



**HAL**  
open science

# Optimisation pharmacologique des dérivés de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine

Alexandra Trotier-Faurion

► **To cite this version:**

Alexandra Trotier-Faurion. Optimisation pharmacologique des dérivés de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114810 . tel-00806976

**HAL Id: tel-00806976**

**<https://theses.hal.science/tel-00806976>**

Submitted on 2 Apr 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

### ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE*

**DISCIPLINE : Pharmacologie moléculaire et cellulaire**

ANNÉE 2012 - 2013

SÉRIE DOCTORAT N°

### THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/03/2013

par

**Alexandra TROTIER-FAURION**

Optimisation pharmacologique de dérivés de la créatine  
pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine

**Directeur de thèse :**  
et

**Aloïse MABONDZO**

Docteur (CEA de Saclay, Service de Pharmacologie  
d'Immuno-analyse)

**Composition du jury :**

*Président du jury :*

**Marc PALLARDY**

Professeur des Universités (Université Paris Sud)

*Rapporteurs :*

**Isabelle RICO-LATTES**  
**Olivier BRAISSANT**

Docteur (CNRS UMR 5623, Toulouse)  
Docteur (CHUV, Université de Lausanne, Suisse)

*Examineurs :*

**Jean-Pierre BENOIT**  
**Didier BAZILE**  
**Vassili VALAYANNOPOULOS**

Professeur des Universités (Université d'Angers)  
Docteur (Sanofi-Aventis, Paris)  
Docteur (INSERM U781, Hôpital Necker, Paris)

*Membre invité :*

**Sophie DEZARD**

Ingénieur-Chercheur (CEA de Saclay, Service de  
Chimie Bio-organique et de Marquage)



# Chemical optimization of creatine derivatives for the treatment of creatine transporter deficiency

**Alexandra TROTIER-FAURION (Docteur en Pharmacie)**

*Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Renouvelables (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (iBiTec-S), Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI), Laboratoire d'Étude du Métabolisme des Médicaments (LEMM), 91191 Gif sur Yvette, France*

*Université Paris-Sud XI, Ecole doctorale ED425 Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué, Pôle Pharmacologie et Toxicologie, Discipline Pharmacologie moléculaire et cellulaire*

Creatine transporter deficiency is a rare brain disease associated with the loss of function of the SLC6A8 (creatine transporter) leading to an absence of creatine at the cerebral level and to a dramatic neurodevelopmental retardation in the children. To date, no effective therapy is available.

A potential therapeutic option would be the design of a pharmaceutical formulation of lipophilic prodrugs of creatine that will cross the cell membranes passively and target the neurons in order to restore the creatine content inside these cells.

One of the main purposes of this dissertation is to propose an original chemistry synthesis process of creatine esters with long aliphatic chain. These compounds show interesting pharmacological properties of structure-activity relationship between the length of the aliphatic chain (i.e. lipophilicity) and the ability for the drug to enter cerebral endothelial, astroglial and neuronal cells. According to our experimental observations, the dodecyl ester creatine seems to be the best drug candidate. Moreover, the dodecyl ester is acted on by cellular esterases inside patients' fibroblasts with a functional deficit of the SLC6A8 and increases the intracellular creatine content.

The pharmaceutical formulation developed in this study consists by incorporation of dodecyl ester inside a nanovector (Lipid NanoCapsules). Two main advantages can be gained by nanovectorization: firstly, the dodecyl ester is protected from the degradation by plasmatic esterases before reaching the brain. Secondly, the nanovectorization strategy is highly valuable to brain targeting bypassing the blood-brain barrier, which remains until now a major impediment in the drug design for the Central Nervous System. Our experimental observations highlight this two-step therapeutic strategy for the treatment of the creatine transporter deficiency.

This work was financially supported by the International PhD Program of the Life Sciences division of the CEA and the Fondation Jérôme Lejeune.

## **Key words:**

Blood-brain barrier; rare metabolic disease; treatment of creatine transporter deficiency; creatine esters; pharmaceutical formulation; nanovectorization; Lipid NanoCapsules



J'adresse mes plus sincères remerciements au **Dr Isabelle Rico-Lattes** et au **Dr Olivier Braissant** pour me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie le **Dr Vassili Valayannopoulos** pour son implication et son aide dans ce projet, le **Pr Jean-Pierre Benoit** pour avoir rendu possible une collaboration ainsi que pour son accueil à Angers. Je remercie également le **Dr Didier Bazile** pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma gratitude au **Pr Marc Pallardy** qui m'a donné le goût de la Toxicologie lorsque j'étais son étudiante et qui m'a fait l'honneur de m'accompagner dans le cadre de mon Doctorat de Pharmacie.

Un merci tout particulier au **Dr Aloïse Mabondzo**, mon directeur de thèse, qui m'a fait confiance dès le début pour mener à bien ce projet. Merci pour cette collaboration efficace pendant ces 42 mois de thèse, nous avons formé un bon tandem !

J'adresse ici tous mes remerciements à la Fondation Lejeune pour leur soutien financier ainsi qu'à l'Institut National des Sciences et Techniques du Nucléaire pour le financement de ma thèse via le Programme Doctoral International des Sciences de la Vie du CEA (Irtelis).

Cette thèse a été réalisée au CEA de Saclay, en collaboration entre le Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) dans le Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM) et le Service de Chimie Bio-organique et de Marquage (SCBM) dans le Laboratoire de Marquage au Carbone 14 (LMC). Je souhaite donc adresser tous mes remerciements au **Dr Christophe Créminon** (SPI) et au **Dr Bernard Rousseau** (SCBM) pour m'avoir accueillie dans leurs services respectifs. Je remercie également le **Dr Eric Ezan** et le **Dr Christophe Junot**, successivement chef(s) de laboratoire au LEMM et le **Dr Frédéric Taran**, au LMC, pour m'avoir ouvert la porte de leurs laboratoires.

Un gigantesque merci à **Sophie Dézard** : si j'ai tenu bon devant les multiples difficultés, c'est (entre autre) grâce à ta passion pour ce projet. Nous y avons cru jusqu'au bout ! Merci pour m'avoir fait partager ton univers, m'avoir prêté un coin de ta précieuse paillasse, m'avoir fait suivre les manip même de loin par photo, avoir été si disponible, si dynamique... Merci aussi d'avoir consacré du temps à la relecture de cette thèse dans ton emploi du temps chargé.

L'approche nanovectorisation développée dans ce travail repose sur une collaboration avec l'unité Inserm U1066 Micro et Nanomédecines Biomimétiques (MINT) à Angers. Mes plus sincères remerciements vont au **Pr Catherine Passirani**. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration, sur le plan scientifique et personnel. Merci beaucoup pour l'accueil à Angers, ton écoute et ta disponibilité.

Et surtout, je remercie **Jérôme Béjaud** pour avoir répondu présent 100% du temps (voir plus !). Merci pour ta réactivité, ta bonne humeur et pour avoir jonglé avec tous les projets auxquels tu contribues pour y inclure mes demandes. Contre toute attente, tu auras supporté la « Parisienne » pendant 3 ans... Alors indemne ? ☺ J'ai passé de très bons moments à Angers.

Je tiens à remercier le **Pr Pascale de Lonlay** pour son intérêt dans ce projet, pour sa participation à la correction des publications et pour son implication dans les perspectives cliniques du projet. Merci également à Killian, Louis et les deux Thomas, les patients inclus dans cette étude, et à leurs représentants légaux.

Merci à mes collègues PCEL pour les discussions en salle de culture pendant les longues heures de dissection, pour les ambiances musicales spéciales culture, pour les éclats de rire, la création du Livre d'Or, The Chapeau, les restos, les soirées... Merci à toi, **Anne-Cécile**, « *génie magique* » de notre équipe, pour le temps passé à me former, à m'écouter (à ton profit ou bien au mien...), me seconder. Sans toi l'équipe ne serait pas, je te souhaite de très belles réussites. Merci à toi, « *Genious* » **Lucie**, je n'oublierai pas notre entrée commune le 12 janvier 2009 aux portes du 136. Ma Lucie, merci pour tous les petits et les longs mots, pour m'avoir aiguillée et soutenue dans les moments de doutes et les difficultés, pour m'avoir transmis ta rigueur. Merci à toi, **Agnès**, « *maman Bisounours* » : vive les petits déjeuners, les fous rires, les coups de gueule et les autres bons moments à vouloir refaire le monde. Heureusement que nous sommes réalistes ☺ ! Merci à toi, **Mickaël** : un méga bravo pour ta persévérance à mes côtés et pour avoir réussi à suivre le tourbillon. Merci pour ton soutien sans faille et ton aide sans relâche ! Merci à toi, **Anne**, pour les petits mots sympa, les mises à jour et les astuces si pratiques pour cette fin de thèse. Merci aussi à **Emilie B** avec qui je partageais la frénésie de courir entre les bâtiments du CEA... Merci à **Sandrine**, notre expat lyonnaise : cela m'a fait plaisir de te retrouver à la SEISC. Bienvenue aux nouveaux (**Emilie J** – merci pour les compétences *in vivo* ! – et **Ricardo**)... Petites citations PCEL parmi d'autres : *Dis donc « Cocotte », c'est encore toi qui as piqué les portoirs de culture ?... Allez « Bibiche » !... Il n'y a pas de problème, il n'y a que des solutions... Il y a ce qu'on sait qu'on sait, ce qu'on sait qu'on ne sait pas, mais surtout ce qu'on ne sait pas qu'on ne sait pas... La Nature n'aime pas l'instabilité...*

Un grand merci également à tous les membres du LEMM. A « ceux d'en bas » et « ceux d'en haut » : merci pour les bonjour du matin, les sourires dans les couloirs, les coups de main de manip, les bonnes idées, les éclats de rire et les bonnes blagues (ou pas...) ! Merci à **Henri Bénech** pour m'avoir accompagné au début du projet. Un très grand merci à **Alain Pruvost** pour son écoute, son aide, la disponibilité du planning masse et les mimiques qui en disent long... !! **Sophie, Armelle, Céline D,**

**Elodie, Hélène, Kevin, François F, Aurélie R, Arnaud et Sandrine, Minale, Alexandre, Nicolas, Marie-Françoise, Benoit, Samia** (Vive Capsul® !), **François B, Jérôme C et Cédric** (merci pour les coups de main, les coups de boost et les décodages...). Bravo à l'(ex-?)équipe footing ! Une très spéciale dédicace très reconnaissante à **Aurélié G** alias Orel, **Frédéric** alias Fred, **Grégory** alias Greg et **Emeline** alias Mimine : merci de m'avoir formée à la spectrométrie de masse, de m'avoir épaulée et rassurée devant le Quattro, le Xévo et le Disco, cette sacrée bande de farceurs !

Merci à l'ensemble des collègues du SPI (LERI, LI2A, LIAS, Bertin Pharma et Profilomic), je ne pourrai pas tous vous citer ici mais trouvez ici mes sincères remerciements pour tout ce que vous m'avez apporté pendant ces années de thèse. Merci enfin à celles qui nous sont indispensables : **Sandrine, Laurie et Florence** ! Merci aussi à l'ensemble des membres du SCBM, surtout à **David et Céline** pour leur aide analytique ainsi qu'à **Emilie D**, pour son remarquable travail en tant que stagiaire. Je tiens à remercier également tout particulièrement **Dr Maïté Paternostre** pour ses conseils scientifiques et son dynamisme communicatif !

Merci aux « filles d'Angers » pour leur accueil chaleureux et leurs discussions. Vous m'avez tout de suite intégrée à votre équipe : **Anne-Laure, Anne-Claire, Pauline, Audrey, Leila**,... Ce fut un vrai plaisir de vous rencontrer et je vous souhaite tout le meilleur pour vos fins de thèse respectives.

Enfin, bravo à tous les thésards et thésardes que j'ai croisés à l'Institut et en dehors, notamment mes collègues de **promo Irtelis** (Kahina, Julie, Yan, Mazhoura, Albane, et Jérémie...) et les membres correspondants communication **iBiThèse** avec lesquels nous avons créé une lettre Doctorants de l'Institut (merci **Jérôme** pour avoir représenté le SPI avec moi). Je remercie à cette occasion le **Dr Jean-Marc Grognet**, chef de l'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, de nous avoir offert cette opportunité.

Merci aux copines thésardes (**Emmanuelle, Marion, Floriane et Hélène**) pour nos dîners soutien-déferlantes dont nous avons bien besoin ainsi qu'à tous les copains-copines, notamment les ex-pharma (**Julie, Amélie, Hao, Eric**...). Malgré les distances géographiques l'amitié reste... Merci à tous ! Une spéciale dédicace à la meilleure des meilleures : merci **Darine** ! Nous avons bien changé depuis le lycée mais nous sommes restées unies. Tu es awesome (High 5 !) et ta présence me réconforte.

Une très grande révérence à **mes parents** (« trouveurs » acharnés !) et à ma petite sœur **Béatrice** (grande philosophe !) pour leur soutien inconditionnel, leurs idées et leurs conseils. Merci de m'avoir écoutée et parfois su me faire taire ! Le dernier remerciement sera pour toi, **Laurent**, merci d'être chaque jour à mes côtés.



# TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Liste des Abréviations	10
Liste des Figures	12
Liste des Tableaux	16
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>17</b>
<b><i>PARTIE 1 : De la créatine au déficit en transporteur de la créatine</i></b>	
<b>1.1 La Créatine</b>	<b>19</b>
1.1.1 Synthèse de la créatine	19
1.1.2 Transport de la créatine vers les organes cibles	22
1.1.3 Excrétion de la créatine	27
1.1.4 Biosynthèse de la créatine dans le système nerveux central	28
1.1.5 La créatine est une source énergétique cellulaire	32
1.1.6 Fonctions physiologiques de la créatine	35
1.1.6.1 Effets ergogéniques musculaires → dystrophies musculaires	35
1.1.6.2 Effets ergogéniques cérébraux → performances cérébrales	37
1.1.6.3 Effets anti-oxydant et anti-apoptotique → lésion cérébrale post-traumatique	38
1.1.6.4 Effet protecteur contre l'anoxie → accident vasculaire cérébral	39
1.1.6.5 Effet sur la tolérance au glucose	39
1.1.6.6 Autres propriétés non exploitées en clinique	40
1.1.6.7 Pathologies cérébrales psychiatriques et neurodégénératives	40
1.1.7 Risques à l'utilisation de la créatine	49
<b>1.2 Les syndromes de déficit cérébral en créatine</b>	<b>52</b>
1.2.1 Classification des syndromes de déficit cérébral en créatine	52
1.2.2 Physiopathologie du déficit en transporteur de la créatine	53
1.2.3 Diagnostic clinique du déficit en transporteur de la créatine	54
1.2.4 Diagnostic biologique du déficit en transporteur de la créatine	55
1.2.4.1 Spectroscopie RMN du proton	56
1.2.4.2 Analyses biologiques	58
1.2.4.3 Analyse fonctionnel	59
1.2.4.4 Analyse moléculaire du gène codant pour le SLC6A8	61
1.2.5 Fréquence du déficit en transporteur de la créatine	63
1.2.6 Pronostic du déficit en transporteur de la créatine	64
1.2.7 Diagnostic différentiel du déficit en transporteur de la créatine	64
<b>1.3 Stratégies thérapeutiques développées afin de traiter le déficit cérébral en créatine</b>	<b>65</b>
1.3.1 Traitement par le monohydrate de créatine	66
1.3.2 Acides aminés précurseurs de la synthèse de créatine	67
1.3.3 Dérivés de la créatine	68
1.3.3.1 Complexes créatine-magnésium et phosphocréatine-magnésium	68
1.3.3.2 Esters benzyliques et éthyliques de créatine	69
1.3.3.3 Dérivés acides aminés de créatine	70
1.3.3.4 Acide 2-imino-1-imidazolidineacétique (cyclocréatine)	71

<b>PARTIE 2 : Administration des médicaments au niveau du système nerveux central</b>	
<b>1.4 Défi de l'administration des médicaments au niveau du système nerveux central</b>	73
1.4.1 Physiologie de la vasculature cérébrale	73
1.4.2 La microvasculature cérébrale et l'unité neurovasculaire	75
1.4.2.1 La barrière hémato-encéphalique est une barrière structurale	76
1.4.2.2 La barrière hémato-encéphalique est une barrière fonctionnelle	78
1.4.2.3 La barrière hémato-encéphalique est une barrière métabolique	80
1.4.3 Les stratégies exploitées pour contourner la BHE	82
1.4.3.1 Injection intra-cérébrale	82
1.4.3.2 Rupture de l'intégrité de la BHE	82
1.4.3.2.1 Modulateurs des jonctions serrées	82
1.4.3.2.2 Ouverture osmotique	83
1.4.3.2.3 Couplage des ultrasons et des microbulles	83
1.4.3.3 Exploiter les caractéristiques structurales et fonctionnelles	83
1.4.3.3.1 Inhibition des pompes d'efflux	84
1.4.3.3.2 Augmentation de la lipophilie des molécules	84
1.4.3.3.3 Peptides permettant l'entrée dans les cellules	84
1.4.3.3.4 Reconnaissance ligand/récepteur	85
1.4.3.3.5 Nanovectorisation	86
<b>CHAPITRE 2 : OBJECTIFS</b>	89
<b>CHAPITRE 3 : METHODES EXPERIMENTALES</b>	95
<b>3.1 Caractérisation de la synthèse organique et des lots d'esters de créatine</b>	97
3.1.1 Méthodes utilisées pour la caractérisation de la synthèse organique et pour la purification des produits	97
3.1.1.1 Analyse par chromatographie sur couche mince	97
3.1.1.2 Purification par chromatographie sur colonne	97
3.1.2 Méthodes utilisées pour la caractérisation des esters de créatine	97
3.1.2.1 Analyse par résonance magnétique nucléaire	98
3.1.2.2 Analyse par spectroscopie infrarouge	98
3.1.2.3 Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	98
3.1.2.4 Analyse par mesure des points de fusion	98
3.1.3 Estimation des paramètres physico-chimiques des esters de créatine	99
<b>3.2 Développement des méthodes analytiques d'identification des esters de créatine</b>	100
<b>3.3 Préparation des nanocapsules lipidiques</b>	101
3.3.1 Préparation des nanocapsules lipidiques	101
3.3.1.1 Réalisation des NCL	102
3.3.1.2 Réalisation des NCL-PegMal et des NCL-PegOMe	102
3.3.1.3 Réalisation des NCL-PegProtéine	103
3.3.2 Encapsulation de composés dans les nanocapsules lipidiques	103
3.3.2.1 NCL-DiD : pour l'identification par fluorimétrie	103
3.3.2.2 NCL-amiodarone : pour l'identification par UPLC-MS/MS	104
3.3.2.3 NCL-C12 : pour la protection et la vectorisation de l'ester dodécylique de créatine	104
3.3.3 Caractérisation des NCL	105
3.3.3.1 Caractérisation physico-chimique	105
3.3.3.2 Détection d'une éventuelle réponse immunitaire inappropriée	105

