. Celui-ci est réfléchi sur la lame employée et repasse au travers de l'échantillon avant d'atteindre le détecteur. La troisième technique est l'ATR qui consiste à faire réfléchir le rayon sur un cristal avec un fort indice de réfraction. Une partie de l'onde est absorbée par l'échantillon qui se trouve de l'autre côté du cristal. (image tirée de ¹⁶³)

Pour être en mesure d'analyser les spectres infrarouges suite aux acquisitions avec l'appareil de spectroscopie, il est parfois nécessaire d'effectuer certaines transformations sur ceux-ci pour en faciliter l'analyse. Certaines de ces transformations sont illustrées à la figure 1.12. Cette figure permet de bien illustrer les effets de ces transformations. Tout d'abord, il y a le « Rubberband baseline correction », technique qui permet de corriger la ligne de base afin que tous les spectres y soient alignés. Cela permet par la suite de mieux observer et de pouvoir comparer l'intensité et la position relative de chacun des pics.

Les dérivées première et seconde sont également très couramment utilisées sur les spectres bruts. Une fois appliquées, ces transformations permettent de visualiser beaucoup plus facilement les endroits qui diffèrent sur le spectre. En effet, certaines différences sont très faibles et il est parfois impossible de les repérer sur les données brutes. Ces transformations permettent donc de pallier à ce problème. Une fois les

transformations appliquées sur les spectres, il est possible de procéder à leur normalisation. Cela peut s'effectuer sur un pic en particulier, afin que ce pic ait la même hauteur sur tous les spectres. Ceci permet de mieux observer les variations dans les autres régions du spectre. Il peut aussi être intéressant de faire une normalisation vectorielle sur certains pics de spectres dérivés afin de mieux visualiser les endroits qui varient.^{154,159,161,163} Plusieurs autres techniques sont disponibles et peuvent être utilisées pour le contrôle qualité, les traitements préliminaires¹⁶⁷, pour extraire de l'information des spectres infrarouges, pour le regroupement et la classification, ainsi que pour l'extraction de biomarqueurs.¹⁶⁸

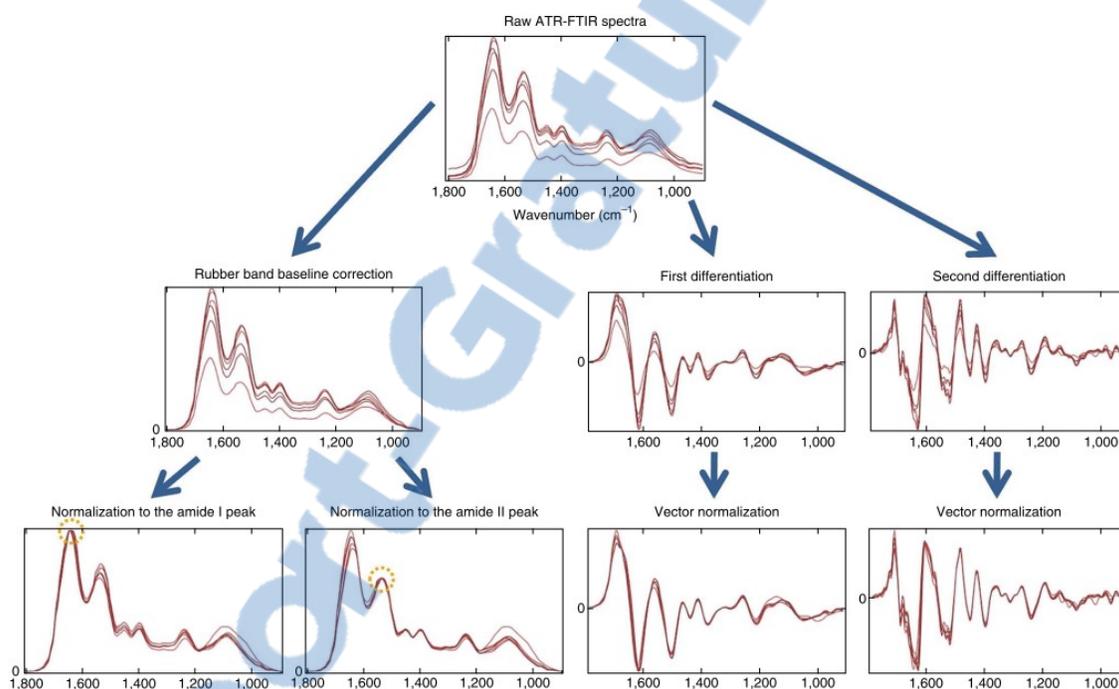


Figure 1.12 : Transformation possible d'un spectre infrarouge afin de faciliter son analyse

Différentes transformations possibles sur un ensemble de spectres infrarouges afin de permettre leurs analyses : la « Rubberband baseline correction », la dérivée première et la dérivée seconde. Une normalisation peut ensuite être faite sur un pic en particulier ou sur une région pour aligner les spectres entre eux et permettre l'observation des différences. (image tirée de¹⁶³)

1.5.2 Utilité en chimie

Dans le domaine de la chimie, la spectroscopie infrarouge est couramment utilisée afin de déterminer la pureté de certains produits¹⁶⁹ ou pour confirmer leurs structures.^{169,170} Par exemple, elle peut être utilisée pour étudier la structure de composés naturels.¹⁷¹ Cette

technique est très facile et très rapide à appliquer sur des produits chimiques et permet d'obtenir une grande quantité d'information utile sur les molécules. Pour des molécules très simples, il est possible d'attribuer les différentes bandes d'absorption à des liaisons précises et à des types de vibrations bien précis.¹⁵⁶

1.5.3 Utilité en biologie

Dans le cas d'analyses de matériel biologique, les résultats obtenus par cette technique ne sont pas aussi facilement analysables, mais cette technique permet tout de même l'analyse de matériel biologique¹⁷² afin d'observer des différences entre des tissus de différentes natures.^{173,174} Elle est utilisée pour faire des études sur le diagnostic de différents cancers.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸, pour faire des études de mort cellulaire¹⁷⁹, pour la classification de différents types cellulaires¹⁸⁰ ou pour l'identification de bactéries.¹⁸¹ Elle permet donc d'analyser des échantillons biologiques de différentes natures. Il est aussi possible d'étudier des cellules ou des tissus complets.¹⁸²⁻¹⁸⁵ En ayant des échantillons provenant d'individus sains et des échantillons provenant d'individus malades, il est possible de comparer les spectres et de déterminer quelles sont les biomolécules qui expriment la plus grande majorité des différences. Dans certains cas, il peut s'agir des protéines, alors que dans d'autres cas, il pourrait s'agir des lipides par exemple. Cette technique peut être facilement utilisée pour comparer des échantillons entre eux et déterminer ce qui diffère. De plus, il est possible d'utiliser cette technique afin de classer des tissus en groupes. Une fois les groupes créés, il est possible de prendre des échantillons de nature inconnue et de tenter de trouver à quel groupe ils appartiennent. Ceci peut alors permettre de développer une nouvelle technique de diagnostic qui se base sur les différences et les similitudes des tissus au niveau de leur absorption dans l'infrarouge.¹⁶³ Il est aussi possible d'observer des changements au niveau de tissus, comme des agrégats de protéines¹⁵⁵. Cette technique permet donc l'observation de certains éléments par une technique complémentaire à d'autres techniques d'imagerie déjà existantes.

En utilisant la spectroscopie infrarouge sur des tissus biologiques, il n'est pas possible d'obtenir des spectres simples avec des bandes bien distinctes pouvant être attribuées à des liaisons précises. Cependant, elle peut tout de même être employée pour obtenir des informations sur la composition en biomolécules dans un échantillon. Parmi les régions importantes, il y a les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques. La figure 1.13 illustre l'allure typique d'un spectre infrarouge de matériel biologique.¹⁶³ Chacun de

ces types de biomolécules possèdent un endroit distinct dans le spectre infrarouge dans lequel les bandes les plus importantes seront majoritairement présentes. Bien sûr, puisque le nombre de molécules est très élevé, il ne sera pas possible de distinguer des molécules précises. Le spectre sera la somme de l'absorption de toutes les molécules. L'allure des bandes sera très large, mais leurs positions relatives ainsi que leurs formes peuvent fournir des informations importantes sur la composition de l'échantillon.¹⁶⁰

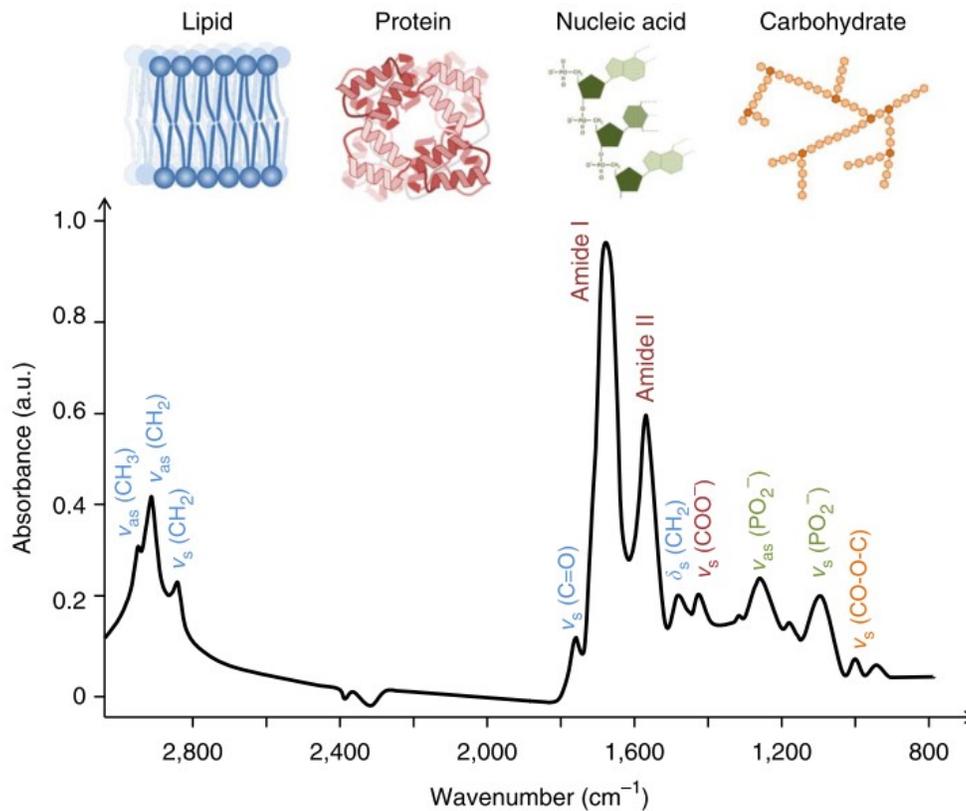


Figure 1.13 : Spectre typique de matériel biologique contenant différents types de biomolécules

Un spectre de matériel biologique comprend différentes régions importantes qui peuvent être associées à certains types de biomolécules (glucides, lipides, protéines et acides nucléiques). ν = élongation, δ = déformation, s = symétrique, as = asymétrique (image tirée de ¹⁶³)

Pour les acides nucléiques, la région entre 1300 et 900 cm^{-1} est celle qui sera le plus étudiée. Cette région correspond aux vibrations des élongations symétriques et asymétriques des liens phosphodiester présents dans l'ADN et l'ARN.^{154,162,186} Les bandes les plus importantes pour les glucides se trouvent entre 1150 et 1000 cm^{-1} .¹⁵⁴ Ces bandes sont principalement dues aux vibrations des liaisons CO-O-C présentes dans les



sucres.¹⁸⁷ Pour ce qui est des lipides, les élongations des liaisons sur les chaînes carbonées des acides gras seront responsables des changements dans le spectre infrarouge et les différences se situent entre 2 800 et 3 050 cm^{-1} . Il y aura aussi une bande à 1 736 cm^{-1} dû à l'élongation du carbonyle de l'ester et à 1 468 cm^{-1} provenant du cisaillement des groupements CH_2 des chaînes carbonées.^{154,162,188}

Les spectres infrarouges fournissent également une panoplie d'information sur les protéines.¹⁸⁹ Pour leur étude, la région la plus importante est celle se situant à 1 650 cm^{-1} . Cette région correspond à l'élongation des carbonyles des liaisons peptidiques et est communément appelée Amide I. Il y a aussi présence de la bande Amide II à 1 550 cm^{-1} qui provient des vibrations hors du plan des liens N-H. De plus, la bande Amide III entre 1 400 et 1 200 cm^{-1} est aussi observée et correspond aux vibrations de déformations N-H et des élongations C-N.¹⁵³ Les bandes Amide A et Amide B qui sont situées à 3 300 et 3 070 cm^{-1} fournissent certaines informations sur les liaisons hydrogènes présentes dans les protéines et sont dues aux élongations N-H.¹⁵³

Il est possible de tirer des informations concernant les structures secondaires des protéines en étudiant les spectres infrarouges.¹⁹⁰⁻¹⁹³ La bande Amide I est sensible aux structures secondaires des molécules et est la principale utilisée pour l'analyse de ces structures. Les bandes Amide II et Amide III peuvent aussi aider à l'analyse.¹⁵³ Ces bandes peuvent permettre d'identifier si les protéines sont principalement dans une structure en hélices α ou en feuillets β , ainsi que de fournir de l'information sur les coudes et les portions aléatoires des protéines.¹⁹⁴ De plus, les spectres infrarouges peuvent aussi permettre de détecter des différences au niveau des résidus et de leur chaîne latérale dans des échantillons différents.¹⁵³ Cette technique peut également permettre d'obtenir de l'information sur la conformation des protéines et les changements de conformation, leurs mauvais repliements, ainsi que sur leur agrégation.^{162,195-197}

1.5.4 Application possible avec les peaux reconstruites

Il y a déjà des chercheurs qui font de la spectroscopie infrarouge sur des peaux natives.¹⁹⁸ Des peaux reconstruites psoriasiques ont par ailleurs déjà été étudiées par le passé.¹⁷⁴ Une fois les équivalents cutanés obtenus, il est possible de les couper perpendiculairement à leur orientation de culture et ainsi obtenir des sections de quelques micromètres d'épaisseur contenant à la fois la couche des fibroblastes du derme et les

kératinocytes de l'épiderme. Cela permet d'observer les deux types cellulaires ainsi que leurs interactions.