<b>3.4 Etudes réalisées en culture cellulaire</b>	107
3.4.1 Modèle <i>in vitro</i> de la barrière hémato-encéphalique (BHE) de rat adulte	107
3.4.1.1 Isolement des cellules endothéliales de rat	107
3.4.1.2 Isolement des cellules gliales de rat	108
3.4.1.3 Genèse de la BHE	108
3.4.1.4 Validation des BHE	110
3.4.1.5 Suivi de l'intégrité des BHE au Jaune de Lucifer	112
3.4.2 Passage de molécules à travers le modèle <i>in vitro</i> de BHE	113
3.4.2.1 A travers la monocouche endothéliale seule	113
3.4.2.2 Dans le modèle en co-culture	113
3.4.3 Internalisation des NCL-amiodarone dans les cellules gliales primaires de rat	114
3.4.4 Modèle de culture primaire de neurones	115
3.4.4.1 Préparation des supports de culture	115
3.4.4.2 Mise en culture des neurones corticaux	115
3.4.5 Internalisation des esters de créatine et des NCL-C12 dans les neurones de rat en culture primaire	116
3.4.6 Modèle de culture primaire de fibroblastes humains	117
3.4.7 Internalisation de l'ester dodécylique de créatine et des NCL-C12 dans les fibroblastes humains	118
3.4.8 Tests de viabilité des cellules après traitement avec les esters de créatine ou les NCL	118
3.4.8.1 Test de cytotoxicité au MTT	118
3.4.8.2 Test de cytotoxicité au LDH	119
3.4.9 Dosage des concentrations endogènes de créatine dans les cellules endothéliales, gliales, neuronales et fibroblastiques	120
3.4.10 Contrôle de l'activité des estérases	120
<b>3.5 Expression des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse de la créatine et pour le transporteur de la créatine SLC6A8</b>	121
3.5.1 Extraction d'ARN	121
3.5.2 Amplification génique par RT-qPCR	122
<b>CHAPITRE 4 : RESULTATS</b>	125
<b><i>PARTIE 1 : Synthèse des esters de créatine et évaluation de leurs propriétés pharmacologiques</i></b>	
<b>4.1 Expression des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse de la créatine et pour le transporteur de la créatine SLC6A8</b>	129
4.1.1 Voie de synthèse des esters de créatine	129
4.1.2 Estimation des paramètres physico-chimiques des esters de créatine	132
<b>4.2 Identification et quantification des esters de créatine par HPLC-MS/MS</b>	135
4.2.1 Détermination des transitions spécifiques de chaque ester de créatine	137
4.2.2 Validation des méthodes analytiques de dosage des esters de créatine	138
4.2.3 Effet de la matrice protéique cellulaire sur le dosage des esters de créatine	141
<b>4.3 Solubilité des esters de créatine</b>	142
<b>4.4 Stabilité des esters de créatine</b>	143
4.4.1 Conservation des esters de créatine sur le long terme (produit à sec)	144
4.4.2 Réalisation des expérimentations en milieu biologique	147
4.4.3 Conservation des échantillons en solution	150
4.4.3.1 Conservation à +4°C à court terme (24h)	150
4.4.3.2 Conservation à +4°C sur le long terme	151

4.4.3.3	Conservation à -20°C	152
<b>4.5</b>	<b>Propriétés pharmacologiques des esters de créatine</b>	<b>156</b>
4.5.1	Caractérisation des modèles d'étude cellulaire	156
4.5.1.1	Expression du transporteur et des enzymes de synthèse de la créatine	156
4.5.1.2	Fonctionnalité du transporteur de la créatine dans les cellules endothéliales (BHE)	160
4.5.1.3	Fonctionnalité du transporteur de la créatine dans les cellules neuronales	165
4.5.1.4	Quantité de créatine endogène dans les milieux de culture et les lysats cellulaires	165
4.5.1.5	Activité des estérases cellulaires	166
4.5.2	Passage de la BHE par les esters de créatine : internalisation dans les cellules endothéliales et translocation dans le parenchyme cérébral	168
4.5.3	Internalisation des esters de créatine dans les cellules neuronales	171
4.5.4	Intérêt thérapeutique de l'ester dodécylrique de créatine dans le traitement du déficit en transporteur de la créatine	174
	<b>Brevet</b>	<b>177</b>
	<b>Article soumis au <i>Journal of Medicinal Chemistry</i></b>	<b>221</b>
<b><i>PARTIE 2 : Nanocapsules lipidiques pour la formulation de l'ester dodécylrique de créatine</i></b>		
<b>4.6</b>	<b>Caractérisation des NanoCapsules Lipidiques (NCL)</b>	<b>293</b>
4.6.1	Description des NCL	293
4.6.1.1	Sur le plan physico-chimique	293
4.6.1.2	Détection d'une éventuelle réponse immunitaire inappropriée	294
4.6.2	Stabilité des NCL	296
4.6.3	Impact des post-insertions sur la quantité de molécule encapsulée	297
4.6.4	Efficacité de la lyse des NCL	299
4.6.4.1	Dans les échantillons de NCL en solution aqueuse	299
4.6.4.2	Dans les échantillons de NCL internalisés dans les cellules	299
<b>4.7</b>	<b>Passage de la BHE par les NCL-amiodarone et translocation dans le parenchyme cérébral</b>	<b>301</b>
4.7.1	Passage de la BHE	301
4.7.2	Translocation dans le parenchyme cérébral	303
<b>4.8</b>	<b>Passage de la BHE par les NCL chargées en ester dodécylrique de créatine</b>	<b>306</b>
<b>4.9</b>	<b>Internalisation des NCL chargées en ester dodécylrique de créatine dans les fibroblastes pathologiques et conversion en créatine</b>	<b>309</b>
<b>4.10</b>	<b>Stabilité en milieu biologique de l'ester dodécylrique de créatine encapsulé dans les NCL</b>	<b>311</b>
4.10.1	Stabilité dans le plasma	311
4.10.2	Stabilité dans le plasma en présence d'inhibiteurs de protéases	313
4.10.3	Stabilité des NCL-C12 dans une solution protéique d'albumine de sérum bovin	315
	<b>Article soumis à <i>Nature Nanotechnology</i></b>	<b>317</b>
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION – CONCLUSION GENERALE</b>		<b>339</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>353</b>
<b>ANNEXE</b>		<b>371</b>
<b>Annexe 1 : Matériels et équipements</b>		<b>373</b>
<b>Annexe 2 : Principe de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem</b>		<b>379</b>
<b>Annexe 3 : Communications écrites et orales</b>		<b>383</b>

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
AD	Maladie d'Alzheimer
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine Di Phosphate
AGAT	Alanine : Glycine AminoTransférase
ALS	Sclérose Amyotrophique Latérale
ANT	Adenine Nucleotide Translocateur
AQP4	Aquaporine 4
AraC	Cytosine- $\beta$ -D-arabinose
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCA	BiCinchoninic Acid, acide bicinchonique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CAT	Cationic Acid Transporter
CBz	Chloroformate de Benzoyle
CCDS	Cerebral Creatine Deficiency Syndromes, Syndromes de Déficit en Créatine Cérébrale
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
Cr	Créatine
PCr	Phosphocréatine
Cr-Mg-CPLX	Complexe Créatine-Magnésium
CT1, CTR, CRT1, cf SLC6A8	
CreaT, CrT	cf SLC6A8
CT2	cf SLC6A10
DID	fluorochrome lipidique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DSPE	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyéthylène glycol)-2000]
EBM-2	Endothelial Basal Medium -2
GAA	Acide GuanidinoAcétique
GABA	Acide Gamma Amino Butyrique
GAMT	GuanidinoAcétate MéthylTransférase
GLUT1	Glucose transporter 1, SLC2A1
GLUT4	Glucose transporter 4, SLC2A4
GPA	Acide GuanidinoPropionique
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HD	Maladie de Huntington
H-MRS	Spectroscopie RMN du proton
HPLC(-MS)	Chromatographie Liquide Haute Performance (couplée à la spectrométrie de masse)
IR	Infra-Rouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire
JAM	Molécules de Jonctions Adhérentes
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
MINT	Unité Inserm U1066, Micro et Nanomédecines biomimétiques
LLOQ	Lower Limit of Quantification, Limite basse de quantification

## Liste des Abréviations

---

LOVD	Leiden Open Variation Database
LY	Lucifer Yellow, Jaune de Lucifer
Mg	Magnésium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MTPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
MTT	3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
NCL-DiD	NanoCapsules Lipidiques encapsulant le fluorochrome DiD
NCL-amiodarone	NanoCapsules Lipidiques encapsulant l'amiodarone
NCL-C12	NanoCapsules Lipidiques encapsulant l'ester dodécylique de créatine
NCL-PegIns	NanoCapsules Lipidiques greffées avec des chaînes de polyéthylène glycol et l'insuline
NCL-PegMal	NanoCapsules Lipidiques greffées avec des chaînes de polyéthylène glycol maléimide
NCL-PegOMe	NanoCapsules Lipidiques greffées avec des chaînes de polyéthylène glycol méthoxy
NCL-PegOX26	NanoCapsules Lipidiques greffées avec des chaînes de polyéthylène glycol et l'anticorps OX26
OX26	anticorps dirigé contre le récepteur à la transferrine
PCr-Mg-CPLX	Complexe Phosphocréatine-magnésium
PD	Maladie de Parkinson
Peg	Polyéthylène glycol (PEG)
PegMal	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyéthylène glycol)-2000]
PegOMe	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[Methoxy (polyéthylène glycol)-2000]
ppm	partie par million
Q1, Q3	quartiles d'une distribution : 25%, 75%
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
SLC6A10	Solute Carrier 6A10, transporteur de la créatine
SLC6A8	Solute Carrier 6A8, transporteur de la créatine
sMtCK	Créatine Kinase mitochondriale sarcomérique
SNC	Système Nerveux Central
SOD	Superoxide Dismutase
SV	Standard de Validation
uMtCK	Créatine Kinase mitochondriale ubiquitaire
UPLC-MS/MS	Chromatographie liquide Ultra haute Performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Structure chimique de la créatine	19
Figure 2 : Biosynthèse, régulation et transport de la créatine	20
Figure 3 : Biosynthèse de la créatine	21
Figure 4 : Transport de la créatine	23
Figure 5 : Structure putative du transporteur de la créatine	25
Figure 6 : Séquence de la protéine du transporteur de la créatine SLC6A8	25
Figure 7 : Structure chimique de l'acide 3-guanidinopropionique	26
Figure 8 : Comparaison des structures chimiques de la créatine et du GABA	27
Figure 9 : Structure chimique de la créatinine	28
Figure 10 : Quantification du nombre de cellules cérébrales exprimant les enzymes AGAT et GAMT et le SLC6A8	31
Figure 11 : Echanges cellulaires fondamentaux pour la synthèse intra-cérébrale de la créatine	31
Figure 12 : Système créatine/phosphocréatine/créatine kinase	33
Figure 13 : Rôle anti-oxydant de la créatine kinase au niveau mitochondrial	34
Figure 14 : La créatine est impliquée dans la neurotransmission	38
Figure 15 : Implication de la mitochondrie dans la maladie d'Alzheimer	44
Figure 16 : Implication de la mitochondrie dans la maladie de Parkinson	46
Figure 17 : Implication de la mitochondrie dans la sclérose latérale amyotrophique	47
Figure 18 : Implication de la mitochondrie dans la maladie de Huntington	49
Figure 19 : Echanges cérébraux dans le contexte pathologique du déficit en transporteur de la créatine	54
Figure 20 : Analyse par spectroscopie RMN du proton d'un sujet non pathologique	57
Figure 21 : Analyse par spectroscopie RMN du proton d'un sujet pathologique	57
Figure 22 : Incorporation de la créatine dans les fibroblastes	60
Figure 23 : Séquençage ADN du gène codant pour le SLC6A8 entre les positions c.1657 et c.1674	61
Figure 24 : Répartition des variants du gène slc6a8 en fonction des exons	62
Figure 25 : Effet d'un traitement au monohydrate de créatine chez deux patientes hétérozygotes	66
Figure 26 : Structure chimique de la cyclocréatine	71
Figure 27 : Effet pharmacologique de la cyclocréatine dans le cadre du déficit en transporteur de la créatine	72
Figure 28 : Naissance de l'irrigation cérébrale	74
Figure 29 : Microvasculature cérébrale	74
Figure 30 : Modélisation des débits sanguins de la vasculature cérébrale	75
Figure 31 : Structure de la barrière hémato-encéphalique	76
Figure 32 : Protéines de jonction exprimées par les cellules endothéliales	77
Figure 33 : Types de transport à travers la barrière hémato-encéphalique	78
Figure 34 : Transporteurs à la barrière hémato-encéphalique	80
Figure 35 : Composition des NCL	101
Figure 36 : Inversion de phase en fonction de la température	101
Figure 37 : Schéma du modèle <i>in vitro</i> de barrière hémato-encéphalique	109
Figure 38 A : Co-culture de cellules endothéliales et gliales	110
Figure 38 B : Neurones corticaux	116
Figure 38 C : Fibroblastes	117
Figure 39 : Protection du motif guanidine de la créatinine	129
Figure 40 : Ouverture du cycle de la créatinine diprotégée et liaison ester avec l'alcool gras	129

## Liste des Figures

Figure 41 : Déprotection du motif guanidine et obtention des esters gras de créatine	130
Figure 42 : Profil chromatographique et spectres MS et MS/MS de l'ester octadécyclique de créatine	136
Figure 44 : Trans-estérification des esters par le méthanol	143
Figure 45 : Spectre <sup>1</sup> H RMN de l'ester octadécyclique (contrôle de fin de synthèse)	145
Figure 46 : Spectre <sup>1</sup> H RMN de l'ester octadécyclique après conservation à sec pendant 18 mois à -20°C	146
Figure 47 : Dégradation des esters de créatine éthylique (C2) et octadécyclique (C18) en fonction de la concentration d'acide formique pendant 2 h d'incubation dans le tampon de transfert à 37°C	148
Figure 48 : Dégradation des esters dodécyclique (C12) et hexadécyclique (C16) de créatine en fonction de la concentration d'acide formique dans le tampon de transfert pendant 2 h d'incubation à 37°C	149
Figure 49 : Dégradation d'une solution d'ester octadécyclique de la créatine dans le tampon de transfert contenant 1% d'ACN et 0.02% acide formique (v/v)	150
Figure 50 : Dégradation d'une solution d'ester octadécyclique de créatine dans le tampon de transfert contenant 10% ACN et 0.2% acide formique (v/v)	151
Figure 51 : Spectre <sup>1</sup> H RMN de l'ester dodécyclique (contrôle en fin de synthèse)	153
Figure 52 : Spectre <sup>1</sup> H RMN de l'ester dodécyclique après une conservation de 2 mois dans l'acétonitrile à +4°C	154
Figure 53 : Dégradation de l'ester octadécyclique de créatine après 17 h de stockage à -20°C dans le tampon de transfert contenant 1% d'acétonitrile et 0.02% d'acide formique comparée au tampon de transfert contenant 10% d'acétonitrile et 0.2% d'acide formique	155
Figure 54 : Expression génique du transporteur de la créatine (SLC6A8)	157
Figure 55 A : Expression génique de l'enzyme de biosynthèse AGAT	158
Figure 55 B : Expression de l'enzyme de biosynthèse GAMT	158
Figure 56 : Expression du transporteur de la créatine dans les fibroblastes humains	159
Figure 57 : Constantes de perméabilité ( $P_{app}$ créatine, $\times 10^{-6}$ cm.s <sup>-1</sup> ) en fonction des concentrations de créatine ( $\mu$ M) incubées pendant 120 minutes dans le compartiment d'origine apical (AB) ou basolatéral (BA) en présence de quantité radio-traceuse de <sup>14</sup> C-créatine (0.5 $\mu$ M).	161
Figure 58 : Quantités détectées (en % de la quantité initiale) dans le compartiment receveur (B ou A) en fonction des concentrations de créatine (en $\mu$ M) incubées pendant 120 minutes dans le compartiment d'origine apical (AB) ou basolatéral (BA)	161
Figure 59 : Influence des conditions inhibitrices de l'acide guanidinopropionique (GPA) et de la ciclosporine (Ci) sur les ratios d'efflux de 3 concentrations de créatine (5, 100 et 2000 $\mu$ M) dans le modèle de BHE	163
Figure 60 : Influence des conditions inhibitrices de l'acide guanidinopropionique (GPA) et de la ciclosporine (Ci) sur les constantes de perméabilité apical vers basal (A) et basolatéral vers apical (B) de 100 $\mu$ M de créatine dans le modèle de BHE	163
Figure 61 : Influence des conditions inhibitrices de l'acide guanidinopropionique (GPA) et de la ciclosporine (Ci) sur les constantes de perméabilité apical vers basal (A) et basolatéral vers apical (B) de 2000 $\mu$ M de créatine dans le modèle de BHE	164
Figure 62 : Absence de toxicité de la créatine sur l'intégrité de la BHE entre 5 et 2000 $\mu$ M	164
Figure 63 : Internalisation de la <sup>14</sup> C-Créatine (en % de la dose initiale) dans les cellules neuronales en fonction du temps	165
Figure 64 : Conversion de l'acétate de 4-nitrophényle en <i>p</i> -nitrophénol par les estérases cellulaires	166



## Liste des Figures

---

Figure 65 : Activité des estérases cellulaires dans les cellules endothéliales, les cellules gliales et les neurones	167
Figure 66 : Activité des estérases cellulaires dans les fibroblastes humains	168
Figure 67 : Quantification de la créatine dans les quatre compartiments du modèle de BHE : lysat endothélial (A) et lysat glial (B), compartiment apical (C) et basolatéral (D)	171
Figure 68 : Internalisation de l'ester dodécylrique de créatine (quantifié en nmoles d'ester rapporté à la quantité protéique) dans les fibroblastes humains pédiatriques	175
Figure 69 : Conversion de l'ester dodécylrique de créatine en créatine dans les cellules fibroblastiques du sujet contrôle (Control K) et des 3 patients atteints du déficit en transporteur de la créatine (DTp1, VLp2 et CTP3)	175
Figure 70 : Absence de capture macrophagique des NCL	294
Figure 71 : Absence d'activation du système du complément	295
Figure 72 : Détection des endotoxines dans les préparations de NCL	296
Figure 73 : Stabilité des NCL lors d'une conservation à + 4°C	297
Figure 74 : Perte du composé encapsulé en fonction des post-insertions réalisées sur la structure des NCL	298
Figure 75 : Linéarité de la relation entre la quantité d'amiodarone détectée et la concentration en NCL	298
Figure 76 : Efficacité de la lyse des 3 types de NCL au 1/5ème dans l'acétonitrile	299
Figure 77 : Comparaison de 3 protocoles de lyse des NCL internalisées dans les cellules gliales après 24 h d'incubation d'une solution de 0.1 mg/ml de NCL-PegIns ou de 55.5 nM d'amiodarone en solution	300
Figure 78 : Internalisation de 0.1 mg/ml de NCL chargée en amiodarone dans les cellules endothéliales du modèle <i>in vitro</i> de BHE	301
Figure 79 : Internalisation de 0.5 mg/ml de NCL chargée en amiodarone dans les cellules endothéliales du modèle <i>in vitro</i> de BHE	302
Figure 80 : Internalisation de 0.05 et 1 µM d'amiodarone seule dans les cellules endothéliales du modèle <i>in vitro</i> de BHE	303
Figure 81 : Internalisation de 0.1 mg/ml de NCL chargées en amiodarone dans les cellules gliales du modèle <i>in vitro</i> de BHE après translocation à travers la monocouche endothéliale	304
Figure 82 : Internalisation de 0.5 mg/ml de NCL chargées en amiodarone dans les cellules gliales après translocation à travers la monocouche endothéliale	304
Figure 83 : Internalisation de 0.05 et 1 µM d'amiodarone dans les cellules gliales après translocation à travers la monocouche endothéliale	305
Figure 84 : Quantification de la créatine dans les lysats endothélial (A) et glial (B) après une incubation de 60 minutes avec les NCL-C12	307
Figure 85 : Internalisation des NCL-C12 dans les neurones (A) ayant pour conséquence un efflux de la créatine (B)	308
Figure 86 : Quantification de l'ester dodécylrique de créatine dans les fibroblastes humains après incubation avec les NCL-C12	309
Figure 87 : Quantification de la créatine après conversion de l'ester dodécylrique de créatine dans les fibroblastes du sujet contrôle	310
Figure 88 : Quantification de la créatine après conversion de l'ester dodécylrique de créatine dans les fibroblastes des patients atteints du déficit en transporteur de la créatine	310
Figure 89 : Stabilité des NCL-C12 dans le plasma	312
Figure 90 : Dégradation des NCL-C12 dans le plasma	312
Figure 91 : Stabilité de la concentration en créatine dans le plasma lors des incubations en NCL-C12	313

## Liste des Figures

---

Figure 92 : Quantification de l'ester dodécylrique de créatine (A) et de la créatine (B) après incubation des LNC-C12 dans du plasma contenant des inhibiteurs de protéases	314
Figure 93 : Dégradation de l'ester dodécylrique de créatine lors de l'incubation des NCL-C12 dans une solution d'albumine de sérum bovin (BSA)	315
Figure 94 : Principe de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	380

## ***LISTE DES TABLEAUX***

Tableau 1 : Analyses biologiques des patients atteints du déficit en transporteur de la créatine	58
Tableau 2 : Fréquence du déficit en transporteur de la créatine dans la littérature	63
Tableau 3 : Proportions des constituants pour la préparation de différentes tailles de NCL	102
Tableau 4 : Paramètres de validation des BHE	112
Tableau 5 : Gènes de contrôle qualité des ARNs rétro-transcrit	123
Tableau 6 : Chimiothèque d'esters de créatine synthétisée	131
Tableau 7 : Estimation des paramètres physico-chimiques des esters de créatine	134
Tableau 8 : Transitions MRM sélectionnées pour chaque ester de créatine, la créatine et la créatinine	137
Tableau 9 : Spécificité des transitions MRM choisies pour chaque ester	138
Tableau 10 : Validation des méthodes analytiques pour le dosage de la créatine et des esters de créatine en C2 et C12	139
Tableau 11 : Impact de la présence de protéines sur la détection de l'ester dodécylrique de créatine et de la créatine	142
Tableau 12 : Solubilité des esters de créatine dans les solvants pour une concentration de 1 mg/ml	142
Tableau 13 : Evolution du pH en fonction du pourcentage d'acide formique en solution dans le tampon de transfert	147
Tableau 14 : Concentration en créatine dans les milieux de culture	166
Tableau 15 : Concentration en créatine dans les surnageants de culture et les lysats cellulaires	166
Tableau 16 : Etude de relation structure-activité des esters de créatine : passage de la BHE et translocation dans le parenchyme cérébral après 60 minutes d'incubation avec les esters de créatine	170
Tableau 17 : Absence de toxicité cellulaire après 60 minutes d'incubation avec les esters de créatine	170
Tableau 18 : Internalisation des esters de créatine dans les cellules neuronales après 60 minutes d'incubation	173
Tableau 19 : Absence de toxicité sur la fonction mitochondriale neuronale après 60 minutes d'incubation des esters de créatine	173
Tableau 20 : Caractéristiques des NCL chargées en DiD (NCL-DiD)	293
Tableau 21 : Caractéristiques des NCL chargées en amiodarone (NCL-amiodarone)	293
Tableau 22 : Caractéristiques des NCL chargées en ester dodécylrique de créatine (NCL-C12)	294
Tableau 23: Quantification de l'ester dodécylrique de créatine après internalisation des NCL-C12 dans les cellules endothéliales et gliales	307

# ***CHAPITRE 1***

## ***INTRODUCTION GENERALE***

### ***DE LA CREATINE AU DEFICIT EN TRANSPORTEUR DE LA CREATINE***

***ET***

### ***ADMINISTRATION DE MEDICAMENTS DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL***

---



## 1.1 La créatine

### 1.1.1 Synthèse de la créatine

La créatine ou acide  $\alpha$ -N-méthylguanidoacétique (Figure 1) a été découverte par le chimiste français Michel Eugène Chevreul en 1832. L'ayant isolé dans le muscle squelettique, il la nomma d'après le mot grec signifiant chair « kreas ». Il faudra néanmoins attendre plusieurs années <sup>2, 3</sup> pour non seulement mieux comprendre le rôle fondamental de la créatine dans la production de l'énergie cellulaire mais encore exploiter ces nouvelles découvertes pour la supplémentation alimentaire des sportifs de haut niveau.

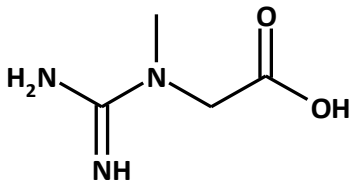


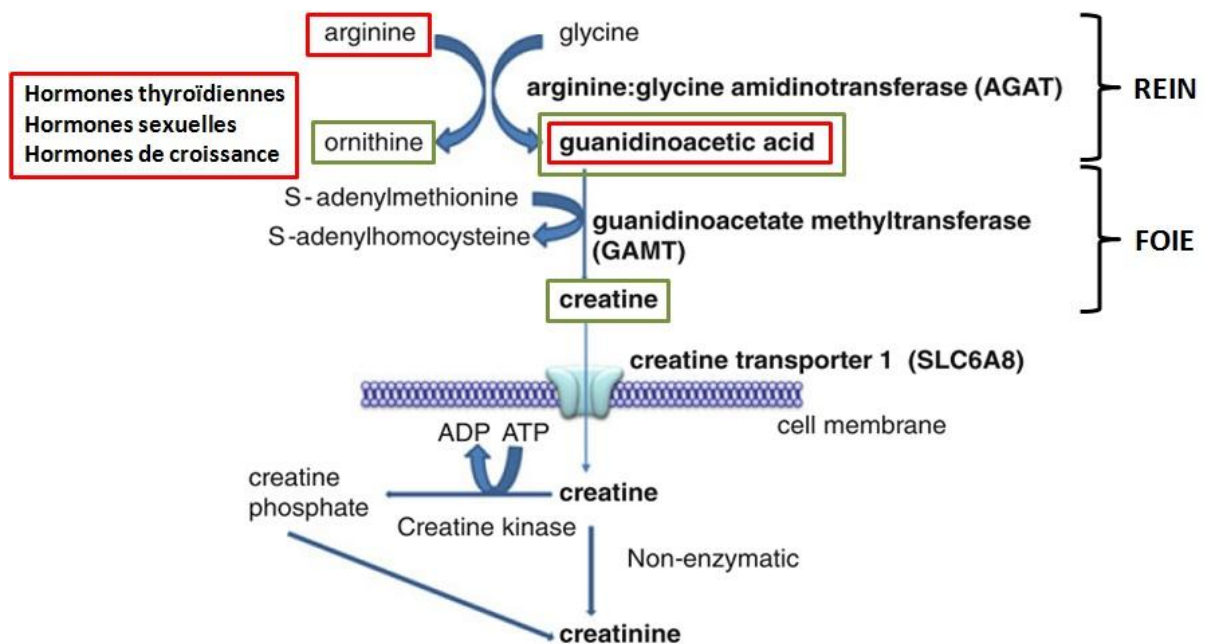
Figure 1 : Structure chimique de la créatine

La créatine est un dérivé d'acide aminé, une partie des réserves de créatine de l'organisme provient donc des protéines de notre alimentation (viande, poisson, lait et produits laitiers). La biodisponibilité de la créatine dépend alors de son absorption au niveau intestinal et celle-ci est élevée car 80% de la créatine ingérée est absorbée <sup>4</sup>.

L'autre partie des réserves de créatine repose sur une synthèse *de novo* dans l'organisme <sup>5</sup>. Cette synthèse endogène est réalisée suivant deux étapes enzymatiques qui nécessitent l'utilisation de trois acides aminés : l'arginine, la glycine et la méthionine (Figure 2). Dans un premier temps, la L-arginine : glycine amidinotransférase (AGAT, EC 2.1.4.1) catalyse le transfert du groupement aminé de l'arginine à la glycine et conduit à la biosynthèse de l'ornithine et de l'acide guanidinoacétique (ou GAA). Dans une seconde étape, le GAA est méthylé grâce à la réaction médiée par la guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT). Cet enzyme réalise le transfert d'un groupement méthyle depuis la S-adénosylméthionine (SAM) à la créatine <sup>6</sup> en produisant la S-adénosylhomocystéine.

Les enzymes AGAT et GAMT sont exprimées majoritairement dans le rein et le foie respectivement. La première étape de biosynthèse semble donc rénale et la seconde est hépatique. Cependant leurs expressions se retrouvent également dans d'autres tissus à des niveaux variables, comme le

pancréas, les testicules, les poumons et la rate <sup>7</sup> mais leur présence dans ces organes n'est à ce jour pas encore clairement expliquée. En effet, bien que les transcrits ainsi que la protéine AGAT soit exprimés dans le foie et le pancréas, il ne semble pas que ces organes participent à la biosynthèse de la créatine, les hépatocytes se révélant incapables de réaliser la synthèse complète de la créatine à partir des trois acides aminés précurseurs <sup>6</sup>. Par ailleurs, l'AGAT et la GAMT sont également fonctionnelles dans le système nerveux central <sup>5,8,9</sup> comme cela sera décrit plus loin.



**Figure 2 : Biosynthèse, régulation et transport de la créatine**

*Les encadrés rouges indiquent les activateurs de la biosynthèse de créatine et les encadrés verts le rétrocontrôle négatif de la créatine sur sa propre synthèse. De haut en bas sur le schéma, l'arginine et la glycine permettent la biosynthèse de la créatine qui est transportée à travers les membranes cellulaires grâce à un transporteur spécifique le SLC6A8. La créatine sert alors de réserve énergétique cellulaire sous la forme phosphocréatine et elle est dégradée en créatinine qui est excrétée dans les urines. Schéma adapté de Wada, 2012 <sup>10</sup>.*

Comme on peut le constater sur la Figure 3, la biosynthèse de la créatine repose sur une utilisation équimolaire d'arginine et de glycine, ainsi que sur l'utilisation de la méthionine pour l'apport d'un groupement méthyle. Cette synthèse est un point important pour le métabolisme des acides aminés et un calcul simple permet d'en prendre conscience. La synthèse d'1 gramme de créatine par jour équivaut à la production de 8 mmoles de créatine. Ceci nécessite donc 8 mmoles par jour d'arginine, de glycine et de méthionine. Si on considère une absorption quotidienne de 80 grammes de protéines, qui correspond à un régime alimentaire occidental moyen, l'apport exogène de glycine,

d'arginine et de méthionine est respectivement de 78, 37 et 19 mmoles. La synthèse de la créatine consomme donc 10, 22 et 42% de l'apport alimentaire quotidien respectif de glycine, arginine et méthionine.

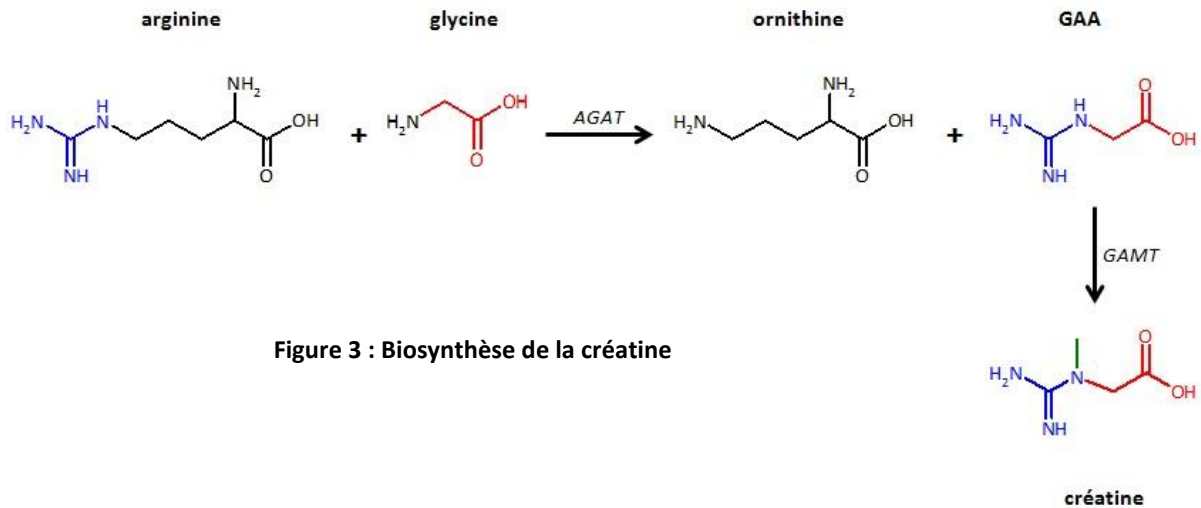


Figure 3 : Biosynthèse de la créatine

Cependant, l'arginine et la glycine peuvent également être synthétisées par l'organisme<sup>4</sup>. Dans le schéma de synthèse de la créatine, seule la glycine est incorporée entièrement. L'arginine est convertie en ornithine qui pourrait en théorie être régénérée en arginine par le cycle de l'urée<sup>11</sup> mais sans preuve formelle jusqu'à présent. Cela impliquerait néanmoins que l'ornithine produite au niveau rénal puisse être captée par les organes exprimant la carbamyl phosphatase synthase I dont l'expression est restreinte au foie et à l'intestin grêle<sup>7,11</sup>.

En revanche, la méthionine est, elle, un acide aminé essentiel, apporté strictement par l'alimentation<sup>4</sup>. Certes, l'alimentation fournit d'autres groupements méthyle labiles par l'apport de choline et de bétaine ainsi que par la méthylnéogenèse conduite par la reméthylation de l'homocystéine. Toutefois, 40% des groupements méthyle de la SAM sont consommés dans la synthèse de la créatine<sup>12</sup>. Ces calculs sont approximatifs mais ils démontrent bien à quel point la synthèse de la créatine tient une part importante dans le métabolisme des acides aminés. Ceci est d'ailleurs d'autant plus vrai chez les végétariens et les végétaliens pour lesquels le régime alimentaire apporte moins de protéines et chez lesquels la biosynthèse endogène de créatine est donc fondamentale<sup>7</sup>.

La biosynthèse de la créatine dépend de la disponibilité en acides aminés précurseurs. L'arginine induit l'AGAT comme cela a été démontré par l'augmentation de la concentration de l'acide guanidinoacétique chez des rats après une infusion d'arginine. En revanche, aucun effet de la glycine



n'a été décrit. Contrairement à l'arginine, la concentration de glycine est probablement largement supérieure au Km de l'AGAT et elle ne constitue donc pas un facteur limitant pour la synthèse<sup>13</sup>. La régulation fine de l'arginine sur la biosynthèse de la créatine la rend dépendante du cycle de l'urée. En effet, chez les patients souffrant d'une déficience en arginase, seule pathologie conduisant à une hyperargininémie, on note une augmentation des composés de type guanidine et, notamment, la créatine et l'acide guanidinoacétique. Ceci s'explique par une activation de l'AGAT qui conduit à une augmentation de la synthèse de GAA et secondairement à une augmentation de la créatine. Au contraire, si l'on considère d'autres pathologies du cycle de l'urée où le taux d'arginine est très bas, la diminution en créatine n'est pas toujours détectée. Ces patients sont en effet bien souvent supplémentés en arginine ce qui fausse les observations<sup>4</sup>.

La capacité hépatique à convertir l'acide guanidinoacétique en créatine est très élevée, la réaction s'effectuant loin de son maximum en présence de concentration physiologique de GAA. Celui-ci a également une action activatrice de la synthèse.

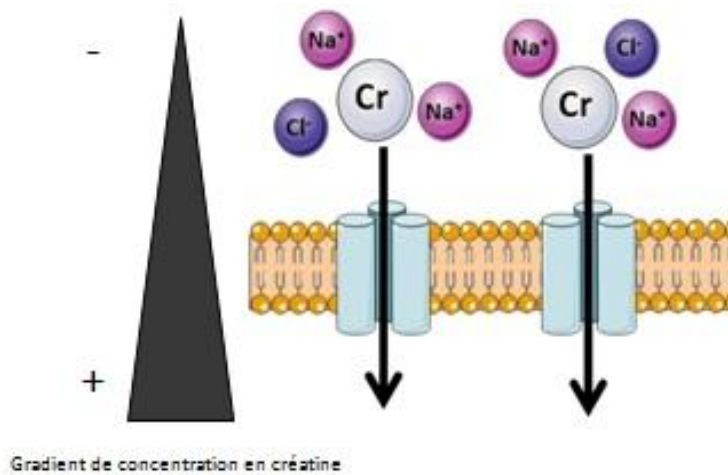
Les produits des réactions enzymatiques, l'acide guanidinoacétique, l'ornithine et la créatine, s'opposent tous les trois au stockage indéfini de la créatine en exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'expression et la fonctionnalité de l'AGAT<sup>5-7</sup>. Sans que les mécanismes moléculaires mis en œuvre soient à ce jour explicités, cette conversion réalisée par l'AGAT constitue l'étape limitante de la biosynthèse de la créatine. Enfin, des mécanismes de régulation hormonale entrent également en jeu : l'AGAT et la GAMT subissent un rétrocontrôle positif par l'hormone de croissance, les hormones thyroïdiennes et les hormones sexuelles<sup>14,15</sup>.

### **1.1.2 Transport de la créatine vers les organes cibles**

Une fois la créatine synthétisée, elle est exportée du foie et transportée par la circulation sanguine jusqu'aux organes cibles très demandeurs en énergie (principalement les muscles squelettiques et le cerveau) qui la captent grâce à un transporteur spécifique : le transporteur de la créatine<sup>5</sup>. Ce transport actif spécifique est essentiel car la créatine est une molécule très polaire qui a beaucoup de difficultés à franchir les membranes lipidiques.

La créatine est distribuée dans tout l'organisme : 95% est détectée dans le muscle squelettique<sup>16</sup> et les 5% restants sont distribués dans le cerveau, le foie, les reins et les testicules et éventuellement le placenta<sup>5, 16-18</sup>. Les concentrations sont élevées, 30 mM de créatine sont ainsi détectées dans le muscle squelettique et 10 mM dans le cerveau<sup>5</sup>.