Des analyses multivariées peuvent être employées pour analyser les spectres. Parmi celles-ci, les plus utilisées sont les analyses de regroupements hiérarchiques (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) ou des analyses en composantes principales (Principal Component Analysis, PCA).¹⁶³

La première technique, les HCA, permet de faire des regroupements en catégories afin de générer des dendrogrammes permettant de visualiser graphiquement la séparation des données. En fonction des similitudes entre les spectres infrarouges, ceux-ci sont regroupés en catégorie. Ce processus itératif est appliqué jusqu'à ce que toutes les données aient été regroupées. Une fois l'algorithme appliqué, il est possible d'étudier les différents groupes obtenus. Il est possible de tenter de faire des classifications pour séparer des individus sains et malades afin d'identifier certaines portions des spectres qui pourraient expliquer cette distinction.^{199,200}

Les PCA permettent de mettre en évidence les différences entre les éléments d'un ensemble de données. En présence d'un très grand nombre de données et de variables pour les caractériser, il peut être utile de vouloir réduire le nombre de dimensions afin d'exprimer les données en un nombre plus réduit de paramètres (les composants principaux, PC) qui contribuent le plus à la variabilité des données. Ces PC sont de nouvelles variables qui sont linéairement dépendantes des variables initiales afin de maximiser la variance.²⁰¹⁻²⁰⁵ La figure 1.14 illustre bien ce genre d'analyse pour des données à deux dimensions (2D). L'axe PC1 sera placé de manière à représenter le plus grand pourcentage de la variabilité des données. L'axe PC2 sera quant à lui placé perpendiculairement à l'axe PC1 et représentera le deuxième pourcentage le plus élevé de la variance des données. Dans le cas de données à dimensions plus élevées, il est plus difficile d'illustrer visuellement le processus, bien que celui-ci soit similaire. Chaque point sur le graphique correspond à un élément analysé au départ. Avec les spectres infrarouges, chaque point sur le graphique illustre une condition ou un réplica pour laquelle un spectre est obtenu. Il est possible par la suite d'observer visuellement si des regroupements sont faits entre différentes conditions (entre malades et non malades par exemple) en sélectionnant certaines plages de nombres d'ondes qui pourraient séparer les données. En attribuant des couleurs ou des formes particulières à chacun des points

dans le graphique (comme à la figure 1.14 avec les points noirs et rouges), il est possible d'observer visuellement si des regroupements sont faits entre les différents éléments. L'utilisation de ce type d'analyse peut être appliquée à d'autres techniques que celle de l'infrarouge. Il est possible de l'appliquer avec des données génétiques²⁰⁶ ou pour l'analyse de produits alimentaires en prenant en compte un nombre élevé de paramètres.²⁰⁷

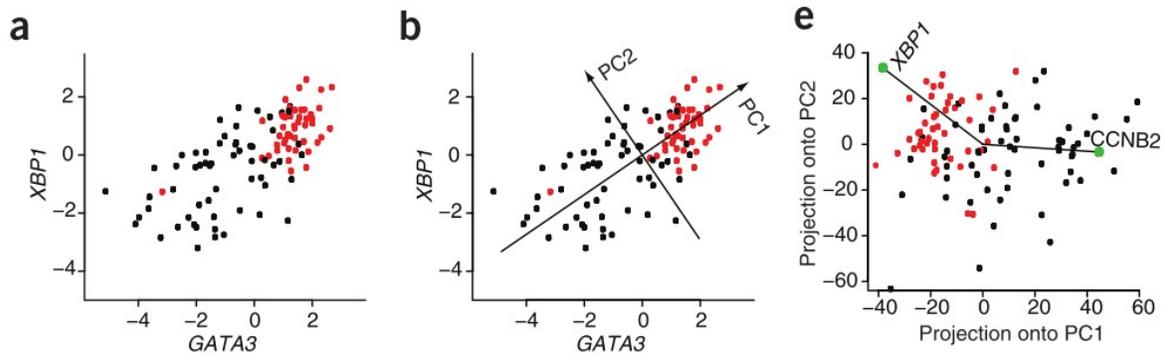


Figure 1.14 : Exemple de PCA avec des données en 2D pour illustrer le placement des PC

Schéma montrant le placement des axes PC1 et PC2 dans le cas de données en 2D pour illustrer le fonctionnement de la technique. En a), il s'agit des données brutes obtenues. En b), il est possible d'observer le placement des PC1 et PC2. L'axe PC1 est placé de façon à exprimer le pourcentage le plus élevé de la variance des données. Le PC2 se place quant à lui perpendiculairement. En c), les données ont été placées selon les axes PC1 et PC2 trouvés en b). (image adaptée de ²⁰⁵)

1.6 Problématique et hypothèse de recherche

1.6.1 Problématique

La principale problématique liée à l'étude de maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique est l'obtention de tissus biologiques pour être en mesure d'effectuer des analyses. Pour pallier à ce problème, l'étude de la peau permet d'étudier un tissu biologique beaucoup plus facile d'accès. De plus, la culture cellulaire et le génie tissulaire permettent de créer des peaux reconstruites à partir d'un petit nombre de cellules provenant d'une biopsie. Cela permet donc d'avoir une source de matériel biologique renouvelable pour procéder à des analyses. Une petite biopsie d'à peine quelques millimètres peut fournir un nombre de cellules suffisant pour produire plus d'une centaine d'équivalents cutanés.

À l'heure actuelle, il n'est pas possible de diagnostiquer précocement la SLA. Un diagnostic plus précoce permettrait d'augmenter les chances de survie des patients en permettant de démarrer des traitements beaucoup plus tôt dans la progression de la maladie avant que les principaux symptômes cliniques ne soient visibles. La recherche pour trouver de nouvelles méthodes de diagnostic est donc un domaine de recherche dont les résultats seraient très bénéfiques pour le progrès scientifique et les connaissances de cette maladie. La spectroscopie infrarouge, telle que décrite précédemment, pourrait être une analyse très simple à mettre en place pour analyser la peau des individus et ainsi déterminer s'ils sont atteints ou non de la maladie.

Ce projet de recherche de maîtrise vise à expérimenter cette technique de spectroscopie sur des peaux reconstruites à partir de cellules saines ou de cellules de patients SLA. L'objectif est de déterminer s'il est possible ou non de distinguer des peaux reconstruites en fonction de la provenance des cellules. La présence de différences au niveau des spectres infrarouges permettrait d'une part, de montrer que des éléments propres à la SLA peuvent être présents dans la peau, et d'autre part, que la spectroscopie infrarouge pourrait être une technique intéressante et pour laquelle des recherches plus approfondies pourraient être menées afin de voir s'il serait possible de l'utiliser afin d'en faire une méthode de diagnostic.

1.6.2 Hypothèse de recherche

L'hypothèse de ce projet de recherche est que la spectroscopie infrarouge sur des peaux reconstruites en laboratoire à partir de cellules d'individus sains et de patients atteints de SLA permettrait de différencier des équivalents cutanés en fonction de la provenance des cellules.

Cette hypothèse de recherche provient d'analyses préliminaires qui ont été réalisées dans le laboratoire. Tout d'abord, un étudiant de l'équipe a su démontrer que les peaux reconstruites en laboratoire telles qu'elles seront utilisées dans le cadre de ce projet présentent des caractéristiques qui sont typiques de patients atteints de la SLA. Tout d'abord, il y a présence d'anomalies structurelles et d'infiltration des kératinocytes de l'épiderme, ce qui n'est pas visible sur des peaux reconstruites à partir de cellules saines. Par ailleurs, il a été en mesure d'observer une délocalisation de la protéine TDP-43 du noyau vers le cytoplasme. Cette délocalisation est combinée à une agrégation de cette protéine dans le cytoplasme.⁸¹ Une autre équipe de recherche s'est également intéressée

à la protéine TDP-43 dans la peau des patients, directement à partir de biopsies cutanées.⁸⁹ Selon la littérature, cette agrégation de la protéine implique également un changement de la conformation de la protéine. Celle-ci, présentant habituellement une conformation majoritairement en hélice α , se retrouve principalement avec une conformation en feuillet β lorsque présente sous forme d'agrégats.²⁰⁸ Puisque des changements dans la structure secondaire des protéines sont une caractéristique qui peut être observable par spectroscopie infrarouge, cette technique semble prometteuse pour l'étude des peaux reconstruites et pour l'observation de changements de conformations au niveau des structures secondaires.

1.6.3 Objectifs de recherche

Le premier objectif de ce projet de recherche est de mettre au point la technique de spectroscopie infrarouge pour l'analyse des équivalents cutanés produits. Tout d'abord, il est important de déterminer l'épaisseur des coupes à déposer sur les lames afin de procéder aux analyses. Par la suite, il faut déterminer le meilleur composé pour enrober ces équivalents pour la coupe sans pour autant causer d'interférences avec les analyses infrarouges. Pour finir, l'utilisation ou non d'une fixation pour les tissus doit être étudiée.

Le second objectif de ce projet est de déterminer s'il y a des différences au niveau des spectres infrarouges entre des peaux reconstruites dérivées de patients SLA et d'individus sains. Pour ce faire, des analyses multivariées seront effectuées sur les données infrarouges. Parmi ces analyses, il est possible d'y retrouver les PCA et les HCA. Ces deux types d'analyses permettent de faire des regroupements entre les données pour déterminer lesquelles peuvent engendrer une séparation optimale en deux groupes distincts (sain ou malade).

1.6.4 Impact des potentielles découvertes sur le diagnostic de la maladie

Ce projet de recherche peut avoir un impact très grand sur la recherche des maladies neurodégénératives. Si des différences sont visibles entre des équivalents reconstruits à partir de cellules de patients et d'individus sains avec la technique de spectroscopie infrarouge, et que des biomarqueurs spectraux sont présents dans la peau, cela laisse croire que cette technique pourrait être utilisée comme outil de diagnostic complémentaire pour les cliniciens, ou bien tout simplement remplacer les techniques actuelles qui ne permettent pas toujours d'obtenir un diagnostic clair et précis.

Cela permettrait de bien stratifier les patients et de déterminer s'ils sont atteints de la SLA ou bien s'il s'agit d'une autre maladie qui possède des symptômes cliniques similaires. Par ailleurs, si la sensibilité de cette technique est suffisante, il pourrait être possible de diagnostiquer plus précocement les patients, ce qui permettrait de démarrer un traitement actuel ou éventuel plus rapidement. Ceci permettrait d'augmenter significativement les chances de survie des patients ainsi que leur espérance de vie. En effet, des études sur des souris ont permis de démontrer que la communication entre le muscle et la jonction neuromusculaire est perdue avant même l'apparition des premiers symptômes cliniques.²⁰⁹⁻²¹¹ Un traitement démarré plus tôt aurait une chance plus grande de donner des résultats significatifs tel que montrés précédemment.²¹²

De plus, comme le diagnostic se ferait plus tôt, de nouvelles substances thérapeutiques pourraient être testées en études cliniques pour stopper ou ralentir la progression de la maladie. Des biomarqueurs de progression visibles par infrarouge permettraient de suivre l'évolution de la maladie, d'observer, et de quantifier la réponse à un traitement ainsi que les bienfaits ou non d'un traitement chez les patients.

Chapitre 2 : Differential diagnosis of idiopathic amyotrophic lateral sclerosis using Fourier-transform spectrochemical analysis of patient-derived skins

Christian Martel, B. Sc.^{1, 2}, Tamao Tsutsumi, B. Sc.⁴, Bastien Paré, M. Sc.^{1, 2}, Hélène T. Khuong, M.D.^{1, 3}, Nicolas Dupré, M.D., M. Sc.³, Ashraf A. Ismail, PhD⁴ and François Gros-Louis, PhD^{1,2}

1. Department of surgery, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec, Canada
2. CHU de Québec Research Center, Regenerative medicine division, LOEX-Hôpital de l'Enfant-Jésus, Québec, Canada
3. Department of Neurological Sciences, CHU de Québec and the Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec, Canada
4. McGill IR Group, Food Science and Agricultural Chemistry, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, McGill University, Montréal, Canada

2.1 Résumé

Introduction : Un des grands défis dans l'identification de thérapies pour des maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA) est le manque de biomarqueurs. L'objectif de ce projet est d'appliquer la microspectroscopie infrarouge, une technique permettant d'analyser le contenu moléculaire de tissus, afin d'identifier des biomarqueurs et ainsi aider les cliniciens à poser un diagnostic précis, en plus de suivre l'évolution de la maladie dans le temps. Nous avons émis l'hypothèse que, puisque les tissus de la peau et du système nerveux central proviennent du même feuillet embryonnaire, les changements pathologiques associés à la SLA seraient également détectables dans la peau. **Méthodes :** Des cellules provenant d'individus sains et de patients SLA sont isolées de biopsies cutanées. Les fibroblastes sont cultivés dans un environnement en 3-dimensions, ce qui a été démontré comme étant nécessaire pour observer les éléments pathologiques caractéristiques de la SLA dans les tissus en culture. Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) sont enregistrés et les dérivées secondes sont comparées entre les groupes. **Résultats :** Des analyses en composantes principales et des regroupements hiérarchiques ont été faites pour détecter les différences entre les échantillons (SLA vs contrôles). De façon intéressante, les analyses ont montré qu'il était possible de différencier les spectres FTIR ALS et contrôles en lien avec la bande Amide II ainsi que des différences au niveau des lipides, des glycosaminoglycanes et/ou de la composition de la matrice extracellulaire. **Interprétation :** Les changements détectés sont probablement dus à des changements au niveau de la structure secondaire des protéines entre les SLA et les contrôles ainsi que par des compositions différentes de la matrice extracellulaire. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

2.2 Abstract

Introduction: One of the great challenges in the identification of efficient therapy in many neurodegenerative diseases, including Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), is the lack of reliable biomarkers. The purpose of this project is to apply infrared microspectroscopy, a technique dedicated to analyze the molecular content of tissues, for the identification of biomarkers that will help clinicians to determine a precise diagnosis, as well as to follow disease evolution over time. We hypothesized that, since skin and CNS has the same embryonic origin, ALS-associated pathological event will be readily detectable through skin testing. **Methods:** Cells from healthy individuals and ALS patients were isolated from skin biopsies. Fibroblasts were cultured in a 3-dimensional context, which has been shown to be necessary for the detection of characteristic ALS pathology within the cultured tissue. Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra were recorded and second derivative spectra were compared between the groups. **Results:** Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis were performed in order to detect differences between tested specimens (ALS vs. controls). Interestingly, our analyses showed that it was possible to discriminate the FTIR spectra taken from ALS and control TES; changes mainly related to the amide II band, as well as to different lipid, glycoaminoglycan and/or extracellular matrix composition. **Interpretation:** The detected changes between TES samples are likely to be associated with secondary structures protein conformation between ALS and controls as well as with different extracellular matrix composition. Additional experiments will be needed to confirm our results.

2.3 Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) that is characterized by progressive degeneration of upper and lower motor neurons (1). The degeneration leads motor malfunction, paralysis and death usually between three to five years following the diagnosis (2). ALS has two forms: familial ALS (fALS), which accounts for 5 to 10 % of all cases, and sporadic ALS (sALS), which accounts for 90 to 95 % of all cases (3). Currently, the diagnosis of ALS is mainly based on the clinical assessment of symptoms, which may appear only late in the disease course, well after the degeneration of a significant number of motor neurons has already occurred. For sALS, there are no known specific biomarkers of early diagnosis, prognosis or for the prediction to therapy response (4, 5). Cytoplasmic neuronal and glial accumulation of TDP-43 is found in the vast majority of ALS cases (sporadic and familial) (6–12) as well as in Tau-negative frontotemporal lobar degeneration (FTLD), which is shown to have significant genetic, clinical and pathological overlap with ALS (13, 14).