Le transporteur spécifique de la créatine est décrit pour la première fois dans des cultures cellulaires astrogliales en 1989 par Möller et Hamprecht <sup>19</sup>. Le transport de la créatine ou SLC6A8 est un membre de la superfamille des transporteurs électrogéniques « solute carrier family 6 » ou SLC6. Cette famille comprend les transporteurs membranaires responsables du transport de neurotransmetteurs (dopamine, GABA, sérotonine, noradrénaline) et d'acides aminés (glycine, proline, taurine) à travers la membrane plasmique grâce à un système de co-transport de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Le SLC6A8 implique 2  $\text{Na}^+$  et 1  $\text{Cl}^-$  pour chaque molécule de créatine transportée <sup>20-22</sup> (Figure 4).



**Figure 4 : Transport de la créatine**

*Le transport de la créatine se fait contre un gradient de concentration et il implique 2 ions sodium et un ion chlore pour chaque molécule de créatine transportée.*

Le transport se réalise contre un gradient de concentration considérable, le ratio de créatine intracellulaire/extracellulaire dans le muscle squelettique est de 100/1 <sup>5</sup>. Ceci signifie que la concentration de créatine plasmatique étant comprise entre 50 à 100  $\mu\text{M}$ , celle du muscle squelettique atteint facilement 5 à 10  $\text{mM}$  <sup>7</sup>. Le co-transport de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  en fait un transport électrogénique associé à un transport actif secondaire assuré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Cette pompe est soumise à une régulation positive par les hormones comme l'insuline. Ces hormones activent donc le transport de la créatine de façon indirecte <sup>23</sup>. Cela permettrait notamment le stockage de la créatine issue de la prise alimentaire.

Deux transporteurs de la créatine ont été identifiés à ce jour : le premier est le SLC6A8 (également noté CT1, CRTR, CRT1, CTR, CreaT ou encore CrT) et le second est le SLC6A10 ou CT2 <sup>24</sup>. Le gène codant pour la protéine SLC6A8 est localisé sur le chromosome X à la position Xq28 <sup>25-27</sup>. L'expression de ce transporteur est ubiquitaire mais nettement plus importante dans les tissus à forts besoins énergétiques (muscle squelettique, cœur, cerveau, rétine) ou dans les tissus à fonction d'absorption

(rein et intestin)<sup>8, 20, 22, 28, 29</sup>. Le gène codant pour la protéine SLC6A10 est, lui, localisé sur le chromosome 16 à la position 16p11 et il est exprimé dans les testicules principalement<sup>27, 30</sup>, mais il a également été décrit très récemment pour la première fois dans le cerveau d'un patient autiste<sup>31</sup>. Le SLC6A10 est un gène paralogue<sup>30, 32</sup> qui présente 94.6% de similitude avec le SLC6A8 et 97.1% d'identité des séquences codantes<sup>33</sup>. Il ne sera pas considéré dans la suite de ce manuscrit.

Le gène codant pour le SLC6A8 (Xq28) consiste en 13 exons et présente une longueur de 8,4 kb (GenBank accession number : Z66539)<sup>26</sup>. Le mRNA est de 3,9 kb environ et encode une protéine de 635 acides aminés avec un poids moléculaire estimé à 70 KDa. Il présente entre 46 et 53% d'homologie de séquence avec les autres membres SLC6 à savoir les transporteurs du GABA, de la taurine, de la bétaine et des acides aminés neutres<sup>5, 34-36</sup>. Leurs structures sont si proches que trois substitutions d'acides aminés dans les domaines transmembranaires 1, 3 et 6, associés à la liaison du substrat et à la fonction de transport, conduisent à sa modification d'affinité de substrat et en font un transporteur spécifique de l'acide gamma amino butyrique ou GABA<sup>37</sup>. La séquence de cette protéine est également très conservée parmi les espèces vertébrées puisqu'elle présente 97% d'identité avec ses homologues exprimées chez le rat, le lapin et le bœuf<sup>38, 39</sup>. Il est intéressant de noter que la position Xq28 a été reliée à de nombreux déficits musculaires de type dystrophie musculaire de Emery-Dreifuss, le syndrome de Barth, la cardiomyopathie infantile, les myopathies tubulaires. Il a donc été suggéré que le SLC6A8 pouvait être impliqué dans ces pathologies au regard de son rôle important dans l'homéostasie de la créatine et de la physiologie musculaire<sup>24</sup>.

Comme indiqué sur la Figure 5, la structure hypothétique du SLC6A8 possède 12 domaines transmembranaires putatifs séparés par des boucles de taille très variable et avec ses deux extrémités (NH<sub>2</sub> et COOH) tournées vers le cytosol<sup>5</sup>. Trois variants sont décrits dans les bases de données : le variant 1 (NM\_005629.3, source NCBI) est le transcrit le plus long et est rapporté dans la grande majorité des publications, le variant 2 (NM\_001142805.1) présente un site d'épissage alternatif sans décalage du cadre de lecture, les extrémités N et C terminales étant identiques au variant 1 ; et le variant 3 (NM\_001142806.1) code pour une isoforme dont la partie N-terminale est plus courte que le variant 1.

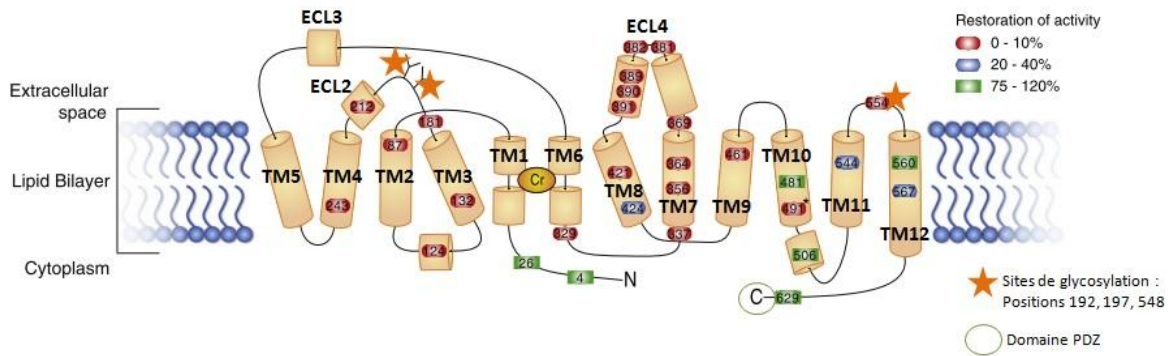


Figure 5 : Structure putative du transporteur de la créatine

Les 12 domaines transmembranaires (TM) sont reliés par des boucles extracellulaires (ECL) et cytosoliques. Deux d'entre elles portent des sites de glycosylation (étoiles oranges) responsables de l'adressage de la protéine à la membrane plasmique qui contribuent à la fonction de transport. Des variations dans les glycosylations contribuent à l'hétérogénéité du transporteur<sup>38</sup>. L'extrémité C terminale porte un domaine protéique PDZ (cercle vert) impliqué dans les interactions protéines-protéines et notamment dans l'ancrage aux éléments du cytosquelette. D'après Betsalel et al.<sup>40</sup>

10	20	30	40	50	60
MAKSAENG	YSVSGDEKKG	PLIAPGPDGA	PAKGDGPVGL	GTPGGRLAVF	PRETWIRQMD
70	80	90	100	110	120
FIMSCVGFVAV	GLGNVWRFPY	LCYKNGGVVF	LIPYVLIALV	GGIPIFFLEI	SLGQFMKAGS
130	140	150	160	170	180
INWNICPLF	KGLGYASMVI	VFYCNTYYIM	VLANGFYLL	KSFTIILPWA	ICGHIWNTPD
190	200	210	220	230	240
CVEIFRHEDC	ANASLANLTC	DQLADRRSPV	IEFWENKVLK	LSGGLEVPGR	LNWEVILCLL
250	260	270	280	290	300
ACWLVVYPCV	WKGVKSTGKI	VYFTATFPYV	VLVLLVRGV	LLPGALDGI	YYLKPDSKIL
310	320	330	340	350	360
GSPQWIDAG	TQIFFSYAIG	LGALALGGSY	NRFNRCYKD	AIIALALNSG	TSFFGFVVF
370	380	390	400	410	420
SILGFMAAEQ	GVHISKVAES	GPGLAFIAYF	RAVTLMPVAF	LNAALFFFMIL	LLGLDSSQFV
430	440	450	460	470	480
GVEGFITGLL	DLLPASYFR	FQREISVALC	CALCFVIDLS	MVIDGSMYVF	QLFDYYSAGS
490	500	510	520	530	540
TIILLQAFNE	CVVAVNYGK	DRFMDDIACM	IGYRCPNPK	WCNSFFPLV	CMGIFIPNVV
550	560	570	580	590	600
YYEPLVYNNI	VVYPWNGEAM	GWAFALSSML	CVPLHLLGCL	LRAKGTMAER	WQHLTQPIWG
610	620	630			
LHHLEYRAQD	ADVRGLTITL	PVSESSKVVV	VESVM		

Figure 6 : Séquence de la protéine du transporteur de la créatine SLC6A8

Les encadrés bleus correspondent aux séquences des extrémités N (acides aminés 1 à 60) et C (acides aminés 582 à 635) terminales, les encadrés rouges aux 12 domaines transmembranaires.

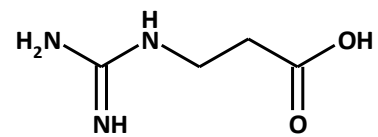
Le transporteur de la créatine joue un rôle majeur au niveau des interfaces tissulaires puisqu'il est responsable de l'entrée de la créatine dans les tissus cibles. En premier lieu, le transporteur SLC6A8 est responsable de l'absorption de la créatine au niveau de l'intestin et de sa réabsorption au niveau rénal après la filtration de la créatine plasmatique. Dans les deux cas, le transport électrogénique dépendant du  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  est décrit au niveau de la membrane apicale des cellules du jejunum<sup>41</sup> et de la membrane des cellules de la bordure en brosse du cortex rénal<sup>42</sup>. De plus, le transporteur de la créatine joue un rôle fondamental dans l'entrée de la créatine dans le système nerveux central puisque la barrière hémato-encéphalique qui protège notre cerveau présente une perméabilité très

faible pour la créatine<sup>43</sup>. Ce transporteur est fonctionnel au niveau des membranes mitochondriales avec un Km élevé de 16 mM dans les organes qui n'expriment pas la créatine kinase comme le foie<sup>39</sup>. Ceci permet probablement de faire entrer la créatine dans la mitochondrie pour qu'elle puisse s'y convertir en réserve énergétique, comme nous le verrons plus loin au paragraphe 1.5.

La reconnaissance des substrats du transporteur de la créatine semble reposer sur des critères structuraux. Ainsi la proximité structurale du SLC6A8 avec les transporteurs du GABA, de la taurine et de la bétaine laisse penser que le substrat doit être un composé zwitterionique neutre possédant une chaîne latérale et un groupement fonctionnel positivement chargé séparé du groupement acide carboxylique par un nombre d'atomes plus grand que n'en présenterait un acide aminé<sup>20</sup>. La structure de la créatine présente un groupement guanidine séparé de l'acide carboxylique par une chaîne de deux carbones ainsi qu'une chaîne latérale constituée d'un méthyle.

Le transport de la créatine est un mécanisme saturable avec une constante de Michaelis-Menten (Km) pour la créatine variant entre 25 et 110  $\mu\text{M}$ <sup>19, 20, 22, 24</sup>. Ce transport peut être modulé par les analogues structuraux de la créatine<sup>22</sup>. Ainsi le 3-guanidinopropionate ( $\beta$ -GPA, Figure 7) est un inhibiteur compétitif efficace du SLC6A8<sup>38</sup>.

Figure 7 : Structure chimique de l'acide 3-guanidinopropionique

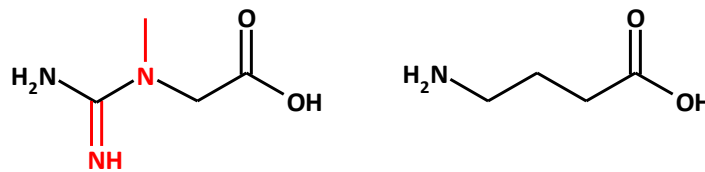


De nombreux facteurs sont impliqués dans la régulation du transporteur de la créatine : les protéines de transduction du signal ou les hormones (catécholamines, IGF-1). Par exemple, l'insuline augmenterait le potentiel de transport du SLC6A8<sup>23</sup>.

Il existe une relation inverse entre la concentration intracellulaire de créatine et l'absorption de créatine par le transporteur SLC6A8. Après l'initiation du stockage par entrée de la créatine dans la cellule, la concentration intracellulaire forte de créatine réalise un rétrocontrôle négatif sur l'activité du transporteur dont le mécanisme n'est pas encore élucidé<sup>7, 24</sup>. Enfin, l'exercice musculaire semble être un enjeu tout particulier dans la régulation du transporteur dans le muscle squelettique. Une étude a ainsi montré chez des volontaires sains supplémentés en créatine que dans leur jambe soumise à un exercice musculaire, une augmentation de la créatine était détectable contrairement à leur autre jambe mise au repos<sup>3</sup>.

Le SLC6A8, comme les autres membres de la famille SLC6, régule la signalisation biochimique neuronale. Le transporteur de la créatine semble ainsi impliqué dans la recapture et le recyclage des neurotransmetteurs<sup>35, 44</sup>. Il est notamment fonctionnel dans les synaptosomes du diencéphale et du télencéphale de rat<sup>28</sup>. Cela fait de la créatine un potentiel neurotransmetteur<sup>44</sup>.

Tel que cela a été décrit, le transporteur de la créatine permet de faire entrer la créatine contre un gradient de concentration. Mais des interrogations subsistent car aucun mécanisme n'est explicité concernant la façon dont la créatine est libérée des cellules, c'est-à-dire dans le même sens que le gradient de concentration<sup>6</sup>. De plus, le transporteur de la créatine n'est pas exprimé par les hépatocytes, il faut donc qu'ils expriment un autre transporteur pour capter le GAA<sup>6</sup>. Des expériences publiées début 2012 indiquent que le transporteur du GABA (GAT2) peut capter le GAA<sup>45</sup> et le transporter dans le foie. Ce transport est également dépendant du Na<sup>+</sup> et du Cl<sup>-</sup> et inhibé par l'acide guanidinopropionique notamment. Ceci indique que la spécificité de substrat est comparable entre le transporteur de la créatine et le GAT2, ce qui peut s'expliquer par une certaine similitude de structure chimique entre le GABA et la créatine (Figure 8).



**Figure 8 : Comparaison des structures chimiques de la créatine et du GABA**

*La créatine (à gauche) et le GABA (à droite) présentent des structures chimiques avec une certaine similitude. Les atomes et les liaisons codés en rouge indiquent les différences de motifs structuraux.*

### 1.1.3 Excrétion de la créatine

Un homme de 70 kg possède un dépôt de créatine de 120 grammes<sup>5</sup>. Ce pool de créatine est renouvelé en permanence à un taux de 2 g/jour<sup>46</sup> par la biosynthèse endogène (1 g) et l'apport alimentaire (1 g) afin de remplacer la quantité perdue chaque jour sous forme de créatinine urinaire<sup>16</sup>. Ce taux de renouvellement quotidien représente 1.7% de la créatine totale de l'organisme<sup>5</sup>.

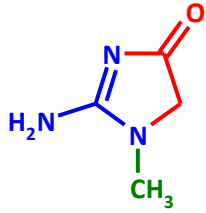


Figure 9 : Structure chimique de la créatinine

La conversion en créatinine (Figure 9) est proportionnelle à la masse musculaire. La perte de créatine diminue avec la diminution de la masse musculaire et augmente avec l'âge. Elle est également plus faible chez les femmes que chez les hommes <sup>7</sup>.

La créatinine diffuse librement à travers les membranes biologiques et elle est excrétée dans les urines. Son élimination journalière étant proportionnelle à la quantité totale de créatine dans l'organisme, elle est de ce fait un bon indicateur de la masse musculaire <sup>47</sup>. Par ailleurs, la créatininémie est utilisée usuellement comme indicateur de la fonction rénale. En effet, la formule de Cockcroft et Gault calcule la clairance de la créatinine et représente la capacité de filtration glomérulaire des reins.

#### 1.1.4 Biosynthèse de la créatine dans le système nerveux central

Jusqu'à récemment, il était établi que la créatine était synthétisée uniquement en périphérie. Sa présence dans le parenchyme cérébral s'expliquait alors par sa capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE), permettant son passage du sang vers le cerveau. Vu la faible perméabilité de la BHE pour la créatine, il est clair aujourd'hui que le besoin cérébral en créatine ne peut pas reposer sur ce seul transfert depuis le plasma. De nouvelles évidences démontrent qu'il existerait aussi une synthèse *in situ* intra-cérébrale <sup>48</sup>. Pour comprendre ceci, il est fondamental d'étudier précisément l'expression et la fonctionnalité des enzymes de biosynthèse et du transporteur dans les différentes structures cérébrales.

Il existe peu de différence d'expression des enzymes de biosynthèse AGAT et GAMT et du transporteur entre les zones cérébrales <sup>8</sup>, laissant supposer que la synthèse de la créatine peut être réalisée *in situ* dans toutes les zones cérébrales. Mais ces enzymes sont exprimés dans les principaux types cellulaires cérébraux (cellules endothéliales, neurones, astrocytes, oligodendrocytes) du cerveau de rat à des niveaux différents. Ainsi, l'AGAT est beaucoup plus exprimée dans le cerveau que la GAMT <sup>8</sup>. Elle est également la seule détectable dans les cellules endothéliales des

microcapillaires cérébraux<sup>8, 29, 43, 48-53</sup>. Les astrocytes sont capables de réaliser la synthèse de la créatine à partir des acides aminés précurseurs<sup>54</sup>. Comme de plus grandes quantités de créatine kinase et de phosphocréatine ont été décrites dans les cellules gliales par rapport aux neurones, on peut imaginer que la synthèse de créatine réalisée par les astrocytes a deux buts : le premier, celui de fournir les astrocytes et le second, de pourvoir aux besoins des cellules cérébrales voisines<sup>8</sup>. D'ailleurs, il semble que la dernière étape de synthèse de la créatine se tienne dans les cellules gliales puisqu'elles expriment les plus hauts niveaux de GAMT<sup>55-57</sup>. En revanche, ceci dépend probablement de la zone cérébrale concernée. Par exemple dans le cortex, seulement 20% des astrocytes expriment la GAMT contre 48% des neurones ce qui laisse supposer une synthèse de créatine dans les neurones<sup>57</sup>.

Une étude par hybridation *in situ* sur des coupes de cerveau n'a pas pu mettre en évidence l'expression du transporteur de la créatine dans les cellules astrocytaires, et ce, quelle que soit la zone cérébrale concernée (télencéphale, corps calleux, hippocampe, cervelet)<sup>8</sup>. L'absence démontrée du transporteur de la créatine dans ces cellules devient cependant négligeable. En effet, puisque les astrocytes expriment les enzymes AGAT et GAMT, la biosynthèse de la créatine dans ces cellules dépendra non pas de l'apport de la créatine mais bien de celui des acides aminés précurseurs (arginine, glycine et méthionine) et tout particulièrement l'arginine. Les transporteurs spécifiques de l'arginine, à savoir les trois CAT (Cationic amino acid transporter) sont exprimés dans les cellules cérébrales (cellules endothéliales microvasculaires, gliales et neuronales)<sup>58</sup> et les astrocytes tout comme les neurones sont capables de capter l'arginine et la glycine et de conduire à la synthèse de l'acide guanidinoacétique et de la créatine<sup>59</sup>. Les autres cellules cérébrales (neurones et cellules endothéliales) expriment quant à elles le transporteur de la créatine<sup>8,59</sup>.

La quantification du nombre de cellules exprimant les enzymes de synthèse et le transporteur donne une cartographie cérébrale surprenante (Figure 10). En effet, seules 12% des cellules cérébrales expriment les deux enzymes de synthèse et sont à même de réaliser la synthèse complète de la créatine<sup>48</sup>. 88% des cellules reposent donc sur l'entrée de la créatine via le transporteur de la créatine pour pouvoir bénéficier de cette source énergétique. Or seules 32.7% de ces cellules expriment le transporteur de la créatine. Il en résulte donc que la grande majorité des cellules, soit 59.4% des cellules sont dépendantes de l'existence d'un trafic complexe entre les zones de synthèse et les zones de consommation de la créatine<sup>1,8</sup>. Une question demeure entière : il s'agit de savoir par quel mécanisme la créatine synthétisée peut diffuser entre les cellules. Comme cela a été évoqué au paragraphe 1.2 de cette introduction, la même question se pose pour le foie en ce qui concerne la synthèse périphérique et, à l'heure actuelle, aucune piste n'est évoquée dans la littérature.



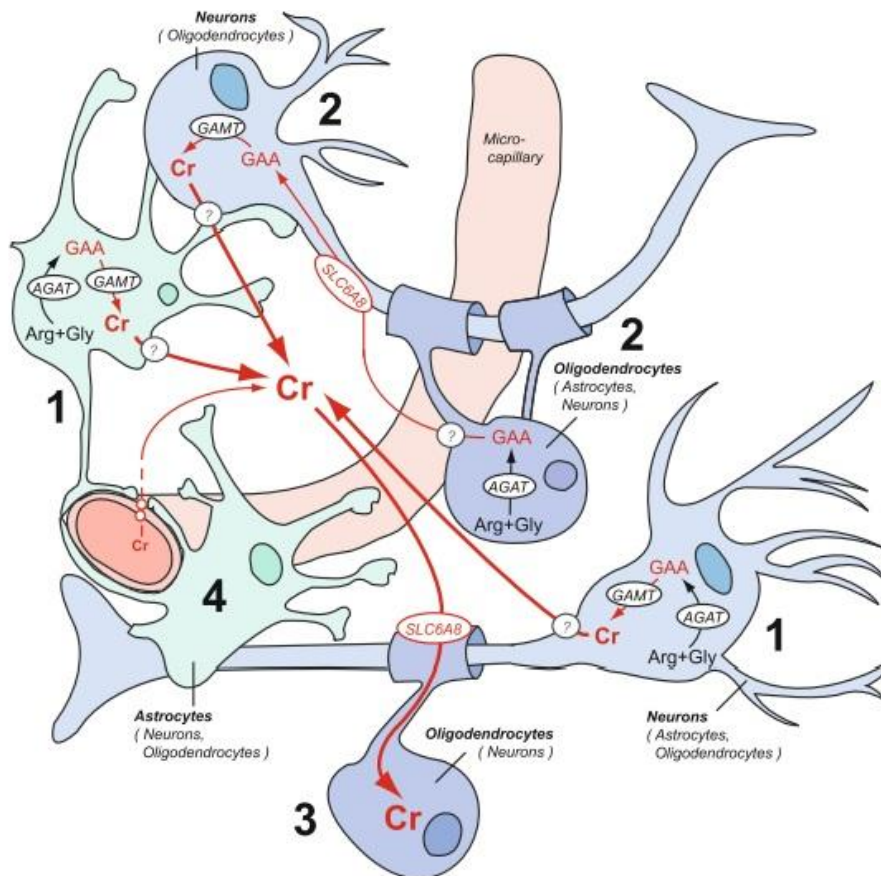
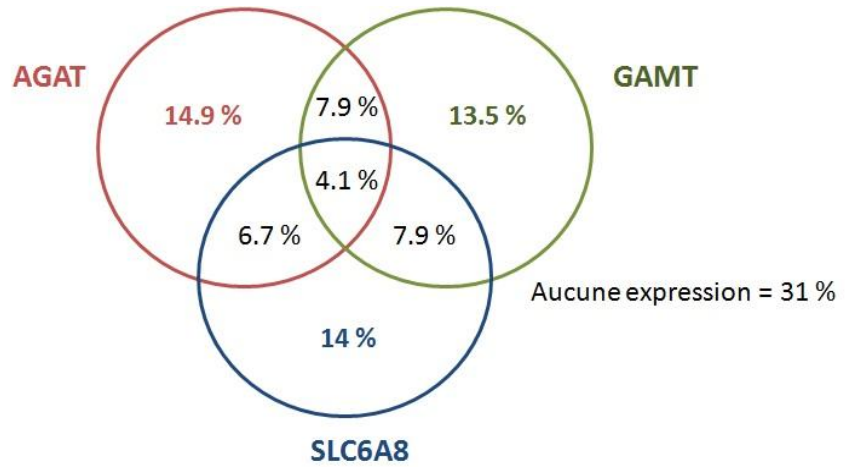
Les échanges cellulaires entre les cellules cérébrales sont décrits dans la Figure 11. Les deux enzymes de la biosynthèse étant rarement co-exprimées (dans 7.9% des cellules seulement <sup>48</sup>), cela signifie que l'acide guanidinoacétique produit dans les cellules exprimant l'AGAT doit être transféré aux cellules exprimant la GAMT ce qui est possible via le transporteur SLC6A8 <sup>55, 56</sup>. Celui-ci peut alors permettre la synthèse de la créatine dans une culture cellulaire 3D de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes <sup>57</sup>. Les communications cellulaires au niveau cérébral sont donc fondamentales pour le maintien des processus de régulation de l'énergie cellulaire mettant en jeu la créatine. Il semble qu'elles reposent sur la fonctionnalité du transporteur de la créatine en grande partie.

Enfin, la régulation de la synthèse cérébrale est différente de celle des autres organes, puisque les produits de réaction n'exercent pas de rétrocontrôle négatif puissant ni sur les enzymes de synthèse ni sur le transporteur <sup>57</sup>. Ainsi le cerveau est constamment en mesure de fournir de la créatine ce qui prend son sens au regard de la dépendance complète des fonctions cérébrales à son approvisionnement en énergie.

**Figure 10 : Quantification du nombre de cellules cérébrales exprimant les enzymes AGAT et GAMT et le SLC6A8**

La quantification du nombre de cellules exprimant les enzymes AGAT, GAMT et le transporteur SLC6A8 révèle qu'aucune expression ni des enzymes de synthèse ni du transporteur n'est détectée dans 31% des cellules cérébrales. Environ 14% des cellules n'exprime qu'une seule des trois protéines : 14.9 ; 13.5 et 14% respectivement pour l'AGAT, la GAMT et le SLC6A8. Seules 4.1% des cellules présentent une expression conjointe des trois protéines.

Schéma d'après les données d'immunohistochimies de Braissant et al. <sup>48</sup>.



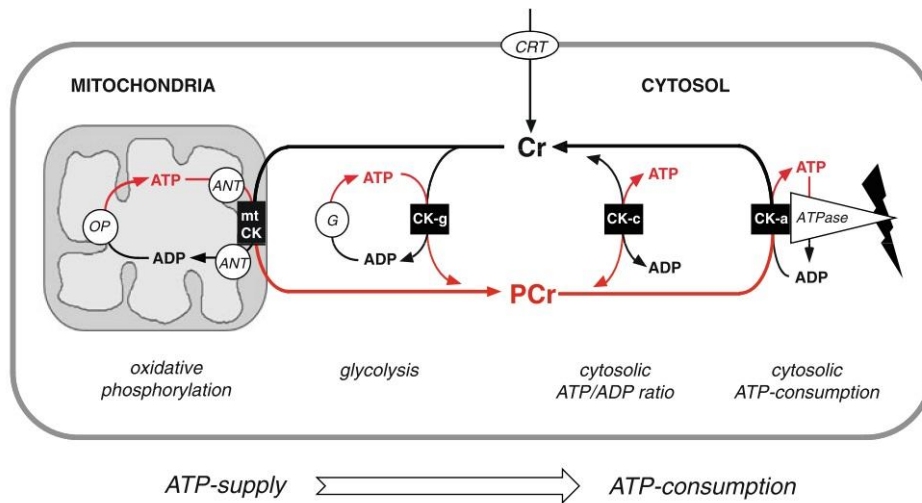
**Figure 11 : Echanges cellulaires fondamentaux pour la synthèse intra-cérébrale de la créatine**

Les cellules exprimant les deux enzymes de synthèse (1) assument la synthèse complète de la créatine qui peut alors diffuser vers les autres types cellulaires n'exprimant que le transporteur (3). Des échanges se font aussi entre des cellules n'exprimant que l'AGAT (2) qui produisent le GAA capté ensuite par les cellules exprimant la GAMT et capables de le convertir en créatine. Cette figure mentionne également que la créatine peut être faiblement extraite du plasma via le transporteur de la créatine (4). Extrait de Braissant et al. <sup>60</sup>.

### 1.1.5 La créatine est une source énergétique cellulaire

Le fonctionnement cellulaire optimal repose sur la production et l'utilisation des sources d'énergie cellulaire. Celle-ci est finement régulée par les mitochondries qui sont des organelles intracellulaires hautement impliqués dans les échanges énergétiques cellulaires. Les mitochondries s'appuient sur la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs afin de produire une forme énergétique exploitable par la cellule : l'ATP. L'ATP et l'ADP peuvent bien diffuser depuis la mitochondrie où ils sont synthétisés jusqu'aux sites de consommation cytosoliques mais de façon relativement limitée par rapport à la créatine. En effet, la phosphocréatine (Masse moléculaire (MM) = 211 daltons) et la créatine (MM = 131 Da) présentent des tailles plus petites que l'ATP (MM = 507 Da) et l'ADP (MM = 427 Da) ce qui facilite non seulement leur diffusion mais également leur capacité à s'accumuler à de fortes concentrations dans les cellules sans affecter les boucles de régulation d'après Longo et al.<sup>61</sup> Ainsi, les concentrations cytosoliques libres de phosphocréatine et de créatine dans le muscle squelettique sont de 27 et 13 mM respectivement alors que celles d'ATP et d'ADP sont de 8 mM et de 20  $\mu$ M<sup>62,63</sup>.

La créatine permet de transférer des groupements de haute énergie depuis les sites de production des mitochondries aux sites de consommation dans le cytoplasme cellulaire (Figure 12) selon la réaction  $\text{MgADP} + \text{Phosphocréatine} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MgATP} + \text{créatine}$  catalysée par la créatine kinase (CK). La créatine kinase est une enzyme hétérogène douée d'une activité importante dans le métabolisme énergétique. Elle est présente dans de nombreux organes et son rôle est de reconstituer les réserves en ATP, utilisables par la cellule. Il existe trois isoenzymes cytosoliques, la CK-MM (présente dans le muscle strié), la CK-BB (présente dans le cerveau) et la CK-MB (présente dans le myocarde). Il existe deux isoenzyme mitochondriales : la sMtCK sarcomérique spécifique du muscle strié et la uMtCK ubiquitaire présente dans de nombreux tissus y compris le cerveau<sup>64</sup>. La créatine kinase permet via le système créatine/phosphocréatine de stocker ou de libérer le phosphate de haute énergie en fonction des besoins. Ainsi au niveau des sites de production mitochondriaux, la réaction s'effectue dans le sens :  $\text{MgATP} + \text{créatine} \rightarrow \text{MgADP} + \text{Phosphocréatine} + \text{H}^+$ . La phosphocréatine sert de réserve énergétique dans le cytosol cellulaire qui circule jusqu'aux sites de consommation comme par exemple une ATPase. La créatine kinase cytosolique catalyse alors la réaction inverse  $\text{MgADP} + \text{Phosphocréatine} + \text{H}^+ \rightarrow \text{MgATP} + \text{créatine}$  afin de libérer l'ATP utilisable alors par la cellule. D'autres sites cytosoliques font appel à l'activité de la créatine kinase. Ainsi cet enzyme transphosphoryle l'ATP issu de la glycolyse en phosphocréatine. La créatine kinase est responsable du maintien de l'équilibre du ratio ATP/ADP dans le cytoplasme cellulaire<sup>5, 7, 46, 47, 61</sup>.



**Figure 12 : Système créatine/phosphocréatine/créatine kinase**

La créatine entre dans la cellule par le transporteur de la créatine (CRT). La créatine (Cr) peut être prise en charge par la créatine kinase couplée à la phosphorylation oxydative mitochondriale (mtCK) pour produire la phosphocréatine (PCr). De même, elle intervient après la glycolyse (G) pour stocker l'ATP produit sous forme de PCr grâce à la créatine kinase couplée à la glycolyse (CK-g). Dans le cytosol, la créatine kinase soluble cytosolique (CK-c) maintient l'équilibre entre l'ATP et l'ADP. Enfin, la PCr est utilisée par la créatine kinase associée aux sites de consommation de l'ATP (CK-a) pour régénérer l'ATP et permettre la fonction des pompes ATPase notamment. Extrait de Walliman et al.<sup>46</sup>

Ainsi, le système Cr/PCr possède cinq grandes fonctions<sup>65</sup>. Tout d'abord, il est responsable du maintien dans le temps de l'énergie puisque la créatine kinase catalyse la synthèse de l'ATP. De plus, il est en charge de la répartition spatiale de la source énergétique, la créatine et la phosphocréatine diffusant dans la cellule. Egalement ce système évite l'accumulation d'ADP libre dans la cellule, ce qui empêche l'inactivation des ATPases cellulaires<sup>66, 67</sup>. La quatrième fonction est de maintenir l'homéostasie protonique ainsi que les concentrations de phosphate inorganique requis pour l'activation de la glycolyse et la glycogénolyse deux mécanismes de production énergétique. Enfin, ce système permet d'assurer des ratios ATP/ADP appropriés à chaque site subcellulaire.

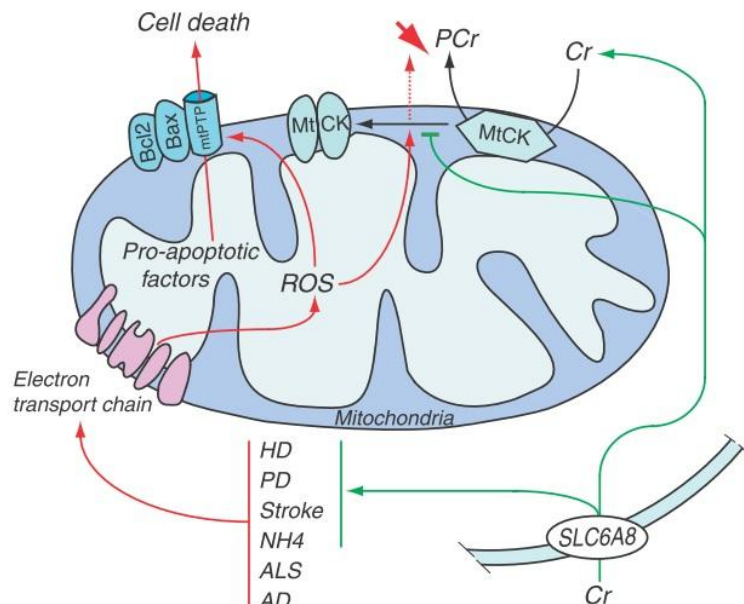
Le système Cr/PCr n'est cependant pas mis à contribution de la même façon dans tous les types cellulaires. Les cellules avec un métabolisme oxydatif important ne l'utilisent pas, c'est le cas des hépatocytes. Il est en revanche très fonctionnel dans les organes à fortes demandes énergétiques : le muscle squelettique, le cœur et le cerveau<sup>65</sup> qui présentent de fortes activités de la créatine kinase<sup>68</sup>.

Compte tenu de l'implication des mitochondries dans les pathologies neuronales, il est intéressant de considérer les caractéristiques particulières du système créatine/phosphocréatine fonctionnel au niveau mitochondrial. Les mitochondries sont impliquées dans les phénomènes apoptotiques, ce qui repose sur le pore de transition de la perméabilité mitochondriale MTPTP. A l'état normal, la créatine kinase mitochondriale existe dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie où elle se convertit en une forme octomérique<sup>69</sup>. Cette forme octomérique facilite le couplage des porines ou VDAC (canaux anioniques dépendant du voltage) de la face externe de la membrane avec la protéine ANT (ou translocateur de nucléotides à adénine) à la face interne. Ceci entraîne la suppression de l'ouverture du pore mitochondrial. Au contraire, le stress oxydant induit la forme dimérique, ce qui favorise l'ouverture du pore, augmente la perméabilité du pore de transition mitochondriale. Cela libère les protéines pro-apoptotiques perturbe l'homéostasie calcique et altère la respiration mitochondriale<sup>46, 70</sup>. De plus cela conduit à la formation d'inclusions cristallines, signe d'une cytopathie mitochondriale bien que les conséquences physiologiques ne soient pas encore définies<sup>71</sup>. Les mitochondries contiennent des protéines pro-apoptotiques qui peuvent diffuser dans le cytosol et conduire à la mort cellulaire. De plus, des espèces réactives de l'oxygène peuvent être libérées et activer les phénomènes cellulaires consécutifs à un stress oxydatif. La créatine kinase joue un rôle anti-oxydant dans ces conditions puisqu'elle permet la diminution des superoxydes (Figure 13)<sup>72</sup>.

**Figure 13 : Rôle anti-oxydant de la créatine kinase au niveau mitochondrial**

*Dans le cas de pathologies (du type maladie de Huntington, de Parkinson, d'Alzheimer...), les espèces réactives de l'oxygène ROS libérées dans la mitochondrie favorisent la conversion de la forme octomérique de la mtCK en forme dimérique, permettant l'ouverture du pore de transition mitochondrial mtPTP et la libération de facteurs induisant la mort cellulaire. Au contraire, la créatine, qui entre dans la cellule par le transporteur spécifique (SLC6A8) inhibe cette conversion. Elle exerce ainsi une activité anti-oxydante.*

*Extrait de Béard et al.<sup>1</sup>*



## 1.1.6 Fonctions physiologiques de la créatine

De par son implication dans le cycle énergétique cellulaire, la créatine présente des fonctions physiologiques aussi nombreuses que variées. Elle est surtout connue pour son effet dans le métabolisme énergétique (cf §1.1.6.1) mais elle possède des propriétés anti-apoptotiques, anti-oxydantes, ou protectrices au niveau cardio-vasculaire (cf §1.1.6.3 à 1.1.6.6). Ces propriétés seront décrites de façon succincte dans les paragraphes suivants. Au niveau cérébral plus spécifiquement, elle augmenterait les performances cérébrales et régulerait les processus de mémorisation et de neuromodulation ou encore elle exercerait une action neuroprotectrice (cf §1.1.6.2). Le métabolisme de la créatine serait à prendre en considération dans le déclenchement et l'évolution des maladies neurologiques et notamment, elle pourrait être une cible thérapeutique intéressante. Ceci sera évoqué dans le paragraphe 1.1.6.7.