The uncertainty in the diagnosis, as well as the lack of effective treatment can be attributed to the absence of reliable disease biomarkers (15). A serious challenge in the treatment of ALS patients is therefore the length of time between the first clinical visit and the definite diagnosis of ALS. This delay, which can take up to 18 months, may be an important window of opportunity to start therapy. The identification of such valid biomarkers will not only improve diagnosis, but will also allow for stratification in clinical trials, for earlier patient enrollment in clinical studies, for better prognostication, for the discovery of novel molecular tools to improve clinical trial outcome measures other than patient survival or functional rating scales, and lastly for the facilitation of therapeutic development.

Although the diagnosis of ALS through neuropathological examination of post-mortem CNS specimens of TDP-43 is well established, progress towards the development of a TDP-43-based biomarker in other biological samples has been met with limited success so far (16). To find new sources of biomarkers, we explored tissue-engineered skin (TES), derived from ALS patients, as a source of more accessible biological material. It has been demonstrated that specific skin phenotypes linked to ALS, which include extracellular matrix disorganization and TDP-43 intracytoplasmic protein aggregates formation, can be observed in ALS-TES (17, 18). Interestingly, these phenotypes were also observed in asymptomatic fALS patient-derived TES with a known mutation susceptible to later induce

the disease (17, 18). In healthy motor neurons, TDP-43 is typically localized to the nucleus forming helix-turn-helix structures in solution, while it undergoes structural transformation from α -helix to β -sheet during aggregation (19). These observations open the way to the development of non-invasive detection of TDP-43 aggregates in patient's skin using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), a technique enabling non-invasive in-depth characterization of skin biomolecules and protein secondary structures (20).

2.4 Materials and methods

2.4.1 Subjects, cells isolation and culture

The recruitment of six ALS patients and three control samples, as well as the cell isolation and culture process have been previously described (17). This project has been approved by the CHU de Québec – Université Laval institutional review board. The fibroblast and keratinocyte cells were isolated from skin biopsies and kept in liquid nitrogen until used. The culture of fibroblasts and keratinocytes were similar to what has previously been described (17), with some minor changes to improve culture output and tissue engineered skin production. In brief, fibroblasts were cultivated in DMEM with 10 % Fetal Calf Serum (FCS) (Invitrogen) with 100 IU/mL penicillin G (Sigma-Aldrich) and 25 μ g/mL gentamicin (Schering) in 8 % CO₂ at 37°C. They were cultured in flasks until confluency (100 %) before the production of TES as described in the section below. Keratinocytes were cultivated on a feeder layer made of irradiated mouse fibroblasts with Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium with Ham's F12 (3:1) supplemented with 5 % Hyclone™ Fetal Clone II serum (GE Healthcare Life Sciences), 5 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich), 1 mM hydrocortisone (Novopharm), 10 ng/mL human epidermal growth factor (Austral Biological), 0,1 nM cholera's toxin (MP Biomedicals), 100 IU/mL penicillin G (Sigma-Aldrich), and 25 μ g/mL gentamicin (Schering). Keratinocytes were cultivated until a confluency of 80 % to 90 % and then used for TES production.

2.4.2 Tissue-engineered skin production

TES production was done as previously described (21). Briefly, fibroblasts were cultured at 100 % confluency with 50 μ g/mL ascorbic acid for 24 days in order to enhance extracellular matrix protein secretion and assembly, and to form manipulable 3-dimensional (3D) fibroblast sheets. Keratinocytes were seeded on one of the sheet and cultivated using keratinocytes media for four additional days, while the remaining sheets were cultivated with fibroblasts media. Three fibroblast sheets are then stacked upon one

another, positioning the one with the keratinocytes on top, and immediately placed at the air-liquid interface for 14 days in order to induce the formation of *stratum corneum* and differentiation of the epidermis. Matured TES were either embedded in optimal cutting temperature compound (OCT) or flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C for downstream analyses.

2.4.3 Fourier-transform infrared spectroscopy analysis

FTIR spectra of OCT-embedded sections deposited on zinc selenide (ZnSe) slides (International Crystal Laboratories) and transmittance were acquired using an Agilent Technologies Cary 670 FTIR Spectrometer coupled with an Agilent Technologies Cary 620 Microscope in the range 4000-950 cm^{-1} at 8 cm^{-1} resolution, with 64 co-added scans. FTIR spectra were acquired from across the tissue section with a focal plane array detector (FPA). One TES section was probed for each individual (ALS and controls), with two to six images per sample depending on its length on the slide. Recorded spectra were then pre-processed to remove spectral contaminants and improve the quality of infrared imaging data (Tableau 2.1). A baseline correction was applied to correct the spectra for environmental and substrate effects. A root mean square (RMS) noise filter was applied on the 2250-1850 cm^{-1} region with a cut off of 0,002. Different absorbance filter were also applied to remove unwanted spectra, such as those from the microscope slide surrounding tissue sections, the OCT around the sample and on its edge, as well as the most intense/weakest Amide I-associated spectra related to respectively detector saturation and imperfections within the tissue section.

Tableau 2.1 : Parameters of the different absorbance filters used for spectra filtering and their purpose

Region	Minimum abs.	Maximum abs.	Purpose
cm ⁻¹	A.A.	A.A.	
1700-1600 (Amide I)	0,2	0,9	To remove the spectra that absorbed too much or not enough based on the Amide I peak, the most intense peak of each spectrum, as well as those surrounding the sample (the microscope slide).
1780-1730	0,0	0,1	To remove OCT contaminating spectra.

A.A.: Arbitrary units

For each of the acquired images, these pre-processing steps were able to accurately select the high quality spectra. The absorbance at each wavenumbers for each remaining high quality spectra was averaged and used for downstream analyses. The second derivative of each average spectrum was also generated and used to make comparison between control and ALS patients. Interrelationships between ALS patients and control individuals were also investigated by Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analyses (HCA). PCA based on the nonlinear iterative partial least squares algorithm was used to reduce the dimensionality of the multivariate data to a manageable range consisting of a smaller set of representative numbers called scores (22). HCA were generated with cosine distance metric and ward's linkage type. A program made with MATLAB 5.1 was used to perform preprocessing and analyses (23).

2.4.4 ELISA

Samples were mechanically grinded under a liquid nitrogen flow using a CryoMill (Retsch). Samples were then fractionated to obtain the cytoplasmic and nuclear proteins in order to facilitate the detection of TDP-43 delocalization from the nucleus to the cytoplasm. Samples were solubilized in TNGT lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 10 % Glycerol; 1 % Triton-X in ddH₂O), vortexed and centrifuged at 15 000 g. The supernatant containing the cytoplasmic proteins was collected. The pellet was then solubilized in SUB lysis buffer (0,5 % SDS, 8 M Urea, 2 % β-mercaptoethanol in ddH₂O), then vortexed. This fraction contains the nuclear fraction of proteins in the sample. Detection of human TDP-43 was performed by ELISA using commercially available human TDP-43 detection kit (proteintech) on the cytoplasmic and nuclear fractions of each

sample. Total protein concentration was assessed with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) for the cytoplasmic fraction and Pierce™ 660 nm Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) with Ionic Detergent Compatibility Reagent for Pierce™ 660 nm for the nuclear fraction. The ELISA was then performed according to the supplier protocol and read with an UV-Visible plate reader spectrometer at 450 nm (SPECTRAMax PLUS 384). For each fraction, the amount of TDP-43 was normalized against total protein concentration of the corresponding fraction and nuclear to cytoplasm TDP-43 ratios were calculated. Means for each group (controls and ALS) were used for a downstream statistical analysis with the Mann-Whitney t test.

2.5 Results

2.5.1 FTIR spectroscopy analysis of the TES structural properties

FTIR spectroscopy is limited to a penetrative depth, as well as to the saturation of the detector requiring optimal tissue thickness sectioning to obtain good transmittance FTIR spectra of tissue samples. Optimal tissue thickness was therefore first determined in order to obtain the best signal to noise ratio prior FTIR interrogation. OCT-embedded TES were cut at different thicknesses (2-25 μm). In our experiments, 10 μm thick TES sections were found the optimal thickness that allows the infrared light to penetrate tissues without saturating the detector for maximum signal to noise ratio (Figure 2.1).

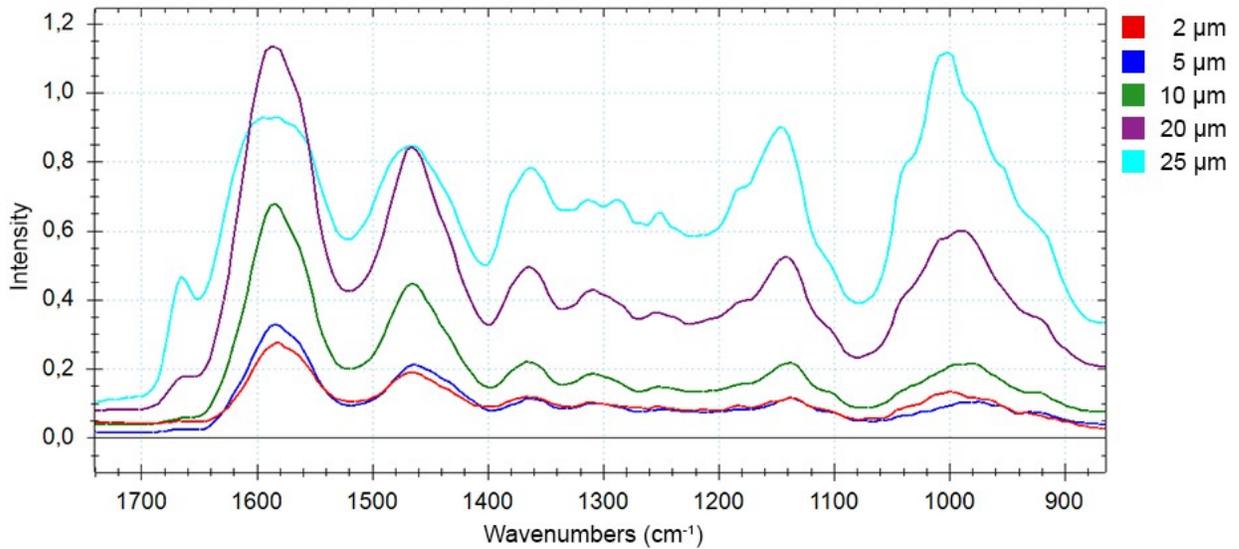


Figure 2.1 : FTIR spectra of tissue-engineered skin with variable thickness (2-25 μm)

10- μm thick section was selected to avoid nonlinear detector response or saturation that may be associated with higher absorbance intensities ($>20 \mu\text{m}$) or to optimize the signal to noise ratio by eliminating lower absorbance intensities often associated with tissue imperfections.

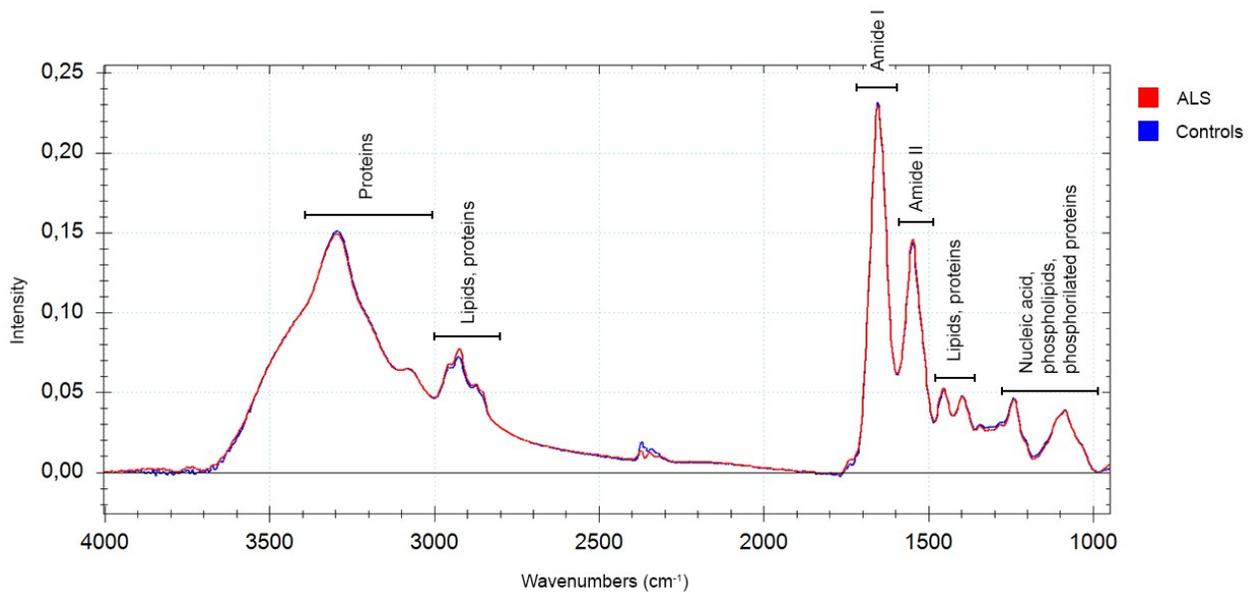


Figure 2.2 : The FTIR absorption spectrum of human tissue-engineered skins

Averaged ALS (red)- and control (blue)-derived spectra are shown. Important regions used for downstream analyses are also highlighted. Normalization was done on the region $1700\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ and plotted on the same graph to better assess the differences among spectra.

Infrared spectra of biological tissues are complex to analyse due to the diversity of biomolecular constituents within the samples, with many regions giving information about particular biomolecules, such as proteins or lipids (Figure 2.2). To better resolve the overlapping components in the recorded spectra and enhance smaller peak separation, second derivative analysis was performed (Figure 2.3).

Rapport-Gratuit.com

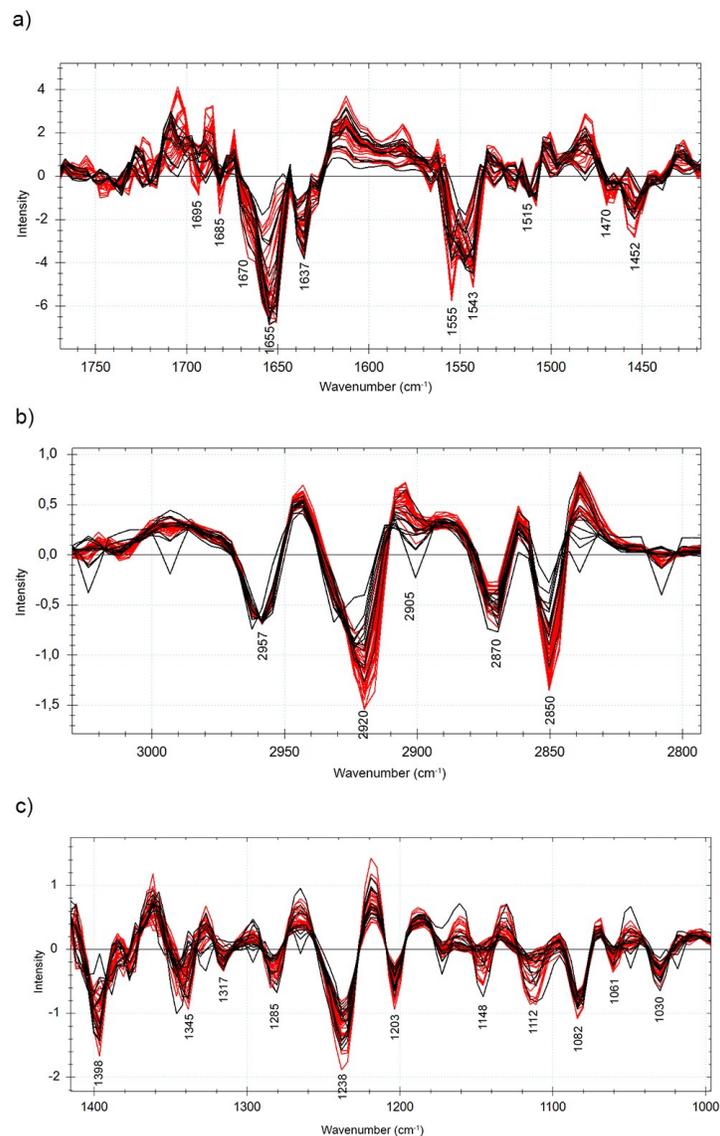


Figure 2.3 : Second derivative FTIR spectra of tissue-engineered skin samples on different targeted regions

The colors are assigned as followed: Red (ALS) and black (controls). a) Second derivative spectra of the 1750-1450 cm^{-1} spectral region encompassing the Amide I and Amide II. Normalisation was done on the tyrosine peak with the region 1520-1510 cm^{-1} . The main differences between the different samples can be observed on spectral region surrounding the Amide I ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$) and the Amide II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) bands. b) Second derivative spectra of the 2800-3000 cm^{-1} spectral region encompassing lipids and extracellular matrix protein component. Normalisation was done on the CH_3 peak with the region 2950-2970 cm^{-1} . The main differences between samples are $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$. c) Second derivative spectra of the 1400-1000 cm^{-1} spectral region encompassing proteins and lipids. Normalisation was done on the CH_3 peak with the region 2950-2970 cm^{-1} . The main differences between samples are $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$, 1345 cm^{-1} , $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1150 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1110 \text{ cm}^{-1}$.

We first investigated the infrared response of TES (ALS and control) in the Amide I ($\sim 1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) and the Amide II ($\sim 1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$) bands (Figure 2.3a) to get insights into the protein secondary structure properties (24, 25). The amide I band is particularly sensitive to the protein secondary structures and to the presence of intermolecular β -sheets in protein aggregates (26, 27). The amide II have also been shown to be useful to study secondary protein structures (28). In particular, the second derivative FTIR spectrum of the different generated TES displayed a main peak at $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ associated with α -helix structures (26, 27, 29). The peaks near 1695 and 1628 cm^{-1} are known to be more characteristic of β -sheets, while turn structures likely contribute to the signals near 1665 cm^{-1} (26, 27, 29). The 1655 cm^{-1} peak displays different intensity values for ALS-TES when compared to control-TES, and shifted toward 1670 cm^{-1} indicating that conformational change is significantly observed in ALS-TES. Noteworthy, compare to control-TES, the β -sheets associated peaks of the ALS-TES were found to be shifted with drastic intensity changes, indicating the presence of more abundant intermolecular β -sheet structures, as expected (19).

Notably significant changes can also be observed at $\sim 1555\text{ cm}^{-1}$, and $\sim 1543\text{ cm}^{-1}$, located within the Amide II band associated with NH bend + C-N stretch (27). The peak $\sim 1470\text{ cm}^{-1}$ is related to the CH_2 scissoring mode of proteins and lipids, and the peak at $\sim 1455\text{ cm}^{-1}$ to CH_2 and CH_3 deformation modes of proteins ($1473\text{-}1462\text{ cm}^{-1}$) (Tableau 2.2) (27). This region can give information on protein conformational changes, lipids or cholesterol content within samples (30, 31). It can also be attributed to symmetric CN elongation of proline amino acid side chain ($1465\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$) (26, 32).

We then investigated the region $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (Figure 2.3b). The peak's intensities at 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} , due to CH_2 asymmetric stretch of saturated lipids and side chain of proteins (27), dramatically increased in ALS-TES when compared to normal tissues (Figure 2.3b). Although elevated level of saturated lipids can be a sign of oxidative stress (27), which has been previously linked to ALS (33), it can also be explained by different ECM composition in collagen (2926 cm^{-1} and 2850 cm^{-1}) (Tableau 2.2) (34). The peaks at $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ can also be linked to intermolecular β -sheet content (35). A lower intensity of these two peaks is associated with a higher content of β -sheets or a sign of lipid rearrangement in tissues with aggregates (36).

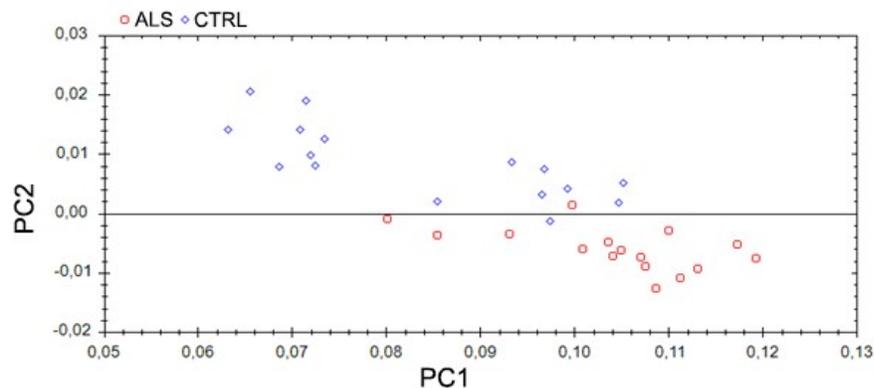
We then further analyzed the amide III and the lipid spectral features (Figure 2.3c and Tableau 2.2). Some interesting differences between ALS-TES and control-TES (1350-1200 cm^{-1}) can be observed and were mainly assigned to phosphates of phospholipids due to the absorption of acetyl amino group of glycosaminoglycans (GAGs) (37), one of the main components of the extracellular matrix, as well as different tissue collagen composition. Indeed, the peak at $\sim 1345 \text{ cm}^{-1}$ arises from CH_2 wagging of phospholipids, fatty acids, triglycerides and amino acid side chains (1343 cm^{-1}) (27), and can also be associated with collagen content within tissue (34). The peak at $\sim 1398 \text{ cm}^{-1}$, originating from COO^- symmetric stretch of fatty acids and amino acids (1400 cm^{-1}) (27) or from CH_3 bending vibrations characteristic of compound with $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ groups, such as phosphatidylcholine (36), is also found to be slightly different. The peak at 1238 cm^{-1} presents a high variability for all the samples and is arising from PO_2^- asymmetric stretch of DNA, RNA and phospholipids (1238 cm^{-1}) (27, 29). It can also be attributed to β -sheets secondary structures (1240 cm^{-1}) (35), or be attributed to a different level of protein phosphorylation (38). There is also the peak at $\sim 1203 \text{ cm}^{-1}$ that presents a high level of variability that can be assigned to Tryptophan (Trp) amino acid side chains (32) or collagen organization (27). High level of variability can also be observed at peak $\sim 1148 \text{ cm}^{-1}$. This peak can be related to C-O stretch of glycogen and mucin (1151 cm^{-1}), two constituent of the epidermis (27, 39, 40). Interestingly, epidermal changes were also observed in ALS skins biopsies (18).

Tableau 2.2 : Summary of the changes observed in ALS and control TES

	Wavenumbers (cm ⁻¹)	Nature of vibrational transitions	Effect/Cause	References
Amide III	1148	C-O stretch of glycogen and mucin	Epidermis composition	(27, 39, 40)
	1203	Tryptophan aa side chains or collagen organization	Protein structure, ECM composition	(27, 32)
	1238	PO ₂ ⁻ asymmetric stretch (DNA, RNA and phospholipids) / β-sheets	Protein structure, protein phosphorylation	(27, 29, 35, 38)
	1345	CH ₂ wagging (phospholipids, fatty acids, triglycerides and amino acid side chains), collagen content	Protein structure, ECM composition, lipid composition	(27, 34)
	1398	COO ⁻ symmetric stretch (fatty acids and amino acids) or CH ₃ bending of N(CH ₃) ₃	Protein structure, lipid composition	(27, 36)
Amide II	1470	CH ₂ and CH ₃ deformation modes of proteins, CH ₂ scissoring mode, CN elongation of proline amino acid side chain	Protein structure, lipids and cholesterol composition	(27)
	1455	CH ₂ and CH ₃ deformation modes, CN elongation of proline amino acid side chain	Protein structure, lipids and cholesterol composition	(27)
	1543, 1555	NH bend + C-N stretch	Protein structure	(27)
Amide I	1628	β -sheets	Protein structure	(26, 27, 29)
	1655	α-helices	Protein structure	(26, 27, 29)
	1665	β -turns	Protein structure	(26, 27, 29)
	1695	β -sheets	Protein structure	(26, 27, 29)
Lipids	2850	CH ₂ asymmetric stretch of saturated lipids and β-sheets, side chains of proteins, collagen content	Oxidative stress, ECM composition, Protein structure	(27, 34)
	2920	CH ₂ asymmetric stretch of saturated lipids and β -sheets, side chains of proteins, collagen content	Oxidative stress, ECM composition, Protein structure	(27, 34)

2.5.2 PCA and HCA analysis

a)



b)

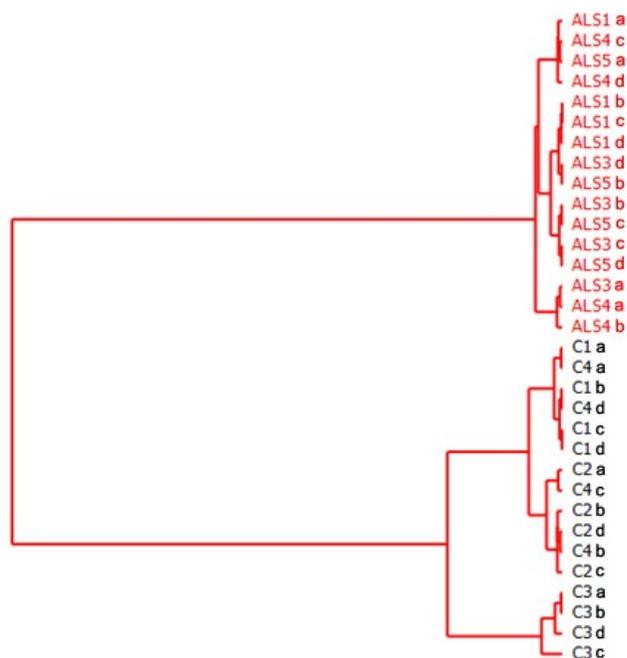


Figure 2.4 : PCA and HCA based on wavenumbers surrounding the Amide II band (1499-1511, 1586-1598 cm^{-1})

a) Discrimination between ALS (red) and controls (blue) are readily apparent on the PCA score plot. b) HCA analysis showed two distinct groups clustered together according to the disease status. Different ALS- and Ctrl-derived TES were analyzed and different regions on each tissue section were also analysed (ALS: $n = 4$; Ctrl: $n = 4$). Normalization was done on the region 1700-1000 cm^{-1} .

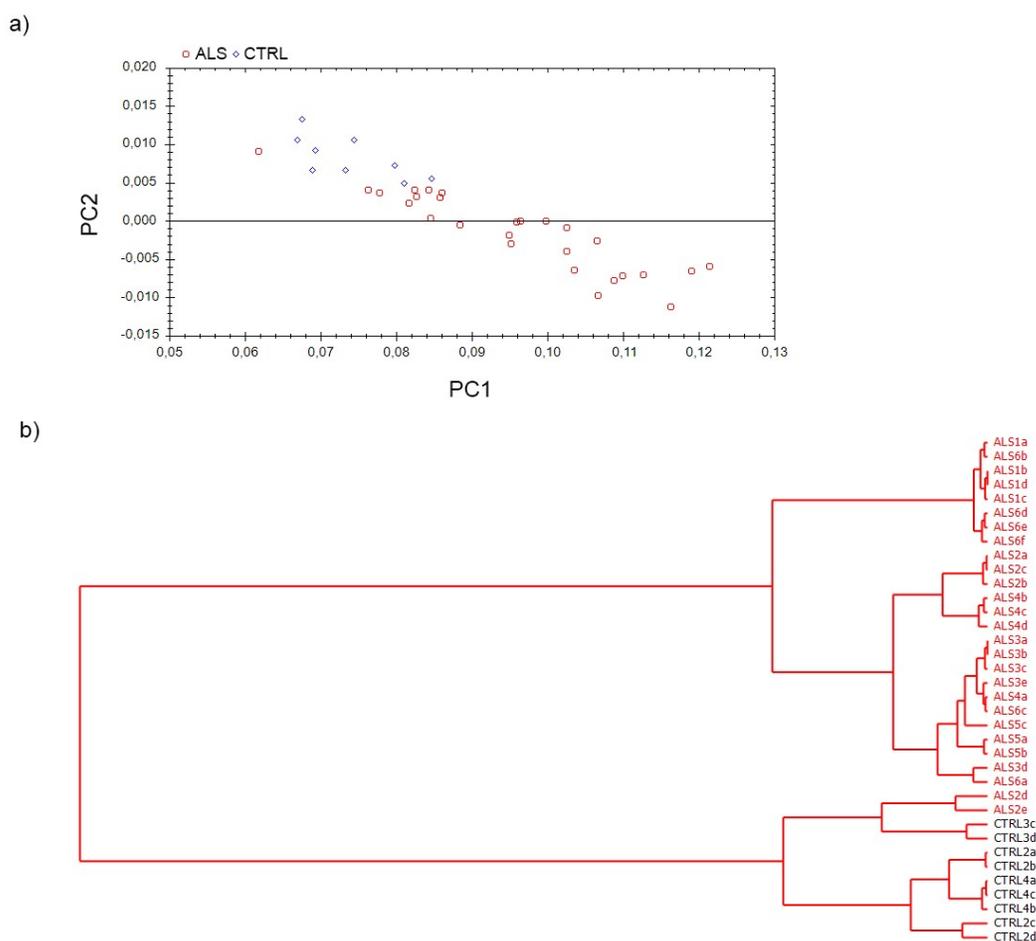


Figure 2.5 : PCA and HCA analysis from wavenumbers attributed to lipid and extracellular matrix protein composition (2900-2916, 3001-3016, 3097-3109, 3116-3132 cm^{-1})

a) PCA analysis revealed that ALS (red) and controls (blue) are seemingly different from each other. b) HCA analysis revealed an almost perfect discrimination between ALS and Ctrl TES samples. Different ALS- and Ctrl-derived TES were analyzed and different regions on each tissue section were also analyses (ALS: $n = 6$; Ctrl: $n = 3$). Normalization was done on the region 1700-1000 cm^{-1} .