### 1.1.6.1 Effets ergogéniques musculaires → dystrophies musculaires

La créatine est un supplément nutritionnel largement utilisé pour ses propriétés ergogéniques par les athlètes amateurs et professionnels <sup>73</sup>. De nombreuses publications décrivent la supplémentation en créatine utilisée chez les sportifs et illustrent les gains obtenus en termes de performance sportive. En résumé, deux principaux schémas d'administration sont retenus. Le premier est une supplémentation traditionnelle d'une forte dose de créatine (20 g/jour soit 0.3 g/kg/jour) pendant une durée courte (5 jours environ) <sup>3</sup>. Le second protocole consiste en l'utilisation de faible dose (3 g/jour soit 0.03 g/kg/jour) pendant 4 à 6 semaines <sup>74</sup>. Il est largement démontré maintenant que, seul, le premier protocole exerce des effets ergogéniques, augmentant les performances et la résistance physiques à l'effort de courte durée (inférieure à 30 secondes) dans de nombreux sports (vélo, course à pieds, natation...) <sup>75</sup>.

La quantité de créatine totale (créatine + phosphocréatine) du muscle squelettique est de 40-50 mM. La supplémentation par la créatine augmente la quantité totale de créatine de 25% et même de 37% lorsqu'elle est associée à de l'exercice musculaire <sup>3</sup>. En réalité, la supplémentation en créatine a un effet inversement proportionnel à la charge initiale de créatine avant l'apport exogène. Ainsi, le contenu intramusculaire en créatine augmente beaucoup moins chez les jeunes hommes que chez leurs homologues plus âgés <sup>7</sup>. La supplémentation en créatine seule n'a aucun effet sur l'augmentation de la masse musculaire, elle doit être associée à une demande musculaire <sup>7</sup>. Ceci

semble évident si l'on considère que la demande énergétique musculaire active le transport actif de la créatine intramusculaire. Ces observations ont été faites en clinique ainsi qu'*in vivo* chez le rat.

Le pouvoir ergogénique de la créatine peut s'expliquer par cinq mécanismes distincts d'après Rawson et Persky<sup>76</sup> : l'augmentation de la phosphocréatine et du glycogène ; la resynthèse rapide de la phosphocréatine après consommation ; l'augmentation de l'expression de facteurs de croissance ; la diminution des dommages musculaires et de l'inflammation ainsi que l'augmentation du volume musculaire probablement due aux effets osmotiques de la créatine. La rétention d'eau induite par le transport de la créatine impose une diminution de la force ionique augmentant la sensibilité des protéines contractiles musculaires à la concentration en ions calciques. Ceci favorise alors la force musculaire en permettant une meilleure contraction<sup>77</sup>.

Les effets ergogéniques de la créatine au niveau musculaire pourraient être exploités dans le traitement des pathologies musculaires comme les dystrophies musculaires, l'atrophie gyrée chorioretinienne ou les myopathies. L'atrophie gyrée est une maladie autosomale récessive caractérisée par une dégénérescence chorioretinienne et une atrophie des fibres musculaires de type 2. Au niveau moléculaire, des mutations sur le gène codant pour l'ornithine aminotransférase induisent une hyperornithonémie qui, comme cela a été évoqué au chapitre 1.1.1, inhibe la synthèse de créatine par l'inactivation de l'AGAT. Au niveau musculaire, la supplémentation en créatine a permis de reverser les symptômes des patients mais aucun effet n'a pu être constaté sur la progression de la déficience visuelle car la cause même de la pathologie n'était pas traitée<sup>78</sup>. Des essais cliniques ont montré des bienfaits de la créatine dans divers troubles d'origine musculaire comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker. Des augmentations notables de la force contractile musculaire et de la résistance à la fatigue musculaire ont permis aux patients de bénéficier d'une amélioration de leurs symptômes. Toutefois, une augmentation de la masse musculaire n'est pas toujours décrite comme cela est rappelé dans la synthèse de Brosnan et al<sup>7</sup>.

### 1.1.6.2 Effets ergogéniques cérébraux → performances cérébrales

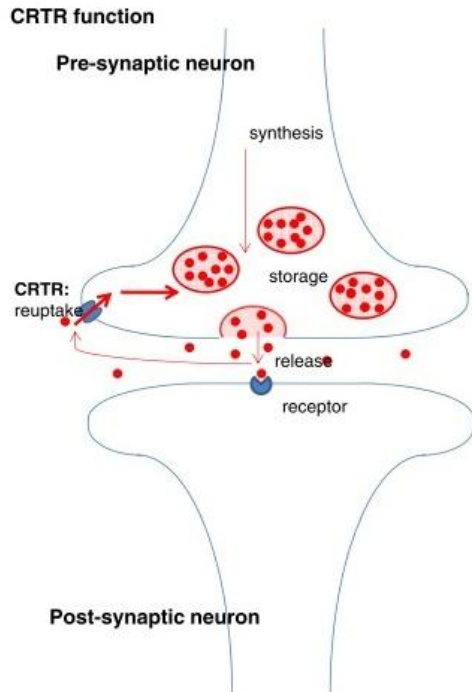
Au niveau du système nerveux central, le système créatine/phosphocréatine/créatine kinase (Cr/PCr/CK) permet également le maintien de l'énergie nécessaire au développement et à la fonctionnalité du cerveau grâce à son rôle dans la régénération et la conservation des niveaux d'ATP cellulaire<sup>5, 7, 79</sup>. Chez l'homme, le cerveau est un grand consommateur d'énergie car, bien qu'il ne représente que 2% de la masse corporelle, il nécessite jusqu'à 20% des dépenses énergétiques.

La créatine participerait aux processus de développement et de maturation du système nerveux central notamment dans les derniers stades d'organisation corticale durant lesquels elle stimulerait la synaptogenèse, un processus qui continue après la naissance<sup>80</sup>. L'homéostasie de la créatine joue sur le maintien des potentiels membranaires neuronaux, les gradients ioniques à l'origine de la propagation du signal, de l'homéostasie calcique intracellulaire, du transport neuronal, de la transduction des signaux intra et intercellulaires et bien sûr, sur la neurotransmission. En effet, la créatine agirait comme neurotransmetteur soumis au même mécanisme d'exocytose calcium-dépendant (Figure 14)<sup>81</sup>. Des études suggèrent un rôle neuromodulateur ou co-transmetteur dans le SNC puisqu'il a été montré que la créatine peut moduler la neurotransmission GABAergique, agissant comme agoniste partiel ou antagoniste des récepteurs post-synaptiques selon la concentration locale de créatine<sup>81-84</sup>. La créatine régulerait entre autres l'appétit et par conséquent le poids corporel en agissant sur les noyaux spécifiques de l'hypothalamus<sup>85</sup>. Par ailleurs, l'accumulation active de créatine dans les synaptosomes du cerveau de rat exprimant le SLC6A8 confirme l'hypothèse d'un mécanisme de recapture de la créatine au niveau de la membrane terminale des axones et appuie sa fonction neurotransmettrice<sup>44, 86</sup>.

Un traitement de volontaires sains par 8 grammes de créatine par jour pendant 5 jours a montré que la créatine diminue la fatigue mentale lors de tests de calcul mental. Il semble que cette supplémentation favorise la consommation d'oxygène au niveau cérébral<sup>87</sup>. Les performances mentales sont également améliorées dans une population âgée par le traitement de 5 g de créatine 4 fois par jour pendant 2 semaines<sup>88</sup>. Enfin, une étude en double aveugle versus placebo a été menée sur un groupe de 45 végétariens et végétaliens qui présentent une concentration tissulaire et plasmatique en créatine plus faible que des individus possédant un régime carné. (Aucune donnée n'indique que la concentration cérébrale en créatine chez ces sujets soit plus faible.) La supplémentation en créatine semble alors augmenter le score d'intelligence ainsi que la mémoire à court terme en se basant sur un test nommé « Auditory Backward digit span test ». Ce test nécessite d'écouter une suite de chiffre et de la réciter à l'envers. Le nombre de chiffres exacts énoncés est



alors comparés entre les différents groupes <sup>89</sup>. La créatine semble donc posséder des propriétés ergogéniques capables d'augmenter les performances cérébrales.



**Figure 14 : La créatine est impliquée dans la neurotransmission**

*La créatine semble pouvoir agir comme un neurotransmetteur dont la recapture dans la fente synaptique est importante pour le maintien des fonctions neuronales <sup>44</sup>.*

### 1.1.6.3 Effet anti-oxydant et anti-apoptotique → Lésion cérébrale post-traumatique

La créatine présente des effets protecteurs contre le stress oxydatif <sup>90</sup>. Une étude *in vivo* s'est intéressée à l'effet d'un traitement débuté précocement après le déclenchement d'un stress traumatique cérébral. Il s'avère par exemple qu'une diminution de la peroxidation lipidique et de la carbonylation protéique sont observés, signes secondaire d'un stress oxydant <sup>91</sup>. L'activité du complexe II de la chaîne respiratoire du striatum diminuée par la toxicité de l'acide guanidinoacétique est restaurée par un traitement par la créatine <sup>92</sup>. En revanche, l'effet protecteur de la créatine sur l'hyperexcitabilité induite par le traumatisme est encore à confirmer puisque les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  voient leur activité diminuer même en présence de créatine et qu'il existe des résultats contradictoires concernant la susceptibilité épileptique. De façon intéressante, les profils diffèrent suivant l'âge de l'animal : les animaux pédiatriques présentent une diminution du risque convulsif <sup>93</sup> contrairement aux animaux adultes <sup>91</sup>. Dans le cadre d'une lésion cérébrale post-traumatique, la créatine diminue immédiatement dans la zone oedémateuse chez le rat. Toutefois, la synthèse de la créatine est un mécanisme apparemment intact puisque l'intensité du signal de la

créatine est augmentée dans un groupe d'enfants suivis 15 à 30 jours après le choc traumatique par spectrométrie RMN <sup>94</sup>.

Une étude sur 39 enfants et adolescents qui souffraient de lésions cérébrales traumatiques a présenté l'intérêt d'un traitement par la créatine à la dose de 0.4g/kg/jour (voie orale ou sonde gastrique) mais seulement si ce traitement était initié moins de 4 h après l'attaque. Le suivi des patients corrèle la supplémentation en créatine à la diminution des maux de tête, de la fatigue cérébrale ainsi que des sensations de vertige. L'ingestion de créatine augmenterait les stocks cérébraux de phosphocréatine et conserverait l'intégrité des mitochondries <sup>95</sup>.

#### **1.1.6.4 Effet protecteur contre l'anoxie → Accident vasculaire cérébral**

Le manque d'oxygène limite la capacité des neurones à synthétiser l'ATP. *In vitro* et *in vivo*, il a été démontré qu'il y a une diminution de l'ATP neuronale en conditions anoxiques. Les résultats des études *in vitro* indiquent qu'un pré-traitement par la créatine augmente la concentration de créatine dans la structure cérébrale et protège des dommages anoxiques. En effet, la créatine protège les communications neuronales en favorisant le maintien des potentiels d'action et elle réduit la mort neuronale <sup>96</sup>.

En revanche, dans les modèles *in vivo* d'accident vasculaire cérébral ou d'ischémie cérébrale qui conduisent à une anoxie, les données semblent beaucoup plus contradictoires. Des effets neuroprotecteurs d'un pré-traitement par la créatine sont décrits chez le rat. Bien que la pression intra-crânienne ne soit pas sensible à la présence de la créatine, celle-ci présente des conséquences bénéfiques sur la diminution de l'apoptose par inhibition des caspases 3 et sur la diminution de l'expression des aquaporines 4 (AQP4) ce qui limite l'extension de l'œdème cytotoxique. Au final, lors de tests comportementaux, une augmentation du score neurologique a pu être montrée chez les animaux ayant eu un pré-traitement <sup>97</sup>.

#### **1.1.6.5 Effets sur la tolérance au glucose**

Une supplémentation en créatine peut contrebalancer le déficit en GLUT4 observé lors de l'immobilisation musculaire. De plus, associée à un effort musculaire, elle augmente la tolérance au glucose. Son effet devait donc être étudié dans les pathologies induites par une résistance à l'insuline comme le diabète de type 2. Il a été montré que la thérapie par la créatine améliore le contrôle de la

glycémie et la sensibilité à l'insuline<sup>98, 99</sup>. Le mécanisme mis en jeu est une augmentation de la translocation du transporteur du glucose.

#### **1.1.6.6 Autres propriétés non exploitées en clinique**

La créatine aurait un rôle d'osmolyte essentiel lors d'un choc hyperosmotique cellulaire (Botwell, 2002). En 1999, des propriétés anti-tumorales lui étaient même assignées<sup>100</sup>. Elle jouerait un rôle en tant que protecteur cardio-vasculaire puisqu'elle diminue la concentration plasmatique d'homocystéine, un acide aminé athérogénique. L'homocystéine provient pour 40% de la production de S-adénosylhomocystéine qui est un métabolite produit lors de la biosynthèse de la créatine. Celle-ci ayant un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse, elle diminue les taux de S-adénosylhomocystéine et donc ceux d'homocystéine, réduisant le risque cardio-vasculaire<sup>101, 102</sup>.

Enfin, l'incubation de cellules endothéliales avec de la créatine montre une augmentation du pool intracellulaire de phosphocréatine associé à un effet de diminution de la perméabilité endothéliale induite par la sérotonine et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, l'adhésion des neutrophiles sur la monocouche endothéliale est limitée par la diminution de l'expression des protéines d'adhérence « InterCellular Adhesion Molecule » ou ICAM1 et E-sélectine<sup>103</sup>. Elle présenterait donc des propriétés anti-inflammatoires.

#### **1.1.6.7 Pathologies cérébrales psychiatriques et neurodégénératives :**

Les exemples précédents illustrent les effets pléiotropiques de la créatine, impliqués dans des pathologies cérébrales ou non cérébrales. Les données de spectroscopie RMN démontrent qu'une supplémentation en créatine permet d'augmenter le pool intracérébral de créatine et de phosphocréatine, il apparaît donc que la créatine doit tenir un rôle important dans la physiopathologie de nombreux syndromes neuropsychiatriques et neurodégénératifs. Elle pourrait également y jouer un rôle thérapeutique puissant. Les paragraphes suivants appuient ce propos.

*In vitro*, dans une étude portant sur des neurones d'hippocampe de rat en culture primaire, il a été montré que la créatine permet une neuroprotection contre l'excitotoxicité induite par le glutamate et le peptide  $\beta$ -amyloïde<sup>104, 105</sup>. Elle intervient également dans la neurotransmission médiée par le récepteur NMDA<sup>105</sup>. Ainsi, une supplémentation de 1% de créatine dans le régime alimentaire de

rats atténue les lésions excitotoxiques induites par le NMDA en augmentant la quantité de métabolite énergétique dans le cellule et en inhibant l'activation du pore de transition de la perméabilité mitochondriale <sup>106</sup>.

### ❖ *Troubles psychiatriques*

De façon générale, les troubles psychiatriques (stress psychologique, schizophrénie, troubles bipolaires, troubles dépressifs et troubles d'anxiété généralisés) sont associés à des altérations du métabolisme de la créatine, principalement une diminution de l'activité de la créatine kinase ou une diminution des concentrations en créatine ou phosphocréatine comme cela a été montré par des études de spectroscopie RMN chez des patients schizophrènes <sup>107</sup>. Ces diminutions sont controversées dans les troubles dépressifs où une étude montre une augmentation de la créatine totale <sup>108</sup>.

Les altérations du métabolisme de la créatine traduisent une dysfonction mitochondriale dans les maladies mentales. Une hypothèse est que le circuit énergétique rapide de la créatine n'étant plus exploitable, la cellule se tourne vers l'utilisation de la glycolyse pour subvenir à ses besoins énergétiques. Or cette voie de métabolisme repose sur le catabolisme du glucose qui est beaucoup plus lent et moins pourvoyeur d'ATP que la phosphocréatine, ce qui altère la fonction cognitive et l'humeur.

Une supplémentation en créatine permettant l'augmentation des concentrations de phosphocréatine cérébrale, elle peut avoir un intérêt thérapeutique chez les patients atteints de troubles mentaux <sup>108</sup>. L'implication clinique de la créatine dans ces pathologies cérébrales est synthétisé dans la revue d'Allen <sup>108</sup>. Plusieurs essais cliniques ont été entrepris dans diverses pathologies cérébrales suite aux résultats prometteurs observés chez des animaux modèles du syndrome dépressif.

Des études quantitatives des métabolites cérébraux ont été entreprises chez les enfants et les adultes atteints d'autisme par spectroscopie RMN du proton. Chez les enfants autistes, les auteurs décrivent une diminution des concentrations de créatine dans les lobes occipitaux. En revanche, chez les adultes la créatine semble augmenter légèrement dans les lobes temporaux <sup>109</sup>. Outre la démonstration que la régulation métabolique en condition pathologique varie au cours du développement, ces données posent la question des quantifications cérébrales relatives des

métabolites exprimées en ratio par rapport à la référence créatine comme on le fait aujourd'hui<sup>110, 111</sup>. Le signal de créatine cérébrale augmente avec l'âge et peut être altéré par des conditions pathologiques. Un exemple intéressant est obtenu par la quantification absolue et relative des métabolites N-acétyl aspartate, choline et créatine dans un modèle animal de syndrome dépressif. Ces trois métabolites présentent des concentrations absolues diminuées par rapport à des animaux contrôle mais les ratios NAA/Cr et Cho/Cr sont identiques<sup>112</sup>. Des études similaires menées chez des patients atteints de troubles d'anxiété généralisée, un des désordres psychiatriques les plus répandus, ont montré une diminution faible de la créatine observée dans le cortex préfrontal dorsolatéral gauche, une zone impliquée dans l'arrêt du sentiment de peur par inhibition de l'amygdale<sup>113</sup>. D'autres études décrivent des diminutions de la créatine dans les troubles dépressifs, les troubles bipolaires, les accès de panique et les troubles de la personnalité<sup>114-116</sup>.

En revanche, les essais réalisés chez deux patients schizophrènes alertent sur le risque de l'aggravation des troubles maniaques dans les troubles bipolaires pendant la supplémentation en créatine<sup>117</sup>.