PCA score plots were generated to assess if it possible to discriminate the tested samples according to the disease status (Figure 2.4a and Figure 2.5a). The PCA results were first generated by using spectral windows in the ranges 1499-1511, 1586-1598 cm^{-1} , covering spectral features characteristic of amino acid side chains (Figure 2.4a), as well as for spectral windows in the ranges 2900-3200 cm^{-1} , covering spectral features of lipids, collagen and other extracellular matrix proteins (Figure 2.5a). The separation based on the disease status (ALS vs. control) of the TES samples is readily apparent from the plots

(Figure 2.4a and Figure 2.5a). Control samples appear to be more spread on both PC1 and PC2 in the Amide I and Amide II-derived PCA plot, indicating a higher variability in intensity for these spectra on the selected wavenumbers. ALS-TES seem to be more located in the center, indicating less variability among samples and similarity in cell composition between each tested patient-derived TES. As oppose to this result, the variability in cell composition between Ctrl- and ALS-derived TES appeared to be oppositely more important in ALS (Figure 2.5a). This result is in correlation with the previously described extracellular matrix abnormalities in ALS-derived TES (17) and indicates that ALS-derived TES have a higher degree of variability in ECM composition.

HCA analyses were also performed and dendrogram were generated to assess the similarity of the samples on these wavenumbers. Dendrograms are diagram trees frequently used to illustrate the arrangement of clusters produced by hierarchical clustering (41). Clustering of the sample according to the disease status is also readily apparent on each of the two dendrograms derived from the two different analyzed spectral regions (Figure 2.4b and Figure 2.5b). The degree of similarity/dissimilarity can also be observed given the number of clusters and higher horizontal distances associated with either ALS- or Ctrl-derived TES from each of the analyzed spectral regions. Each joining (fusion) of two clusters is represented on the dendrograms by the splitting of one horizontal line. The horizontal position of the split, shown by the short vertical bar, gives the distance (dissimilarity) between the two clusters. The dissimilarities between each of the tested TES can also be observed by looking at the horizontal distance between clusters.

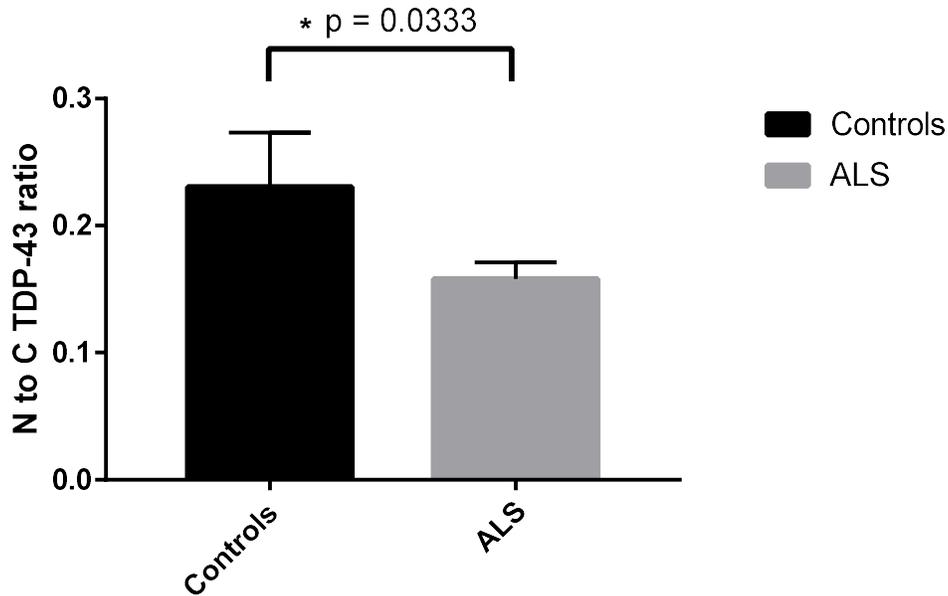


Figure 2.6 : TDP-43 delocalisation in ALS-derived TES quantified by ELISA

For each sample, the amount of TDP-43 was normalised over the total protein content of the fraction and the ratio of the nuclear fraction over the cytoplasm fraction was calculated. A smaller nuclear to cytoplasm ratio indicates TDP-43 delocalization from the nucleus to the cytoplasm, a well-known pathological signature of ALS. Data is reported as mean \pm SEM. Statistically significant smaller nuclear to cytoplasm ratio can be observed in ALS-derived TES as expected (one tailed Mann-Whitney, $p = 0,0333$).

To confirm TDP-43 delocalization and the cytoplasmic accumulation of TDP-43, previously shown to acquire anti-parallel β -sheets structure (19, 42) in its aggregated cytoplasmic form, TDP-43 protein fractionation was performed. ELISA against TDP-43 nuclear and cytoplasmic fractions revealed smaller nuclear to cytoplasm ratio in ALS-TES than in CTRL-TES (Figure 2.6).

2.6 Discussion

ALS is a neurodegenerative disease characterized by the accumulation of ubiquitinated and misfolded protein conformations within the cytoplasm of motor neurons. Although these pathological aggregates can be easily observed in post-mortem brain and spinal tissues, their detection outside the CNS in living patients is more challenging. FTIR microspectroscopy has had an increasingly important role in the field of pathology and in the diagnosis of disease states. However, little has been published so far about the use of FTIR spectroscopy in ALS. Diagnostic tests are still insufficient in ALS, as no reliable

disease markers have yet been identified. In the present paper, we used the FTIR technique to differentiate between ALS-derived tissue-engineered skins from non-ALS samples previously shown to exhibit TDP-43 cytoplasmic accumulation.

FTIR spectral Amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) and Amide II ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) regions have been shown to be highly sensitive to protein secondary structure, making it a valuable technique for studying protein aggregation (24, 28). The frequencies surrounding these spectral regions are particularly sensitive to secondary structure based on different hydrogen-bonding environments for α -helix, β -sheet, turn, and other unordered conformations.

Second derivatives of averaged FTIR spectra showed slight differences in the intensity and peak shapes in ALS-TES when compared to control-derived TES (Tableau 2.2). Principal component and hierarchical analyses were employed for this study to highlight the variability existing in the spectral data set recording during the different experiments. Interestingly, our analyses revealed that discrimination between ALS and non-ALS control samples was readily apparent in spectral regions containing the Amide II band, as well as for spectral windows in the ranges lipids and matrix proteins. The detected difference surrounding the Amide II spectral region could presumably be attributed to the increased accumulation of aggregated TDP-43 anti-parallel β -sheet structures as previously shown (19, 42). It could also be potentially attributed to the overall accumulation of well-known ALS-associated misfolded proteins such as SOD1 (43). The differences seen at the higher region could occur because of disruption of phospholipid cell membranes caused by free radicals and/or oxidative stress, implicated in the pathogenesis of ALS (44). It could also be attributed to collagen and other extracellular matrix proteins known to be selectively disorganized in ALS-derived TES (17), as well as attributed to cholesterol (45) found in higher ratio in the cerebrospinal fluids of some ALS patients (46). Some peaks were also found to be from phospholipids, sphingolipids and fatty acids that can be cues to neuronal degeneration in the brain (47) and could possibly be visible in skin. There were also peaks that were attributed to carbohydrates such as glycogen, and mucin, two constituent of the epidermis (27, 39, 40).

Overall, our results show that FTIR spectroscopy may be a promising tool to provide non-invasive ALS diagnosis. It may serve as a fast, low cost and sensitive discriminatory method or as a prognostic test. Further studies with a larger data set are needed to confirm our results and further refine the algorithm for biomonitoring of ALS through skin

testing with FTIR. The results of the present study indicate the accuracy and the potential applicability of the infrared spectroscopic method for the detection of ALS in patient-derived TES and potentially directly in native skin biopsies. The findings described in this work could constitute a major advance in ALS diagnosis and biomarker discoveries, as no in vivo diagnostic tool nor specific disease biomarkers is currently available for ALS.

2.7 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, and the W. Garfield Weston Foundation through the Weston Brain Institute. FGL is the recipient of a tier 2 Canada research Chair. BP is the recipient of a Fonds de recherche du Québec en santé (FRQS) and an ALS Canada Doctoral Research award. We would like to thank Lydia Touzel Deschênes for skillful technical assistance. We would also like to thank Hayline Kim, a PhD student at McGill University, for her help acquiring some of the spectra with the infrared spectrometer at Health Canada in Longueuil.

2.8 Author contributions

CM produced the TES used for this experiment, generated all the figures used in this publication, wrote the first draft of the article and helped with corrections. BP contributed to this project at the preliminary stage with skin production and FTIR spectra acquisition. Both CM and TT contributed with FTIR spectra acquisition and data analysis. AAI is the FTIR specialist that supervised the IR part of this project, helped with FTIR data acquisition and analysis, as well as corrected the IR part of this article. HTK is the neurosurgeon that is responsible of the biopsies and ND is the neurologist who follows ALS patients and enrolls them in this study. FGL planned and supervised this work, and contributed to the manuscript redaction and correction. All authors discussed the results and commented the manuscript.

2.9 References

1. Hardiman, O., van den Berg, L. H., and Kiernan, M. C. (2011) Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 639–649
2. Gros-Louis, F., Gaspar, C., and Rouleau, G. A. (2006) Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 956–972

3. Byrne, S., Walsh, C., Lynch, C., Bede, P., Elamin, M., Kenna, K., Mclaughlin, R., and Hardiman, O. (2010) Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **82**, 623–628
4. Turner, M., Bowser, R., Brujin, L., Dupuis, L., and Ludolph, A. (2013) Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener* **14**, 19–32
5. Turner, M. R., Kiernan, M. C., Leigh, P. N., and Talbot, K. (2009) Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **8**, 94–109
6. Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**, 130–133
7. Cooper-Knock, J., Hewitt, C., Highley, J. R., Brockington, A., Milano, A., Man, S., Martindale, J., Hartley, J., Walsh, T., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Fox, M., Bury, J., Mok, K., McDermott, C. J., Traynor, B. J., Kirby, J., Wharton, S. B., Ince, P. G., Hardy, J., and Shaw, P. J. (2012) Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain* **135**, 751–764
8. Hart, M. P., Brettschneider, J., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., and Gitler, A. D. (2012) Distinct TDP-43 pathology in ALS patients with ataxin 2 intermediate-length polyQ expansions. *Acta Neuropathol.* **124**, 221–230
9. Neumann, M., Mackenzie, I. R., Cairns, N. J., Boyer, P. J., Markesbery, W. R., Smith, C. D., Taylor, J. P., Kretzschmar, H. A., Kimonis, V. E., and Forman, M. S. (2007) TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 152–157
10. Pokrishevsky, E., Grad, L. I., Yousefi, M., Wang, J., Mackenzie, I. R., and Cashman, N. R. (2012) Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **7**, 1–9
11. Tan, C. F., Eguchi, H., Tagawa, A., Onodera, O., Iwasaki, T., Tsujino, A., Nishizawa, M., Kakita, A., and Takahashi, H. (2007) TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol.* **113**, 535–542
12. Yamashita, S., Kimura, E., Tawara, N., Sakaguchi, H., Nakama, T., Maeda, Y., Hirano, T., Uchino, M., and Ando, Y. (2013) Optineurin is potentially associated with TDP-43 and involved in the pathogenesis of inclusion body myositis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 406–416
13. Kwong, L. K., Neumann, M., Sampathu, D. M., Lee, V. M. Y., and Trojanowski, J. Q. (2007) TDP-43 proteinopathy: The neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta Neuropathol.* **114**, 63–70

14. Hortobágyi, T. and Cairns, N. J. (2018) Chapter 26 - Amyotrophic lateral sclerosis and non-tau frontotemporal lobar degeneration. *Handb. Clin. Neurol.* **145**, 369–381
15. Jeromin, A. and Bowser, R. (2017) Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. In *Neurodegenerative Diseases* pp. 491–528,
16. Feneberg, E., Gray, E., Ansorge, O., Talbot, K., and Turner, M. R. (2018) Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTLD. *Mol. Neurobiol.* 1–13
17. Paré, B., Touzel-Deschênes, L., Lamontagne, R., Lamarre, M.-S., Scott, F.-D., Khuong, H. T., Dion, P. a, Bouchard, J.-P., Gould, P., Rouleau, G. a, Dupré, N., Berthod, F., and Gros-Louis, F. (2015) Early detection of structural abnormalities and cytoplasmic accumulation of TDP-43 in tissue-engineered skins derived from ALS patients. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 5
18. Paré, B. and Gros-Louis, F. (2017) Potential skin involvement in ALS: Revisiting Charcot's observation-A review of skin abnormalities in ALS. *Rev. Neurosci.* **28**, 551–572
19. Jiang, L. L., Che, M. X., Zhao, J., Zhou, C. J., Xie, M. Y., Li, H. Y., He, J. H., and Hu, H. Y. (2013) Structural transformation of the amyloidogenic core region of TDP-43 protein initiates its aggregation and cytoplasmic inclusion. *J. Biol. Chem.* **288**, 19614–19624
20. Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Gardner, P., and Martin, F. L. (2014) Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* **9**, 1771–1791
21. Larouche, D., Cantin-Warren, L., Desgagné, M., Guignard, R., Martel, I., Ayoub, A., Lavoie, A., Gauvin, R., Auger, F. A., Moulin, V. J., and Germain, L. (2016) Improved Methods to Produce Tissue-Engineered Skin Substitutes Suitable for the Permanent Closure of Full-Thickness Skin Injuries. *Biores. Open Access* **5**, 320–329
22. Jolliffe, I. T. (1986) *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag New York
23. Amiali, N. M., Golding, G. R., Sedman, J., Simor, A. E., and Ismail, A. A. (2011) Rapid identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**, 157–166
24. Kong, J. and Yu, S. (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **39**, 549–559
25. Jackson, M. and Mantsch, H. H. (1991) Protein secondary structure from FT-IR spectroscopy: correlation with dihedral angles from three-dimensional Ramachandran plots. *Can. J. Chem.* **69**, 1639–1642
26. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101

27. Bukowska, J., Piotrowski, P., and Baranska, M. (2014) Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine. (Baranska, M., ed) Springer Netherlands
28. Murphy, B. M., D'Antonio, J., Manning, M. C., and Al-Azzam, W. (2014) Use of the Amide II Infrared Band of Proteins for Secondary Structure Determination and Comparability of Higher Order Structure. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **15**, 880–889
29. Caine, S., Heraud, P., Tobin, M. J., McNaughton, D., and Bernard, C. C. A. (2012) The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of diseased central nervous system tissue. *Neuroimage* **59**, 3624–3640
30. Chapman, D. (1965) Infrared spectroscopy of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 353–371
31. Schmidt, C., Penneys, N. S., and Ziboh, V. A. (1977) Cholesterol and cholesteryl ester content in normal and pathologic scale. *J. Invest. Dermatol.* **68**, 206–209
32. Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 141–173
33. Barber, S. C., Mead, R. J., and Shaw, P. J. (2006) Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1762**, 1051–1067
34. Gough, K. M., Zelinski, D., Wiens, R., Rak, M., and Dixon, I. M. C. (2003) Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1suppression. *Anal. Biochem.* **316**, 232–242
35. Singh, B. (1999) Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins. *ACS Symp. Ser.*
36. Ami, D., Lavatelli, F., Rognoni, P., Palladini, G., Raimondi, S., Giorgetti, S., Monti, L., Doglia, S. M., Natalello, A., and Merlini, G. (2016) In situ characterization of protein aggregates in human tissues affected by light chain amyloidosis: a FTIR microspectroscopy study. *Sci. Rep.* **6**, 1–12
37. Brézillon, S., Untereiner, V., Lovergne, L., Tadeo, I., Noguera, R., Maquart, F. X., Wegrowski, Y., and Sockalingum, G. D. (2014) Glycosaminoglycan profiling in different cell types using infrared spectroscopy and imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 5795–5803
38. Chen, L., Holman, H. Y. N., Hao, Z., Bechtel, H. A., Martin, M. C., Wu, C., and Chu, S. (2012) Synchrotron infrared measurements of protein phosphorylation in living single PC12 cells during neuronal differentiation. *Anal. Chem.* **84**, 4118–4125
39. Chakraborty, S., Bonthu, N., Swanson, B. J., and Batra, S. K. (2011) Role of Mucins in the Skin During Benign and Malignant Conditions. *Cancer Lett.* **301**, 127–141
40. MONTAGNA, W., CHASE, H. B., and HAMILTON, J. B. (1951) The distribution of glycogen and lipids in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **17**, 147–157

41. Zhang, Z., Murtagh, F., Van Poucke, S., Lin, S., and Lan, P. (2017) Hierarchical cluster analysis in clinical research with heterogeneous study population: highlighting its visualization with R. *Ann. Transl. Med.* **5**, 75–75
42. Zhu, L., Xu, M., Yang, M., Yang, Y., Li, Y., Deng, J., Ruan, L., Liu, J., Du, S., Liu, X., Feng, W., Fushimi, K., Bigio, E. H., Mesulam, M., Wang, C., and Wu, J. Y. (2014) An ALS-mutant TDP-43 neurotoxic peptide adopts an anti-parallel β -structure and induces TDP-43 redistribution. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 6863–6877
43. Bosco, D. A., Morfini, G., Karabacak, N. M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B. A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, M. P., Agar, J. N., Julien, J. P., Brady, S. T., and Brown, R. H. (2010) Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci.* **13**, 1396–1403
44. Barber, S. C. and Shaw, P. J. (2010) Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 629–641
45. Pappas, A. (2009) Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* **1**, 72–76
46. Abdel-Khalik, J., Yutuc, E., Crick, P. J., Gustafsson, J.-Å., Warner, M., Roman, G., Talbot, K., Gray, E., Griffiths, W. J., Turner, M. R., and Wang, Y. (2017) Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Lipid Res.* **58**, 267–278
47. Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'H, P., Kouassi Nzoughet, J., Lenaers, G., Andres, C. R., Simard, G., Corcia, P., and Reynier, P. (2017) Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS. *Sci. Rep.* **7**, 1–10

Chapitre 3 : Discussion

La SLA est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par l'accumulation de protéines ubiquitinées et mal repliées dans le cytoplasme des neurones moteurs. Bien que ces agrégats pathologiques soient facilement observables dans les tissus post-mortem du cerveau et de la moelle épinière, leur détection à l'extérieur du système nerveux central chez les patients en vie représente un plus grand défi. La spectroscopie infrarouge a démontré un gain d'importance dans le domaine de la pathologie et du diagnostic de l'état d'une maladie. Cependant, peu de données ont été publiées dans la littérature concernant la spectroscopie infrarouge et la SLA. Les tests diagnostiques sont encore insuffisants pour la SLA, car aucun marqueur fiable de la maladie n'a été identifié à l'heure actuelle. Dans ce projet de recherche, la spectroscopie infrarouge a été utilisée pour différencier des tissus reconstruits dérivés de patients SLA et d'individus sains qui ont déjà montré par le passé une accumulation cytoplasmique de TDP-43.⁸¹

Les régions spectrales Amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) et Amide II ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) sont connues pour être sensibles aux changements dans la structure secondaire des protéines, ce qui rend la technique de spectroscopie infrarouge intéressante pour étudier l'agrégation de protéines.^{163,213} Les nombres d'ondes aux alentours de ces régions sont particulièrement sensibles à la structure secondaire des protéines de par les environnements différents associés aux liaisons hydrogène des hélices α , des feuillets β , des coudes et des structures désordonnées.

Les dérivées secondes des spectres infrarouges moyens montrent de légères différences dans l'intensité et la forme des pics sur les spectres des peaux reconstruites SLA quand ils sont comparés à ceux des contrôles (pour un résumé des observations, voir tableau 2.2). Les PCA ont été utilisés dans ce projet pour mettre en évidence la variabilité présente entre les spectres des échantillons qui ont été analysés. Il est intéressant de noter que les analyses ont permis de discriminer les tissus SLA et contrôles sur la plage de nombres d'ondes correspondant à la bande Amide II, ainsi que sur la plage correspondant aux lipides et à des protéines de la matrice extracellulaire. Les différences détectées au niveau de la bande Amide II peuvent sans doute être attribuées à une augmentation de la quantité d'agrégats de TDP-43 sous forme de feuillets antiparallèles β .^{213,214} Ces changements pourraient aussi être attribués à l'accumulation globale de plusieurs protéines qui sont connues pour former des agrégats dans la SLA, comme

SOD1.⁴⁴ Les différences observées aux nombres d'ondes plus élevés pourraient provenir de perturbations au niveau des phospholipides des membranes cellulaires causées par l'accumulation de radicaux libres ainsi que le stress oxydatif impliqué dans la pathogenèse de la maladie.^{154,215,216} Ces changements pourraient aussi être attribués au collagène et à d'autres protéines de la matrice extracellulaire qui sont connues pour être sélectivement désorganisées dans les peaux reconstruites SLA⁸¹, ainsi que le cholestérol²¹⁷ qui est retrouvé dans des proportions élevées dans le liquide cébrospinal de certains patients SLA.²¹⁸ Certains pics ont été associés aux phospholipides, aux sphingolipides et aux acides gras qui peuvent être signes de dégénérescence neuronale du cerveau²¹⁹ et qui pourraient possiblement être visible dans la peau. D'autres pics ont aussi été attribués aux glucides comme le glycogène et les mucines, deux constituants de l'épiderme.^{154,220,221}

En résumé, les résultats obtenus ont permis de montrer que la spectroscopie infrarouge pourrait être un outil prometteur pour l'étude non invasive de la SLA. Elle peut servir de technique rapide, peu coûteuse, et sensible, comme méthode de discrimination ou de test pronostic. Les découvertes présentées pourraient constituer une avancée majeure dans le diagnostic de la SLA et la découverte de biomarqueurs, car il n'existe actuellement aucun outil diagnostique *in vivo* ni de biomarqueurs spécifiques pour cette maladie.

Chapitre 4 : Conclusions et perspectives

La spectroscopie infrarouge a donc été utilisée sur les peaux reconstruites en laboratoire afin de caractériser davantage le modèle tissulaire et de tenter de différencier des tissus contrôles de tissus malades. Pour ce faire, des peaux reconstruites ont été produites selon la technique d'auto assemblage développée au LOEX et adaptée aux cellules de patients SLA. Les échantillons produits ont par la suite été sondés avec un appareil de spectroscopie infrarouge afin d'obtenir leurs spectres infrarouges. Ceux-ci ont par la suite été comparés entre eux afin d'observer les similitudes et les différences présentes entre les contrôles et les patients SLA. De plus, un ELISA sur la protéine TDP-43, une protéine qui est bien connue pour être délocalisée du noyau au cytoplasme et former des agrégats, a été effectué.²²² Cette dernière analyse visait à confirmer le phénotype SLA des peaux reconstruites malades.

Les résultats ont montré que certains nombres d'ondes en lien avec des composants de la matrice extracellulaire varient entre les échantillons. C'est le cas notamment du collagène qui est une protéine très présente dans la matrice extracellulaire. Par ailleurs, différents nombres d'ondes ont été associés à des changements de la composition en structures secondaires des protéines. De plus, des différences au niveau des lipides ont été observées sur les spectres. Il s'agit d'une direction de recherche qui n'avait pas encore été étudiée sur les peaux reconstruites SLA. Il s'agit donc d'une découverte intéressante qui pourrait faire l'objet de futures études. L'ELISA sur TDP-43 a, quant à lui, montré une proportion légèrement plus faible de la protéine dans le noyau par rapport au cytoplasme pour les échantillons SLA comparativement aux contrôles sains, ce qui confirme le phénotype SLA.

Des analyses infrarouges supplémentaires pourraient être faites pour caractériser uniquement le derme et uniquement l'épiderme afin de mieux différencier les deux couches et ainsi déterminer quelles sont les biomolécules qui diffèrent. En effet, puisque l'épiderme et le derme ne sont pas constitués des mêmes cellules, ils peuvent présenter des patrons d'absorptions différents et pourraient permettre de découvrir certaines biomolécules intéressantes. Il pourrait également être intéressant de localiser des foyers d'agrégation de TDP-43 grâce à des immunomarquages et ensuite les analyser par spectroscopie infrarouge afin de caractériser ces régions davantage.

Dans un second temps, des études supplémentaires avec un nombre plus élevé de données provenant d'un plus grand nombre de patients seraient à envisager pour confirmer les résultats obtenus et raffiner l'algorithme pour le suivi de la SLA dans la peau par FTIR. Par la suite, il serait intéressant d'ajouter des individus asymptomatiques afin de faire un test de dépistage, en plus de faire des analyses FTIR sur des patients à différents stades de sévérité de la maladie en utilisant des peaux reconstruites dérivées de patients SLAf.

Certaines difficultés ont été rencontrées lors des expérimentations. Tout d'abord, la production des équivalents cutanés demande beaucoup de soins pour parvenir à obtenir de belles peaux pour les analyses. Quelques variations de la technique usuelle ont été testées afin de trouver les conditions gagnantes pour les cellules en notre possession. De plus, quelques composés d'enrobages ont été essayés pour trouver celui qui donnait les résultats optimaux lors de l'acquisition des spectres infrarouges. L'OCT est celui qui a été choisi pour des raisons d'accessibilité, de facilité de coupe, ainsi que pour son absence de bandes interférant avec la bande Amide I.

Pour caractériser davantage le modèle, il serait également intéressant d'utiliser d'autres techniques et ainsi obtenir des informations complémentaires. Par exemple, la spectroscopie Raman pourrait être utilisée.^{198,223,224} Celle-ci permet d'obtenir le même type d'informations que les spectres infrarouges. Cependant, elle diffère de par la façon dont les liaisons dans les molécules sont excitées. Par ailleurs, elle offre des informations complémentaires, car les vibrations qui ne sont pas actives en infrarouge le sont en Raman, et à l'inverse, celles qui ne le sont pas en Raman le sont en infrarouge.¹⁵⁹ Les deux techniques sont donc complémentaires pour tirer le maximum d'information du point de vue spectroscopique.

Une autre technique intéressante serait le marquage isotopique. Cette technique permet de remplacer des acides aminés par d'autres contenant des isotopes qui peuvent par la suite provoquer des déplacements dans les nombres d'ondes des spectres infrarouges.¹⁹⁶ Cela confirmerait certaines assignations de nombres d'ondes qui ont été faites concernant la chaîne latérale de certains acides aminés. Elle peut ainsi mettre en évidence des vibrations d'acides aminés qui étaient masquées par d'autres pics sur les spectres.

Une troisième technique pertinente est la spectrométrie de masse de type MALDI qui offrirait encore plus d'information sur les équivalents cutanés. En effet, cette technique de spectrométrie de masse permet de cibler des zones de l'échantillon et de faire des analyses en spectrométrie de masse à certains endroits bien précis des échantillons.²²⁵ Cela permettrait par exemple de mieux caractériser les différentes couches de cellules, soit le derme et l'épiderme, en plus de possiblement localiser des zones où il y aurait présence d'agrégats de protéines.

Bien que la spectroscopie infrarouge soit une technique simple à mettre en place et qui fournit rapidement des résultats, elle ne permet pas de déterminer avec précision une molécule en particulier qui peut être impliquée dans une pathologie. Ces techniques complémentaires auraient pour objectifs de confirmer les résultats infrarouges en plus d'ajouter un niveau de précision supplémentaire. Certaines de ces techniques sont par ailleurs assez faciles à mettre en place si les appareils requis sont disponibles. La spectroscopie infrarouge est donc un premier volet d'analyse qui permet d'obtenir plusieurs pistes d'information relativement facilement afin de procéder à des analyses subséquentes plus poussées à l'aide d'autres techniques d'analyse.

Une fois ces différentes caractérisations effectuées, il serait intéressant de pousser les analyses vers des biopsies cutanées natives. En effet, le modèle de peaux présente de nombreux avantages, dont celui d'être une source de matériel biologique renouvelable pour effectuer différentes analyses de nature exploratoire. Cependant, il ne s'agit pas d'une peau complète, puisqu'elles ne sont constituées que de fibroblastes et de kératinocytes. Une biopsie cutanée offrirait l'opportunité d'élargir la caractérisation à l'ensemble du tissu natif et ainsi permettre d'observer certains éléments qui sont absents des peaux reconstruites et qui pourraient avoir un rôle important dans la maladie.

L'objectif à long terme serait de développer une sonde infrarouge qui pourrait être utilisée directement sur la peau d'un patient sans avoir recours à la prise d'une biopsie. Ceci rendrait la technique non invasive et sans douleur pour le patient. Elle pourrait être testée conjointement au diagnostic posé par le neurologue afin de le valider, et éventuellement permettre le diagnostic plus précoce de la maladie.

L'approche utilisée ici a donc permis de caractériser davantage le modèle qui a été développé, mais de nombreuses caractérisations restent à faire afin de pousser l'analyse

plus loin. Par ailleurs, la transition vers le tissu natif reste nécessaire afin d'avoir une vue d'ensemble de la peau et des modifications que la SLA peut avoir sur celle-ci.