Ces études tendent à faire un lien entre les maladies psychotiques et la diminution de la concentration en créatine. Cette dernière est également induite dans des situations d'hypermétabolisme comme les tumeurs<sup>118, 119</sup>. Or, il est maintenant possible d'associer les troubles psychotiques à un hypermétabolisme cellulaire. Chez les patients souffrant de troubles d'anxiété généralisée, on observe une augmentation du glutamate et de la glutamine qui sont des neurotransmetteurs excitateurs associés au maintien du sentiment de peur et à l'hyperréactivité. Un mécanisme proposé est que l'état anxieux du patient conduit au relargage inapproprié de neurotransmetteurs excitateurs conduisant à un hypermétabolisme au sein du cortex préfrontal dorsolatéral gauche. Ceci provoque une consommation de la créatine à des fins énergétiques et donc une diminution de sa concentration, ce qui rend les neurones plus sensibles à l'excitotoxicité du glutamate. *In fine*, le processus conduit à des altérations importantes du fonctionnement neuronal<sup>113</sup>.

De plus, la créatine augmente la biodisponibilité énergétique, favorise la survie neuronale et réduit le stress oxydant et les processus pro-apoptotiques et pro-nécrotiques. En outre, les effets anti-oxydants et neuromodulateurs de la créatine permettant une neuroplasticité entrent en jeu lors du traitement des maladies psychiatriques. Enfin, les pathologies psychiatriques sont associées à de fortes concentrations d'homocystéine (voir paragraphe 1.1.6.6).

Il est évident que des données manquent pour illustrer le mécanisme d'action de la créatine neurobiologique dans les maladies mentales afin de connaître sa valeur dans la prédiction de l'avancée de la maladie ou des chances de succès thérapeutique. Un défi expérimental reste à résoudre concernant la mise en place des protocoles expérimentaux car il est impossible pour des patients instables d'arrêter leur traitement. Or il est connu que les médicaments anti-psychotiques et anti-dépresseurs modifient le transport de la créatine et l'activité de la créatine kinase. On ne peut alors pas dissocier les conséquences de l'évolution de la pathologie du traitement médicamenteux. Ce phénomène varie en fonction des zones cérébrales, de la classe thérapeutique, de la posologie et du schéma thérapeutique <sup>108</sup>. Il est donc important d'exploiter des techniques expérimentales comparables à savoir une définition précise des zones cérébrales concernées et une analyse quantitative absolue des métabolites. Le biais induit par la rationalisation des métabolites au signal fluctuant de la créatine en conditions pathologiques a été évoqué au début de ce paragraphe.

#### ❖ *Maladies neurodégénératives*

##### La maladie d'Alzheimer

La **maladie d'Alzheimer (AD)** est un désordre neurodégénératif progressif dépendant de l'âge caractérisé par un déficit cognitif associé à la présence de plaque  $\beta$ -amyloïde et à l'échelle cellulaire à des dysfonctions mitochondriales. En effet, de nombreuses altérations enzymatiques du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire sont détectées (Figure 15) <sup>120</sup>. Ces inhibitions conduisent à l'installation d'un stress oxydant qui inhibe la créatine kinase, empêchant toute conversion de la créatine intracellulaire en phosphocréatine. En parallèle, la protéine précurseur du peptide amyloïde semble servir de protéine chaperonne pour l'adressage de la créatine kinase à la mitochondrie. Lors de la perte d'APP fonctionnelle, les niveaux de créatine kinase diminuent ce qui limite la conversion de la créatine. Dans ces deux cas, la créatine s'accumule et forme des dépôts dans les cellules <sup>121, 122</sup>. La présence de ces dépôts suggère l'hypothèse qu'une supplémentation en créatine est futile dans ce contexte et cela participe probablement à expliquer que le signal de créatine augmente dans le cortex frontal de rat modèles de la pathologie d'Alzheimer (McGill-R-Thy1-APP) à 1 an d'âge par rapport aux contrôles associés. Toutefois, ce processus semble dépendre de la zone cérébrale étudiée puisqu'aucune différence n'est détectable dans l'hippocampe dorsal <sup>110</sup>.



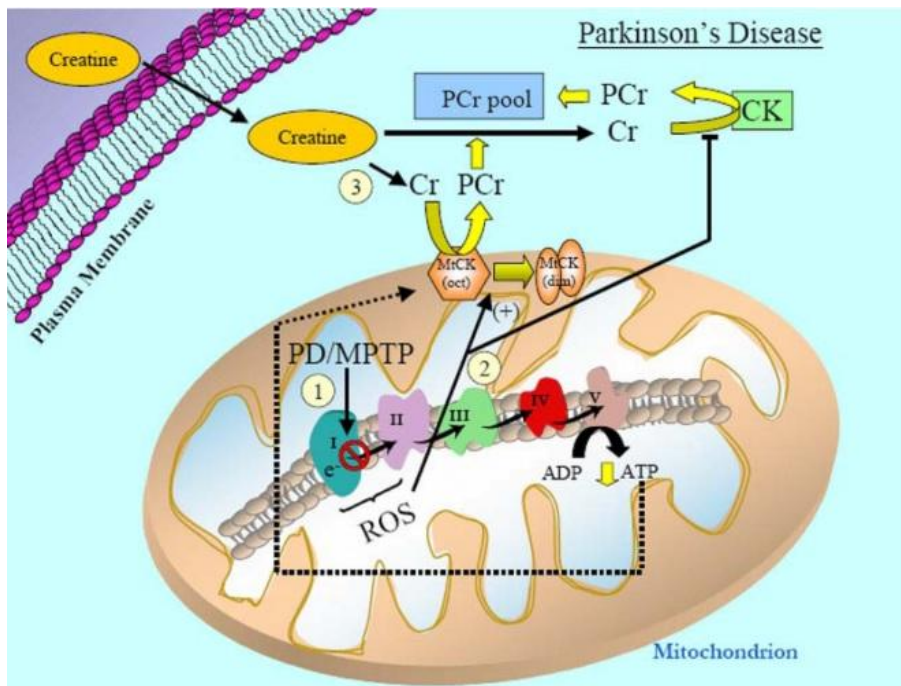
### **La maladie de Parkinson**

La **maladie de Parkinson (PD)** est caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée et la présence d'inclusions protéiques intraneuronales (les corps de Lewy). Le lien avec un déficit mitochondrial se fait aisément puisque le MPTP ou 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine qui induit un syndrome parkinsonien chez l'animal est connu pour effectuer une inhibition sélective du complexe I mitochondrial nécessaire à la chaîne de transport d'électrons<sup>120</sup>.

La créatine peut limiter la neurotoxicité induite par le MPTP dans un animal modèle de parkinsonisme<sup>123</sup>. L'acide aminé permet de limiter la perte des neurones et donc la déplétion en dopamine. Un essai clinique de phase II a montré une diminution de 50% de la progression du syndrome de Parkinson chez des patients précocement diagnostiqués en 1 an de traitement par la créatine<sup>124, 125</sup>. Un autre essai a confirmé que la supplémentation par 20 g/jour de créatine favorisait l'endurance et la force musculaire chez ces patients<sup>126</sup>. Un second essai de plus large envergure, dont on attend les résultats, vient juste de se clore. Il étudiait l'impact d'un traitement par la créatine dans les cas de parkinsonisme précoce (nom de l'étude : LS-1, 1720 sujets).

Dans ce contexte pathologique, les bienfaits de la créatine s'expliqueraient de la même façon que dans le cas de la maladie d'Alzheimer. De par son effet direct sur la production d'espèces radicalaires de l'oxygène, la conversion de la créatine kinase mitochondriale octamérique en forme dysfonctionnelle dimérique serait limitée ainsi que l'inactivation de la créatine kinase résultante de l'effet inhibiteur du stress oxydatif<sup>71</sup> (Figure 16).





**Figure 16 : Implication de la mitochondrie dans la maladie de Parkinson**

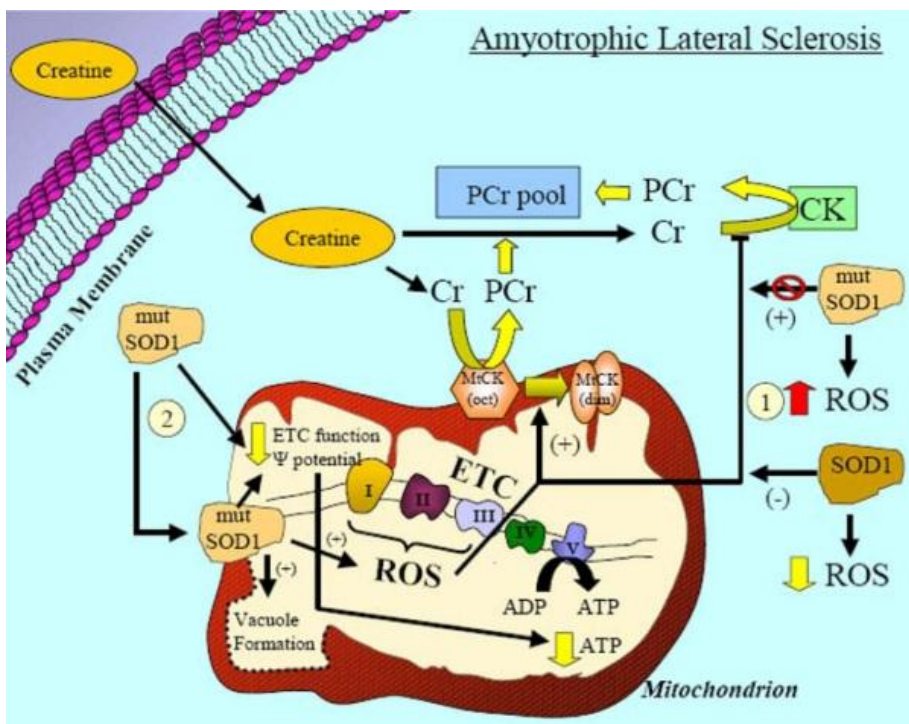
*L'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale augmente la production de ROS qui inactive la mtCK par dimérisation et diminue la quantité d'ATP qui est nécessaire pour permettre la production de PCr. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) inhibent également l'activité de la créatine kinase. La supplémentation par la créatine permettrait de restaurer le contenu intracellulaire en créatine. Extrait d'Adihetty et al.<sup>71</sup>*

### La sclérose amyotrophique latérale

Les mécanismes délétères dus à un défaut de recapture du glutamate semblent être également impliqués dans la **sclérose amyotrophique latérale (ALS)** qui conduit à une dégénérescence des neurones moteurs du cortex moteur et de la moelle épinière. Bien que les étiologies soient à ce jour encore inconnues, la forme la plus généralisée de la pathologie est une forme familiale exprimant diverses mutations sur le gène codant pour la superoxyde dismutase (SOD), une métallo-protéinase à propriétés anti-oxydantes. Ceci engendre des défauts énergétiques mitochondriaux (Figure 17). La SOD mutée n'est plus en mesure d'exercer son activité anti-oxydante et on observe non seulement une augmentation des espèces radicalaires de l'oxygène mais également une activité enzymatique diminuée des complexes de la chaîne respiratoire. Ceci contribue aux modifications morphologiques des mitochondries résultant notamment de la diminution des potentiels membranaires mitochondriaux, d'un gonflement de la mitochondrie et de la formation d'une vacuole<sup>71</sup>. La conséquence est une diminution de l'ATP<sup>120</sup>.

Une réduction du ratio N-acétylaspartate/créatine dans la substance blanche a été décrite dans cette pathologie et cette diminution a été associée à une augmentation de la créatine<sup>127, 128</sup>. Des études prometteuses ayant montré l'intérêt d'une supplémentation en créatine dans la performance

motrice des modèles animaux de SAL (G93A SOD1) grâce à la protection contre la mort des neurones moteurs <sup>129</sup>, trois études cliniques publiées entre 2003 et 2008 ont été entreprises à 5 et 10 g de créatine par jour. Celles-ci n'ont pas conduit à l'efficacité attendue, probablement car les doses de créatine utilisées sont trop faibles. Une étude en spectroscopie RMN atteste d'une augmentation de 8% du signal de créatine à partir d'une supplémentation de 15 g/jour <sup>130</sup> associée à une diminution de 17% des acides aminés glutamate et glutamine dès la troisième semaine de traitement. De façon intéressante, la seule thérapie approuvée par l'agence réglementaire américaine Food and Drug Administration est le riluzole qui inhibe le relargage du glutamate. Le mécanisme mis en jeu par l'administration de fortes doses de créatine semble comparable : la créatine servirait de source énergétique pour permettre la recapture du glutamate dans la fente synaptique. Ceci limiterait l'accumulation des acides aminés excitateurs (glutamate et aspartate) dans la synapse et permettrait de limiter les dépolarisations répétées, l'œdème cellulaire par influx de sodium, et de maintenir l'homéostasie calcique et par là même limiterait les dommages neuronaux.



**Figure 17 : Implication de la mitochondrie dans la sclérose latérale amyotrophique**

Les mutations du gène codant pour la SOD1 conduisent à une activité anti-oxydante diminuée de l'enzyme et à une augmentation des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) (1 et 2). Celles-ci inactivent la mtCK par dimérisation et inhibent la créatine kinase, ce qui aboutit à la diminution de la PCr. La supplémentation par la créatine permettrait de restaurer le contenu intracellulaire en créatine. Extrait de Adhietty et al. <sup>71</sup>

### **La maladie de Huntington**

La **maladie de Huntington (HD)** ou chorée de Huntington est une maladie neurologique héréditaire autosomale dominante progressive qui conduit à des troubles moteurs (mouvements irrépressibles) et cognitifs chez les patients. Elle est due à des répétitions de nucléotides (CAG) dans le gène codant pour la huntingtine qui conduit à une répétition anormale de polyglutamine dans la séquence de la protéine. A l'état non pathologique, cette protéine est impliquée par ses interactions protéine-protéine dans le transport intracellulaire, la transduction du signal et la transcription, l'autophagie et la fonction mitochondriale <sup>131</sup>. Dans un contexte pathologique, la protéine mutée engendre des mécanismes conduisant à la mort cellulaire des neurones du striatum. Des altérations du métabolisme énergétique cellulaire sont à l'origine de l'expansion de la maladie. La protéine mutée diminue l'expression du co-facteur PGC-1 $\alpha$  qui diminue alors l'expression des gènes codant pour les protéines mitochondriales, ce qui conduit à une diminution de la fonction mitochondriale, de la concentration en ATP et à une augmentation des espèces radicalaires de l'oxygène <sup>71</sup> (Figure 18). Des diminutions d'activités enzymatiques dans le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative sont mises en évidence <sup>120</sup> à la fois dans le cerveau et en périphérie. Notamment les patients présentent des taux de phosphocréatine musculaire diminués. De nombreux essais thérapeutiques ont été réalisés dans des modèles animaux de la pathologie comme les souris R6/2 ou N-171-82Q. La supplémentation en créatine prolonge leur durée de vie, diminue l'atrophie cérébrale et retarde l'atrophie neuronale dans le striatum ainsi que la formation des agrégats protéiques de huntingtine. Ceci semble corrélér avec une augmentation de la concentration de créatine et d'ATP dans le cerveau de ces souris <sup>132-135</sup>.

Une étude clinique sur 64 patients en double aveugle et versus placebo de la supplémentation par 8 g/jour de créatine pendant 16 semaines a mis en évidence une diminution marquée de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine sérique, un marqueur des dommages oxydatifs à l'ADN <sup>136</sup>. Un second essai est en cours de mise en place, il s'agit de l'essai CREST-E phase III. 650 sujets sont en cours de recrutement pour l'évaluation d'un traitement par la créatine dans la maladie de Huntington.

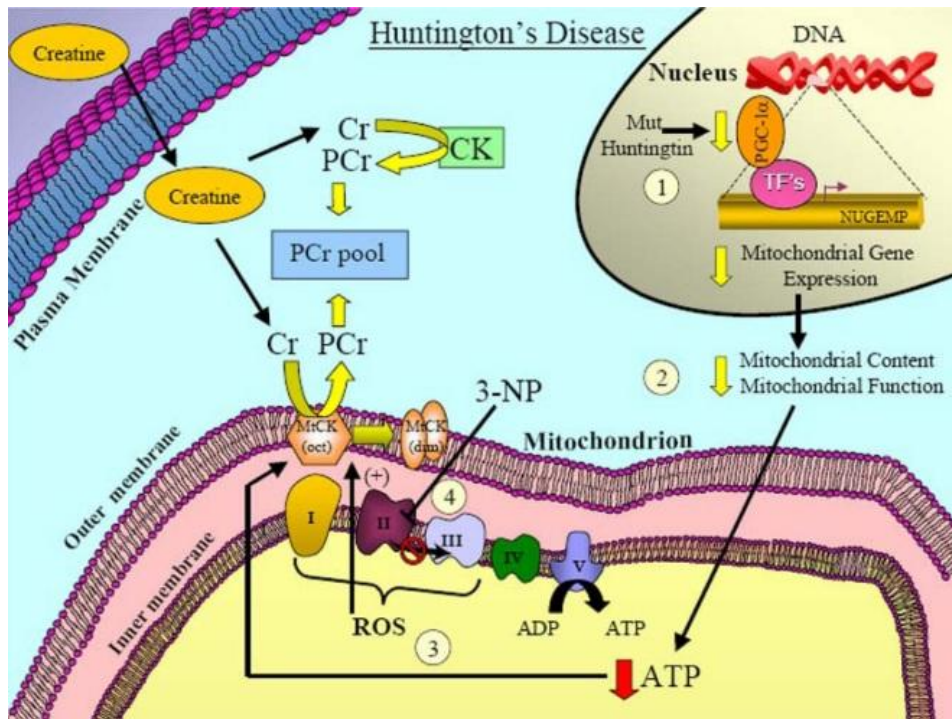


Figure 18 : Implication de la mitochondrie dans la maladie de Huntington

La huntingtine mutée diminue la quantité de cofacteur PGC-1 $\alpha$ , ce qui régule l'expression des gènes codant pour les protéines mitochondriales. Ceci conduit à la diminution de la synthèse d'ATP et inhibe la créatine kinase. En parallèle, la libération des espèces radicalaires de l'oxygène inactive la mtCK par dimérisation, conduisant à une diminution de la PCr. La supplémentation par la créatine permettrait de restaurer le contenu intracellulaire en créatine. Extrait d'Adihetty et al.<sup>71</sup>

En conclusion, sans bien comprendre leur rôle pathophysiologique, les effets bénéfiques cérébraux de la créatine ont maintenant été démontrés *in vivo* et en clinique<sup>75</sup>. La supplémentation en créatine permet notamment d'améliorer la qualité de vie des patients.

### 1.1.7 Risques à l'utilisation de la créatine

La créatine est un acide aminé qui présente des propriétés thérapeutiques intéressantes dans de nombreuses pathologies humaines. Considérée à ce jour comme un complément alimentaire, elle ne relève pas de la réglementation des produits à visée médicamenteuse. Il est donc intéressant de se pencher sur la position des autorités sanitaires face à cette potentielle thérapeutique.