Bibliographie

1. Logroscino, G. *et al.* Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 6–11 (2008).
2. Logroscino, G. *et al.* Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **81**, 385–390 (2010).
3. Mehta, P. *et al.* Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis - United States, 2012-2013. *MMWR. Surveill. Summ.* **65**, 1–12 (2016).
4. Mehta, P. *et al.* Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis — United States , 2012 – 2013. *Surveill. Summ.* **65**, 2012–2013 (2016).
5. Puts, M. T. E. *et al.* Meeting the needs of the aging population: The canadian network on aging and cancer—report on the first network meeting, 27 april 2016. *Curr. Oncol.* **24**, e163–e170 (2017).
6. Bergman, H. *et al.* Understanding and meeting the needs of the older population: a global challenge. *Can. Geriatr. J.* **16**, 61–5 (2013).
7. Rowland, L. P. How Amyotrophic Lateral Sclerosis Got Its Name. *Arch. Neurol.* **58**, 512–515 (2001).
8. Hardiman, O., van den Berg, L. H. & Kiernan, M. C. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 639–649 (2011).
9. Venizelos, A. P., Brown, H. G. & Fisher, M. A. Rapidly fatal neuropathies and an ALS clinical presentation. *Acta Neurol. Scand.* **124**, 282–289 (2011).
10. Corcia, P. *et al.* Causes of death in a post-mortem series of ALS patients. *Amyotroph. Lateral Scler.* **9**, 59–62 (2008).
11. Chiò, A. *et al.* Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph. Lateral Scler.* **10**, 310–323 (2009).
12. Shaw, P. J. Genetic inroads in familial ALS. *Nat. Genet.* **29**, 103–104 (2001).
13. Shaw, P. J. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**, 1046–1057 (2005).
14. Blasco, H. *et al.* Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can J Neurol Sci* **44**, 90–95 (2017).
15. Turner, M., Bowser, R., Brujin, L., Dupuis, L. & Ludolph, A. Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front. Degener* **14**, 19–32 (2013).
16. Gros-Louis, F., Gaspar, C. & Rouleau, G. A. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 956–72 (2006).

17. Byrne, S. *et al.* Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **82**, 623–627 (2011).
18. Byrne, S. *et al.* Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: A population-based cohort study. *Lancet Neurol.* **11**, 232–240 (2012).
19. Peters, O. M. & Jr., R. H. B. *Chapter 18 - Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurobiology of Brain Disorders* (Academic Press, 2015). doi:10.1002/9780470376461.ch19
20. Chia, R., Chiò, A. & Traynor, B. J. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol.* **17**, 94–102 (2018).
21. Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 162–172 (2017).
22. Byrne, S. *et al.* Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **82**, 623–628 (2010).
23. Vyas, K. J. & Weiss, J. H. BMAA - an unusual cyanobacterial neurotoxin. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2968**, (2017).
24. Juntas-Morales, R., Pageot, N., Corcia, P. & Camu, W. Facteurs environnementaux dans la SLA. *Press. Medicale* **43**, 549–554 (2014).
25. Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F. & Fang, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Epidemiol.* **7**, 181–193 (2015).
26. Swinnen, B. & Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 661–670 (2014).
27. Al-Chalabi, A. & Lewis, C. M. Modelling the effects of penetrance and family size on rates of sporadic and familial disease. *Hum. Hered.* **71**, 281–288 (2011).
28. Turner, M. R. *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **12**, 310–322 (2013).
29. Conte, A. *et al.* Classification of familial amyotrophic lateral sclerosis by family history: effects on frequency of genes mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **83**, 1201–3 (2012).
30. Sabatelli, M., Conte, A. & Zollino, M. Clinical and genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Genet.* **83**, 408–416 (2013).
31. Liu, J. & Wang, F. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. *Front. Immunol.* **8**, 1–12 (2017).
32. Philips, T. & Robberecht, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* **10**, 253–263 (2011).

33. Pirooznia, S. K., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Motor neuron death in ALS – programmed by astrocytes? *Neuron* **81**, 961–963 (2014).
34. Ferraiuolo, L. *et al.* Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E6496–E6505 (2016).
35. Ling, S., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).
36. Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H. & Pasterkamp, R. J. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **125**, 777–794 (2013).
37. Cohen, T. J. *et al.* An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
38. Sasaki, S., Takeda, T., Shibata, N. & Kobayashi, M. Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **478**, 72–76 (2010).
39. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**, 130–133 (2006).
40. Yang, C. *et al.* Partial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E1121–E1129 (2014).
41. Atkin, G. & Paulson, H. Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 1–17 (2014).
42. Xu, Z., Henderson, R. D., David, M. & McCombe, P. A. Neurofilaments as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **11**, 1–18 (2016).
43. Rotunno, M. S. & Bosco, D. A. An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–16 (2013).
44. Bosco, D. A. *et al.* Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci.* **13**, 1396–1403 (2010).
45. Forsberg, K. *et al.* Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS One* **5**, 1–9 (2010).
46. Musarò, A. Understanding ALS: New therapeutic approaches. *FEBS J.* **280**, 4315–4322 (2013).
47. Miller, R., Mitchell, J. & Moore, D. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* (2012). doi:10.1002/14651858.CD001447.pub3.www.cochranelibrary.com
48. Zoccolella, S. *et al.* Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: a population-based study in southern Italy. *Eur. J. Neurol.* **14**, 262–268 (2007).

49. Voelker, R. News From the Food and Drug Administration. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **318**, 2017 (2017).
50. Sawada, H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Pharmacother.* **18**, 735–738 (2017).
51. Bruijn, L. & Cudkowicz, M. Opportunities for improving therapy development in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **15**, 169–173 (2014).
52. Eggers, S. D. Z., Horn, A. K. E., Roeber, S., Härtig, W. & Nair, G. Use of biomarkers in ALS drug development and clinical trials. *Brain Res.* **1607**, 94–107 (2015).
53. Gladman, M., Cudkowicz, M. & Zinman, L. Enhancing clinical trials in neurodegenerative disorders: lessons from amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **25**, 735–42 (2012).
54. Traynor, B. J., Codd, M. B., Corr, B. & Forde, C. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes - A population-based study. *Iran. J. Neurol.* **15**, 85–91 (2016).
55. Gould, T. W. & Oppenheim, R. W. Motor Neuron Trophic Factors : Therapeutic Use in ALS ? *Brain Res. Rev.* **67**, 1–39 (2011).
56. Yacila, G. & Sari, Y. Potential therapeutic drugs and methods for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Med. Chem.* **21**, 3583–3593 (2014).
57. Boulis, N. M. *et al.* Translational stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 172–176 (2011).
58. Mazzini, L., Vescovi, A., Cantello, R., Gelati, M. & Vercelli, A. Stem cells therapy for ALS. *Expert Opin. Biol. Ther.* **16**, 187–199 (2016).
59. Shefner, J. M. Muscle as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **219**, 373–375 (2009).
60. Zinman, L. & Cudkowicz, M. Emerging targets and treatments in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **10**, 481–490 (2011).
61. Kasner, E., Hunter, C. A., Ph, D., Kariko, K. & Ph, D. The pre-clinical discovery of Amyotrophic Lateral Sclerosis Drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 1127–1138 (2011).
62. Turner, M. R., Kiernan, M. C., Leigh, P. N. & Talbot, K. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **8**, 94–109 (2009).
63. Benatar, M. *et al.* ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle Nerve* **53**, 169–82 (2016).
64. Paganoni, S., Cudkowicz, M. & Berry, J. D. Outcome measures in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Clin. Investig. (Lond)*. **4**, 605–618 (2014).
65. Turner, M. R. *et al.* Towards a neuroimaging biomarker for amyotrophic lateral

- sclerosis. *Lancet Neurol.* **10**, 400–403 (2011).
66. Traynor, B. J. *et al.* Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol* **57**, 1171–1176 (2000).
 67. Gupta, P. K., Prabhakar, S., Sharma, S. & Anand, A. A predictive model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) diagnosis. *J. Neurol. Sci.* **312**, 68–72 (2012).
 68. Ajroud-Driss, S. & Siddique, T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 679–684 (2015).
 69. de Carvalho, M. *et al.* Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical Neurophysiology* **119**, 497–503 (2008).
 70. Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M. & Munsat, T. L. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord.* **1**, 293–299 (2000).
 71. Alvarez-Uría Tejero, M. J., Sáiz Ayala, A., Fernández Rey, C., Santamarta Liébana, M. E. & Costilla García, S. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: advances in magnetic resonance imaging 2011. *Radiologia* **53**, 146–155 (2011).
 72. Paganoni, S. *et al.* Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **15**, 453–456 (2014).
 73. Williams, J. R., Fitzhenry, D., Grant, L., Martyn, D. & Kerr, D. A. Diagnosis pathway for patients with amyotrophic lateral sclerosis: retrospective analysis of the US Medicare longitudinal claims database. *BMC Neurol.* **13**, 160 (2013).
 74. Chieia, M. A., Oliveira, A. S. B., Silva, H. C. A. & Gabbai, A. A. Amyotrophic lateral sclerosis: considerations on diagnostic criteria. *Arq. Neuropsiquiatr.* **68**, 837–42 (2010).
 75. Nzwalo, H., De Abreu, D., Swash, M., Pinto, S. & De Carvalho, M. Delayed diagnosis in ALS: The problem continues. *J. Neurol. Sci.* **343**, 173–175 (2014).
 76. Rowland, L. P. & Shneider, N. A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1688–1700 (2001).
 77. Wilmshurst, J. M., Ciarlini, P. D. S. C. & De Girolami, U. *Nerve Biopsy. Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-417044-5.00005-6
 78. Kanning, K. C., Kaplan, A. & Henderson, C. E. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **33**, 409–440 (2010).
 79. Garbuzova-Davis, S. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: A neurovascular disease. *Brain Res.* **1398**, 113–125 (2011).

80. Kolde, G., Bachus, R. & Ludolph, A. C. Skin involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **347**, 1226–1227 (1996).
81. Paré, B. *et al.* Early detection of structural abnormalities and cytoplasmic accumulation of TDP-43 in tissue-engineered skins derived from ALS patients. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 5 (2015).
82. Lauria, G. & Lombardi, R. Skin biopsy in painful and immune-mediated neuropathies. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **17 Suppl 3**, 38–45 (2012).
83. Philips, T. & Rothstein, J. D. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **69**, 2016 (2016).
84. Doke, S. K. & Dhawale, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm. J.* **23**, 223–229 (2015).
85. Benatar, M. *et al.* ALS Biomarkers for Therapy Development: State of the Field & Future Directions. *Muscle Nerve* **53**, 169–182 (2015).
86. Campbell, N., Reece, J. *Biologie, 4e édition. Pearson Education (ERPI, 2012).*
87. Coward, K. & Wells, D. *Textbook of Clinical Embryology.* (Cambridge University Press, 2013).
88. Ono, S. The skin in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **1**, 191–199 (2000).
89. Abe, K., Ohkubo, T. & Yokota, T. TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Med. Dent. Sci.* **64**, 9–17 (2017).
90. Ayala, Y. M. *et al.* Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell Sci.* **121**, 3778–3785 (2008).
91. Suzuki, M. *et al.* Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **122**, 367–372 (2010).
92. Fang, L. *et al.* Linking neuron and skin: Matrix metalloproteinases in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J. Neurol. Sci.* **285**, 62–66 (2009).
93. Fang, L. *et al.* MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS. *J. Neurol. Sci.* **294**, 51–56 (2010).
94. Sommer, C. *Nerve biopsy or skin biopsy : What to get and what to choose ?* (2017).
95. Pickett, H. Shave and punch biopsy for skin lesions. *Am. Fam. Physician* **84**, 995–1002 (2011).
96. Sleiman, R., Kurban, M. & Abbas, O. Maximizing diagnostic outcomes of skin biopsy specimens. *Int. J. Dermatol.* **52**, 72–78 (2013).
97. Weisfeld, V., English, R. A. & Claiborne, A. B. *Public engagement and clinical trials :*

New models and disruptive technologies. (The national academies press, 2012).

98. Eckert, R. L. & Rorke, E. A. Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ. Health Perspect.* **80**, 109–116 (1989).
99. Barnes, P. J. *et al.* Chapter 15 – Fibroblasts. *Asthma COPD* 193–200 (2009). doi:10.1016/B978-0-12-374001-4.00015-8
100. Keira, S. M., Ferreira, L. M., Gragnani, A., Duarte, I. D. S. & Santos, I. A. N. Dos. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir. Bras.* **19**, 11–16 (2004).
101. Flaxman, B. A. Cell identification in primary cell cultures from skin. *In Vitro* **10**, 112–118 (1974).
102. Werner, S., Krieg, T. & Smola, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 998–1008 (2007).
103. Moulin, V., D, M., A, L.-L., S, L. & H, G. *Chapter 8: In Vitro Culture Methods of Skin Cells for Optimal Skin Reconstruction by Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials.* (InTech, 2011).
104. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science (80-.)*. **260**, 920–926 (1993).
105. Anderson, K. N. *et al.* Isolation and culture of motor neurons from the newborn mouse spinal cord. *Brain Res. Protoc.* **12**, 132–136 (2004).
106. Griffiths, B. Can cell culture medium costs be reduced? Strategies and possibilities. *Trends Biotechnol.* **4**, 268–272 (1986).
107. Beaudet, M.-J. *et al.* High yield extraction of pure spinal motor neurons, astrocytes and microglia from single embryo and adult mouse spinal cord. *Sci. Rep.* **5**, 16763 (2015).
108. Vig, K. *et al.* Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
109. Zhou, H. *et al.* The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **105**, 1208–1218 (2017).
110. Evans, N. D., Oreffo, R. O. C., Healy, E., Thurner, P. J. & Man, Y. H. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **28**, 397–409 (2013).
111. Ho, J., Walsh, C., Yue, D., Dardik, A. & Cheema, U. Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv. Wound Care* **6**, 191–209 (2017).
112. Denda, M. Epidermis as the ‘third Brain’? *Dermatologica Sin.* **33**, 70–73 (2015).
113. Gröne, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **88**, 1–12

(2002).

114. Hirobe, T. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sin.* **32**, 200–204 (2014).
115. Sea, M. & East, M. *Genes and Disease*. (National Center for Biotechnology Information, 2011).
116. Sarkar, D. *et al. Overview of Tissue Engineering Concepts and Applications. Biomaterials Science* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00109-1
117. Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface* **4**, 413–437 (2007).
118. Auger, F. a, Berthod, F., Moulin, V., Pouliot, R. & Germain, L. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39**, 263–275 (2004).
119. Lataillade, J. J., Magne, B., Bey, E., Leclerc, T. & Trouillas, M. L'ingénierie cutanée pour le traitement des brûlures graves. *Transfus. Clin. Biol.* **24**, 245–250 (2017).
120. Freed, L. E. *et al.* Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng.* **12**, 3285–3305 (2006).
121. Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A. & Quiñones-Olvera, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
122. Moore, A., Marshall, C. & Longaker, M. Minimizing Skin Scarring through Biomaterial Design. *J. Funct. Biomater.* **8**, 3 (2017).
123. Oryan, A. & Sahviah, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 1003–1011 (2017).
124. Madhally, S. V. & Matthew, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **20**, 1133–1142 (1999).
125. Kleinman, H. K. & Martin, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378–386 (2005).
126. Vedadghavami, A. *et al.* Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* (2017). doi:10.1016/j.actbio.2017.07.028
127. Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **8**, 607–626 (2011).
128. Bourget, J. M. *et al.* Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 9205–9213 (2012).

129. Beaudoin Cloutier, C. *et al.* In Vivo Evaluation and Imaging of a Bilayered Self-Assembled Skin Substitute Using a Decellularized Dermal Matrix Grafted on Mice. *Tissue Eng. Part A* **23**, 313–322 (2017).
130. Beaudoin Cloutier, C. *et al.* Production of a Bilayered Self-Assembled Skin Substitute Using a Tissue-Engineered Acellular Dermal Matrix. *Tissue Eng. Part C Methods* **21**, 1297–1305 (2015).
131. Kuo, S. *et al.* Comparison of Two Decellularized Dermal Equivalents. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2017). doi:10.1002/term.2530
132. Pedde, R. D. *et al.* Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. *Adv. Mater.* **29**, 1–27 (2017).
133. Aljohani, W., Ullah, M. W., Zhang, X. & Yang, G. Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Int. J. Biol. Macromol.* (2017). doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.171
134. Pourchet, L. J. *et al.* Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1–8 (2017).
135. Klapperich, C. M. & Bertozzi, C. R. Global gene expression of cells attached to a tissue engineering scaffold. *Biomaterials* **25**, 5631–5641 (2004).
136. Larouche, D. *et al.* Improved Methods to Produce Tissue-Engineered Skin Substitutes Suitable for the Permanent Closure of Full-Thickness Skin Injuries. *Biores. Open Access* **5**, 320–329 (2016).
137. Auxenfans, C. *et al.* Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur. J. Dermatology* **19**, 107–113 (2009).
138. Varani, J. *et al.* Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage. *Toxicol. Pathol.* **35**, 693–701 (2007).
139. Osborne, R. & Perkins, M. A. In vitro skin irritation testing with human skin cell cultures. *Toxicol. Vitr.* **5**, 563–567 (1991).
140. Naves, L. B., Dhand, C., Almeida, L., Rajamani, L. & Ramakrishna, S. In vitro skin models and tissue engineering protocols for skin graft applications. *Essays Biochem.* **60**, 357 LP-369 (2016).
141. Brett, E. A. *et al.* A Review of Cell-Based Strategies for Soft Tissue Reconstruction. *Tissue Eng. Part B Rev.* **0**, ten.TEB.2016.0455 (2017).
142. Wang, T., Zhu, L. & Pei, M. Insight into skin cell-based osteogenesis: a review. *F1000Research* **6**, 291 (2017).
143. Gauvin, R. *et al.* A Novel Single-Step Self-Assembly Approach for the Fabrication of Tissue-Engineered. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1737–1747 (2010).

144. Bourget, J.-M. *et al.* Microstructured human fibroblast-derived extracellular matrix scaffold for vascular media fabrication. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 2479–2489 (2016).
145. Vallières, K. *et al.* Human adipose-derived stromal cells for the production of completely autologous self-assembled tissue-engineered vascular substitutes. *Acta Biomater.* **24**, 209–219 (2015).
146. Tondreau, M. Y. *et al.* In Vivo Remodeling of Fibroblast-Derived Vascular Scaffolds Implanted for 6 Months in Rats. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
147. Paquet, C. *et al.* Tissue engineering of skin and cornea: Development of new models for in vitro studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1197**, 166–177 (2010).
148. Georgiou, M. *et al.* Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials* **34**, 7335–7343 (2013).
149. Tremblay, C. *et al.* A New Construction Technique for Tissue-Engineered Heart Valves Using the Self-Assembly Method. *Tissue Eng. Part C Methods* **20**, 905–915 (2014).
150. Picard-Deland, M. *et al.* Tissue-Engineered Tubular Heart Valves Combining a Novel Precontraction Phase with the Self-Assembly Method. *Ann. Biomed. Eng.* **45**, 427–438 (2017).
151. Dubé, J. *et al.* Progress in developing a living human tissue-engineered tri-leaflet heart valve assembled from tissue produced by the self-assembly approach. *Acta Biomater.* **10**, 3563–3570 (2014).
152. Kubo, H. Tissue engineering for pulmonary diseases: Insights from the laboratory. *Respirology* **17**, 445–454 (2012).
153. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101 (2007).
154. Bukowska, J., Piotrowski, P. & Baranska, M. *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine.* (Springer Netherlands, 2014). doi:10.1007/978-94-007-7832-0
155. Miller, L. M., Bourassa, M. W. & Smith, R. J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2339–46 (2013).
156. Kumirska, J. *et al.* Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs* **8**, 1567–1636 (2010).
157. Mahmoud, B. H., Hexsel, C. L., Hamzavi, I. H. & Lim, H. W. Effects of visible light on the skin. *Photochem. Photobiol.* **84**, 450–462 (2008).
158. Sliney, D. H. What is light? The visible spectrum and beyond. *Eye* **30**, 222–229 (2016).

159. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thompson Brooks/Cole (1998). doi:10.1016/S0003-2670(00)84936-3
160. Marcelli, A., Cricenti, A., Kwiatek, W. M. & Petibois, C. Biological applications of synchrotron radiation infrared spectromicroscopy. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1390–1404 (2012).
161. Sedman, J., Ghetler, A., Enfield, A. & Ismail, A. A. *Infrared Imaging: principles and practices*. *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (2010). doi:10.1002/9780470027325.s8938
162. Kotanen, C. N., Moussy, F. G., Carrara, S. & Guiseppi-elie, A. *Encyclopedia of Biophysics*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-16712-6
163. Baker, M. J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* **9**, 1771–1791 (2014).
164. Optimized FTIR Spectrometer design for optical performance. 6 (2011).
165. Kastyak-Ibrahim, M. Z. *et al.* Biochemical label-free tissue imaging with subcellular-resolution synchrotron FTIR with focal plane array detector. *Neuroimage* **60**, 376–383 (2012).
166. Yang, T. T. *et al.* Histopathology mapping of biochemical changes in myocardial infarction by Fourier transform infrared spectral imaging. *Forensic Sci. Int.* **207**, 34–39 (2011).
167. Lasch, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **117**, 100–114 (2012).
168. Trevisan, J., Angelov, P. P., Carmichael, P. L., Scott, A. D. & Martin, F. L. Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives. *Analyst* **137**, 3202–15 (2012).
169. Sujka, K., Koczoń, P., Ceglińska, A., Reder, M. & Ciemniewska-Zytkiewicz, H. The Application of FT-IR Spectroscopy for Quality Control of Flours Obtained from Polish Producers. *J. Anal. Methods Chem.* **2017**, (2017).
170. Gallignani, M., Rondón, R. A., Ovalles, J. F. & Brunetto, M. R. Transmission FTIR derivative spectroscopy for estimation of furosemide in raw material and tablet dosage form. *Acta Pharm. Sin. B* **4**, 376–383 (2014).
171. Cozzolino, D. Near infrared spectroscopy in natural products analysis. *Planta Med.* **75**, 746–756 (2009).
172. Kazarian, S. G. & Chan, K. L. A. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 858–867 (2006).
173. Caine, S., Heraud, P., Tobin, M. J., McNaughton, D. & Bernard, C. C. A. The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of

- diseased central nervous system tissue. *Neuroimage* **59**, 3624–3640 (2012).
174. Leroy, M., Lefèvre, T., Pouliot, R., Auger, M. & Laroche, G. Using infrared and Raman microspectroscopies to compare ex vivo involved psoriatic skin with normal human skin. *J. Biomed. Opt.* **20**, 67004 (2015).
 175. Bunaciu, A. a., Hoang, V. D. & Aboul-Enein, H. Y. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **45**, 156–165 (2015).
 176. Wald, N., Le Corre, Y., Martin, L., Mathieu, V. & Goormaghtigh, E. Infrared spectra of primary melanomas can predict response to chemotherapy: The example of dacarbazine. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 174–181 (2016).
 177. Wald, N. & Goormaghtigh, E. Infrared imaging of primary melanomas reveals hints of regional and distant metastases. *Analyst* **140**, 2144–2155 (2015).
 178. Mordechai, S. *et al.* Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *J. Microsc.* **215**, 86–91 (2004).
 179. Zelig, U., Kapelushnik, J., Moreh, R., Mordechai, S. & Nathan, I. Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophys. J.* **97**, 2107–2114 (2009).
 180. Martin, F. L. *et al.* Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. *Nat. Protoc.* **5**, 1748–1760 (2010).
 181. Al-Khalidi, S. F., Mossoba, M. M., Ismail, A. a & Fry, F. S. Accelerating bacterial identification by infrared spectroscopy by employing microarray deposition of microorganisms. *Foodborne Pathog. Dis.* **1**, 172–7 (2004).
 182. Andrew Chan, K. L. & Kazarian, S. G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1850–1864 (2016).
 183. Sreedhar, H. *et al.* High-definition Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopic imaging of human tissue sections towards improving pathology. *J. Vis. Exp.* 52332 (2015). doi:10.3791/52332
 184. Ali, S. M. *et al.* A comparison of Raman, FTIR and ATR-FTIR micro spectroscopy for imaging human skin tissue sections. *Anal. Methods* **5**, 2281 (2013).
 185. Lasch, P., Chiriboga, L., Yee, H. & Diem, M. Infrared spectroscopy of human cells and tissue: detection of disease. *Technol. Cancer Res. Treat.* **1**, 1–7 (2002).
 186. Banyay, M., Sarkar, M. & Gräslund, A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys. Chem.* **104**, 477–488 (2003).
 187. Wiercigroch, E. *et al.* Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **185**, 317–335 (2017).
 188. Chapman, D. Infrared spectroscopy of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 353–371

(1965).

189. Singh, B. Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins. *ACS Symp. Ser.* (1999).
190. Byler, D. M. & Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, 469–487 (1986).
191. Kong, J. & Yu, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **39**, 549–559 (2007).
192. Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A. & Yu, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* **10**, 382–396 (2015).
193. Surewicz, W. K., Mantsch, H. H. & Chapman, D. Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment. *Biochemistry* **32**, 389–394 (1993).
194. Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M. & Raussens, V. Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. *Biophys. J.* **90**, 2946–2957 (2006).
195. Gelfand, P., Smith, R. J., Stavitski, E., Borchelt, D. R. & Miller, L. M. Characterization of Protein Structural Changes in Living Cells Using Time-Lapsed FTIR Imaging. *Anal. Chem.* **87**, 6025–6031 (2015).
196. Haris, P. I. Probing protein–protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2265–2271 (2013).
197. Lu, R. *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy on external perturbations inducing secondary structure changes of hemoglobin. *Analyst* **141**, 6061–6067 (2016).
198. Flach, C. R. & Moore, D. J. Infrared and Raman imaging spectroscopy of ex vivo skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 125–135 (2013).
199. Makretsov, N. a *et al.* Hierarchical Clustering Analysis of Tissue Microarray Immunostaining Data Identifies Prognostically Significant Groups of Breast Carcinoma Hierarchical Clustering Analysis of Tissue Microarray Immunostaining Data Identifies Prognostically Significant Grou. **10**, 6143–6151 (2004).
200. Robidoux, S. & Pritchard, S. C. Hierarchical clustering analysis of reading aloud data: A new technique for evaluating the performance of computational models. *Front. Psychol.* **5**, 1–7 (2014).
201. Jolliffe, I. T., Cadima, J. & Cadima, J. Principal component analysis: a review and recent developments Subject Areas : Author for correspondence : (2016).
202. Wold, S. Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2**, 37–52 (1987).

203. Konishi, T. Principal component analysis for designed experiments. *BMC Bioinformatics* **16 Suppl 1**, S7 (2015).
204. Lever, J., Krzywinski, M. & Altman, N. Points of Significance: Principal component analysis. *Nat. Methods* **14**, 641–642 (2017).
205. Ringnér, M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* **26**, 303–304 (2008).
206. Reich, D., Price, A. L. & Patterson, N. Principal component analysis of genetic data. *Nat. Genet.* **40**, 491–492 (2008).
207. Destefanis, G., Barge, M. T., Brugiapaglia, a. & Tassone, S. The use of principal component analysis (PCA) to characterize beef. *Meat Sci.* **56**, 255–259 (2000).
208. Parakh, S. & Atkin, J. D. Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* **1648**, 633–649 (2016).
209. Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D. W. W. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* **52**, 39–59 (2006).
210. Frey, D. *et al.* Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J. Neurosci.* **20**, 2534–42 (2000).
211. Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* **9**, 408–419 (2006).
212. Gros-Louis, F., Soucy, G., Larivière, R. & Julien, J. P. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J. Neurochem.* **113**, 1188–1199 (2010).
213. Jiang, L. L. *et al.* Structural transformation of the amyloidogenic core region of TDP-43 protein initiates its aggregation and cytoplasmic inclusion. *J. Biol. Chem.* **288**, 19614–19624 (2013).
214. Zhu, L. *et al.* An ALS-mutant TDP-43 neurotoxic peptide adopts an anti-parallel β -structure and induces TDP-43 redistribution. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 6863–6877 (2014).
215. Barber, S. C., Mead, R. J. & Shaw, P. J. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1762**, 1051–1067 (2006).
216. Gough, K. M., Zelinski, D., Wiens, R., Rak, M. & Dixon, I. M. C. Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1suppression. *Anal. Biochem.* **316**, 232–242 (2003).
217. Pappas, A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* **1**, 72–76 (2009).

218. Abdel-Khalik, J. *et al.* Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Lipid Res.* **58**, 267–278 (2017).
219. Blasco, H. *et al.* Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
220. Chakraborty, S., Bonthu, N., Swanson, B. J. & Batra, S. K. Role of Mucins in the Skin During Benign and Malignant Conditions. *Cancer Lett.* **301**, 127–141 (2011).
221. MONTAGNA, W., CHASE, H. B. & HAMILTON, J. B. The distribution of glycogen and lipids in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **17**, 147–157 (1951).
222. Williams, S. M., Khan, G., Harris, B. T., Ravits, J. & Sierks, M. R. TDP-43 protein variants as biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci.* **18**, 20 (2017).
223. Brauchle, E. & Schenke-Layland, K. Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnol. J.* **8**, 288–297 (2013).
224. Brauchle, E. *et al.* Raman microspectroscopy as a diagnostic tool for the non-invasive analysis of fibrillin-1 deficiency in the skin and in the in vitro skin models. *Acta Biomater.* **52**, 41–48 (2017).
225. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **6**, 1–16 (2015).