Malgré ses effets ergogéniques, au point de vue réglementaire, la créatine est un supplément alimentaire et non un anabolisant. Largement présente sur le marché américain depuis 1993<sup>137</sup>, son

utilisation est recommandée dans la limite d'une dose de 0.3 g/kg/jour par la société internationale de la nutrition du sport <sup>138</sup>. La position européenne diffère puisque c'est seulement en 2004 que les autorités compétentes sur la sécurité alimentaire en acceptent l'utilisation comme complément alimentaire <sup>137</sup>. Toutefois, la société française de nutrition du sport et l'ex-agence française de sécurité sanitaire des produits alimentaires participent à un projet de Directive Européenne qui prône une non-utilisation de la créatine chez les sportifs en raison d'allégations qui ne respectent pas l'éthique sportive. En effet, les produits disponibles dans le commerce sont parfois mal purifiés ou contaminés par des anabolisants <sup>139</sup> (rapport AFSAA, 2001) De plus, cette directive prévoit un étiquetage particulièrement précis des produits pour sportifs de façon à ce que la consommation quotidienne de créatine ne dépasse pas 2 à 3 g/jour, proche du renouvellement physiologique quotidien (SFNS, 2009 ; European Food safety authority web site : The EFSA Journal (2004)).

D'autre part, les agences de sécurité sanitaire recommandent que l'utilisation de la créatine ne soit faite que chez des personnes en bonne santé au vu des prétendus risques carcinogène et d'atteinte rénale. La créatine semble pouvoir être un précurseur cancérigène par la production d'amino-imidazo-aza-arènes lors de la cuisson de la viande mais les concentrations sont très faibles et leur risque cancérigène non démontré. En outre, la nitrosation des produits de la créatine est théoriquement possible dans l'estomac mais en pratique proche de zéro. Il n'existe à l'heure actuelle aucune preuve scientifique du pouvoir cancérigène de la créatine <sup>102</sup>.

Quelques cas de dysfonction rénale ont été rapportés dans la littérature. Ils relèvent d'études rétrospectives chez 6 sportifs sans suivi ni du protocole d'administration ni du dosage de la créatine. Les études encadrées publiées n'ont quant à elles jamais démontré de déficits de la fonction rénale <sup>75, 140</sup>. Une étude rapporte que de très fortes doses de créatine (20 g/jour) augmentent la production urinaire de méthylamine et de formaldéhyde, des composés cytotoxiques associés à une néphropathie. Toutefois les concentrations n'atteignent pas les limites hautes normales acceptées chez le sujet sain <sup>141</sup>. L'utilisation de la créatine est donc considérée comme sans danger à l'heure actuelle au vue de la faible proportion de cas présentant un effet indésirable par rapport au grand nombre d'utilisateurs <sup>102</sup>. Les seuls effets indésirables bénins rapportés sont des diarrhées, une sensation de soif et des crampes stomacales.

Cependant, un petit bémol peut être apporté à cette analyse concernant la prise en compte de l'attitude du consommateur, surtout aux Etats-Unis où la créatine est un complément alimentaire largement répandu chez les sportifs adultes mais également chez les enfants. Si seulement 2 à 5% de la tranche d'âge 6-9 ans utilise de la créatine, les 10-12 ans sont entre 5 et 40% à en prendre

quotidiennement. Ce chiffre augmente avec l'âge puisque les athlètes universitaires sont entre 28 et 41% suivre une supplémentation par la créatine, 1/3 d'entre eux en prenant depuis le lycée. Ces chiffres impressionnants ne concernent pourtant que les athlètes non professionnels. Les athlètes pro sont eux jusqu'à 75% (en fonction des disciplines) à compter sur les effets ergogéniques de la créatine <sup>102</sup>. Cette supplémentation se fait bien souvent en dehors de tout avis médical et sans aucune considération des recommandations de dosage. Des études toxicologiques n'ont montré aucune toxicité aiguë ou subaiguë ni d'activité mutagène. Toutefois, aucune étude n'appuie l'absence de danger à long terme de ce type de supplémentation dans une population pédiatrique. Seule la supplémentation consistant en une dose de charge de 20 g/jour soit 0.3 g/kg/jour suivi d'une dose d'entretien de 2 à 5 g/jour soit 0.05 g/kg/jour est donc considérée à ce jour comme sans risque

<sup>102</sup> .

## 1.2 Les syndromes de déficit cérébral en créatine

### 1.2.1 Classification des syndromes de déficit cérébral en créatine

Jusqu'au milieu des années 2000, les syndromes de déficit cérébral en créatine étaient regroupés sous l'appellation large de « syndromes de déficit en créatine ». Mais il s'est avéré au fur et à mesure des caractérisations cliniques et biologiques des patients qu'une diminution en créatine n'était pas toujours retrouvée dans les fluides biologiques. Aujourd'hui cet ensemble de pathologies est donc défini sous l'appellation Syndromes de Déficit Cérébral en Créatine (Cerebral Creatine Deficiency Syndromes ou CCDS) <sup>47</sup>.

Les syndromes de déficit cérébral en créatine constituent un ensemble de maladies héréditaires du métabolisme de la créatine. Il existe trois pathologies distinctes conduisant toutes à des troubles envahissants du comportement liés à l'absence complète de créatine au niveau cérébral. Deux concernent un déficit de la biosynthèse de la créatine, on parle alors de déficience en AGAT ou en GAMT et le troisième est un déficit de transport de la créatine ou déficit en SLC6A8.

Le déficit en GAMT a été le premier à être décrit chez l'humain en 1994 <sup>142</sup>, alors que le déficit en AGAT n'apparaît dans la littérature qu'en 2001 <sup>143</sup>. Ces déficits altèrent chaque étape de la voie de biosynthèse de la créatine car les enzymes deviennent inactives. Celles-ci étant codées par un gène situé sur le chromosome 15 et sur le chromosome 19 respectivement, il s'agit de troubles d'origine autosomale récessive <sup>144</sup>. A ce jour, le diagnostic du déficit en GAMT a été publié chez 52 patients et celui du déficit en AGAT chez 7 patients issus de 3 familles distinctes. Des essais de thérapie par administration d'acides aminés précurseurs de la synthèse ou de créatine ont donné de bons espoirs en augmentant voire en normalisant la concentration de créatine cérébrale, ce qui améliore les symptômes sans aboutir toutefois à une réversion complète chez l'ensemble des patients. D'autre part, dans le cas d'un traitement pré-symptomatique, un développement neuronal normal est constaté, preuve de l'efficacité d'une supplémentation en créatine <sup>145</sup> et du rôle clé de celle-ci dans la physiopathologie des syndromes de déficit cérébral en créatine.

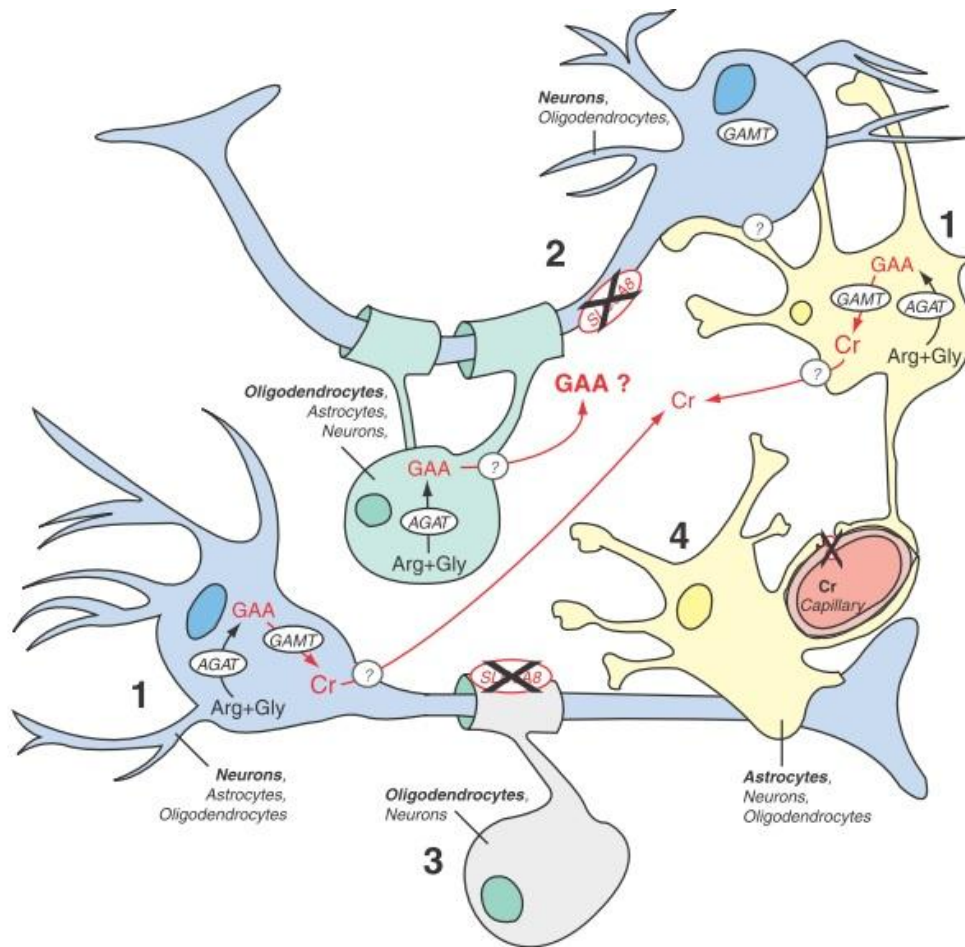
### 1.2.2 Physiopathologie du déficit en transporteur de la créatine

Le déficit en transporteur de la créatine constitue le contexte pathologique de cette thèse. Cette pathologie a été décrite pour la première fois au début des années 2000<sup>146</sup>. Dans ce contexte pathologique, le gène codant pour transporteur de la créatine SLC6A8 porte une mutation, ce qui abolit la fonctionnalité du transporteur. Comme il est indiqué au chapitre 1.2, le transporteur de la créatine ou SLC6A8 est codé par un gène situé sur le chromosome X. Les hommes seront donc toujours homozygotes pour le gène muté et donc toujours malades. En revanche, les femmes seront plus fréquemment hétérozygotes, présentant alors des formes variables de la pathologie.

Ce déficit en transporteur de la créatine apparaît bien plus fréquemment que les déficits en biosynthèse car, à ce jour, plus de 150 patients sont déjà été mentionnés dans la littérature<sup>47</sup>.

La déficience cérébrale de créatine détectée est le symptôme crucial de la pathologie puisqu'elle explique le retard psycho-moteur développé par les patients<sup>144</sup>. En effet, deux observations au niveau cellulaire permettent de mieux comprendre la physiopathologie. Tout d'abord, l'inactivité du SLC6A8 empêche tout passage de la créatine du sang vers le cerveau au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Le cerveau ne sera plus alimenté par la créatine périphérique provenant de l'alimentation ou de la synthèse périphérique. En outre, les communications et les échanges entre les différentes cellules cérébrales lors de la synthèse intra-cérébrale de créatine reposent très clairement sur la fonctionnalité du SLC6A8 qui est en charge du passage de l'intermédiaire de synthèse ou du produit fini des cellules productrices aux cellules utilisatrices (Figure 19). Dans le cas du déficit en transporteur de la créatine, ces interrelations cellulaires ne peuvent plus avoir lieu, la synthèse de créatine n'est plus possible et lorsque la quantité de créatine existante sera utilisée, elle ne pourra plus être réapprovisionnée. La source énergétique cellulaire disparaît et les troubles neurologiques apparaissent. Le second point repose sur la constatation que cette déficience intracellulaire en créatine est associée à une concentration normale de créatine dans le liquide céphalo-rachidien. En tenant compte des propriétés de neurotransmission de la créatine, on peut émettre l'hypothèse que la déficience cérébrale en créatine observée dans le cadre du déficit en transporteur de la créatine est due à un défaut de recapture de la créatine suite à au relargage de celle-ci<sup>44</sup>. Ceci altère les communications neuronales et participe à l'aggravation des symptômes.





**Figure 19 : Echanges cérébraux dans le contexte pathologique du déficit en transporteur de la créatine**

Le transporteur de la créatine (SLC6A8) inopérant modifie les échanges cellulaires : la créatine ne peut plus être extraite de la circulation sanguine (4 et seules les cellules exprimant les deux enzymes de synthèse produisent la créatine (1, 2).

Extrait de Béard et al. <sup>1</sup>

### 1.2.3 Diagnostic clinique du déficit en transporteur de la créatine

Le diagnostic clinique des patients homozygotes et des patientes hétérozygotes diffère. Les symptômes cliniques des patients homozygotes sont principalement neurocognitifs : un retard mental associé à un retard de langage, une dyspraxie orale, un déficit de l'attention, des altérations du comportement ainsi que des troubles épileptiques <sup>147, 148</sup>. Au vu de cette liste, la difficulté du diagnostic apparaît clairement. Aucun de ces signes cliniques n'est pathognomonique de la pathologie et ils sont communs avec de nombreuses autres pathologies du système nerveux central.

D'autres signes cliniques ont été décrits chez les patients, notamment des troubles morphologiques : retard de croissance, dysmorphies, microcéphalie, une atrophie cérébrale <sup>148</sup>. Une hypotrophie musculaire, une hypotonie et une mitochondriopathie secondaire sont également mentionnées dans le tableau clinique des patients. Certains signes s'accroissent avec l'évolution de la maladie (c'est le cas de l'atrophie cérébrale) ou apparaissent chez les patients adultes (comme les troubles gastro-intestinaux) <sup>149</sup>.

Les femmes hétérozygotes atteintes du déficit en transporteur de la créatine présentent un profil beaucoup moins pathologique avec pour 50% d'entre elles des difficultés à l'apprentissage ainsi que des problèmes de comportement et une épilepsie pharmaco-résistante <sup>47</sup>.

Par ailleurs, l'inhibition du transport de la créatine entraîne une diminution des stocks intracellulaires de créatine, ce qui peut conduire à diminuer la prise alimentaire et le poids corporel <sup>85</sup>. Ce paramètre associé au défaut d'entrée de la créatine dans les muscles peut expliquer la petite taille et le faible poids chez certains patients par rapport à la normale. Cependant, ceci est très variable en fonction des individus. Au long terme, des adaptations métaboliques face à la diminution de l'apport énergétique peuvent se mettre en place. Ainsi, les fibres musculaires squelettiques voient leur diamètre diminuer, ce qui diminue la distance de diffusion des composés pro-énergétique ; la capacité aérobie est augmentée et le contenu en glycogène est augmenté <sup>150</sup>. Il s'avère qu'associé à ces observations, il existe une augmentation de l'activité du transporteur majoritaire du glucose GLUT4. Ceci permet de produire la quantité nécessaire d'ATP via la glycolyse. Il y a donc des processus physiologiques adaptatifs d'une déficience cellulaire en créatine <sup>151</sup>. Cette adaptation laisse la place à un mécanisme de production énergétique beaucoup plus lent. Ceci peut donc expliquer qu'au niveau musculaire les troubles ne soient pas toujours observés tandis qu'ils seraient beaucoup plus marqués au niveau neuronal ou les cellules nécessitent des apports très intenses et très rapides pour permettre le bon fonctionnement cérébral.

#### **1.2.4 Diagnostic biologique du déficit en transporteur de la créatine**

Le diagnostic du déficit en transporteur de la créatine repose sur l'imagerie par spectroscopie RMN du proton, sur une analyse des paramètres biologiques (ratio créatine/créatinine urinaire) et sur des études fonctionnelle et moléculaire.

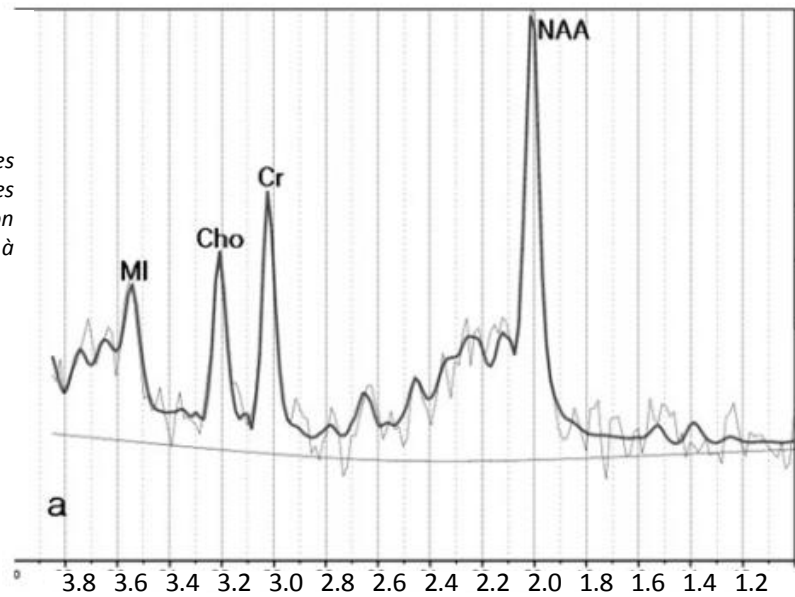
#### 1.2.4.1 Spectroscopie RMN du proton

La spectrométrie du proton par résonance magnétique (H-MRS) est une technique non invasive de neuro-imagerie qui permet d'identifier, de localiser et de quantifier des métabolites d'intérêt. La spectrométrie est fondée sur la mesure des signaux de résonance magnétique générés par les noyaux protons  $^1\text{H}$  en réponse à des impulsions radiofréquences. Elle permet de détecter des molécules dans un volume parfaitement défini de tissu biologique (localisation en 3D) et de quantifier leurs concentrations respectives. L'avantage de cette technique est qu'elle est un outil de diagnostic complémentaire à l'imagerie par résonance magnétique puisqu'elle offre la possibilité de confronter des données anatomiques (fournies par l'IRM) à des données métaboliques. Les cliniciens peuvent exploiter la spectrométrie localisée où la détection se fera dans un petit échantillon précis ou l'imagerie spectrométrique par résonance magnétique grâce à laquelle on obtient une cartographie régionale de distribution pour chaque métabolite. La sensibilité de la méthode permet de détecter des composés dont la concentration est de l'ordre du millimolaire (DIDELOT J.M., SIWIEC L., Etat de l'art de la spectrométrie *in vivo* du proton par RMN ; Projet DESS "TBH" ; UTC ; [http://www.utc.fr/~farges/DESS\\_TBH/00-01/Projets/spectro/srm.htm](http://www.utc.fr/~farges/DESS_TBH/00-01/Projets/spectro/srm.htm)).

Dans le cadre du diagnostic du déficit en créatine cérébral, le métabolite d'intérêt est la créatine. La Figure 20 présente une analyse d'un sujet sain. Chaque pic est spécifique du métabolite indiqué et à chacun de ces pics est associée une valeur unique de déplacement protonique. On constate ainsi que le déplacement de la créatine est de 3.04 ppm. Ces analyses par spectroscopie RMN du proton sont validées par d'une part la présence de pics normaux pour la choline (déplacement 3.22 ppm) et la N-acétyl aspartate (déplacement 2.02 ppm)<sup>144, 152</sup> et, d'autre part, le fort pouvoir résolutif entre les pics de créatine et de choline. Ce pouvoir résolutif est caractérisé par un retour à la ligne de base entre les 2 pics d'intérêt.

**Figure 20 : Analyse par spectroscopie RMN du proton d'un sujet non pathologique**

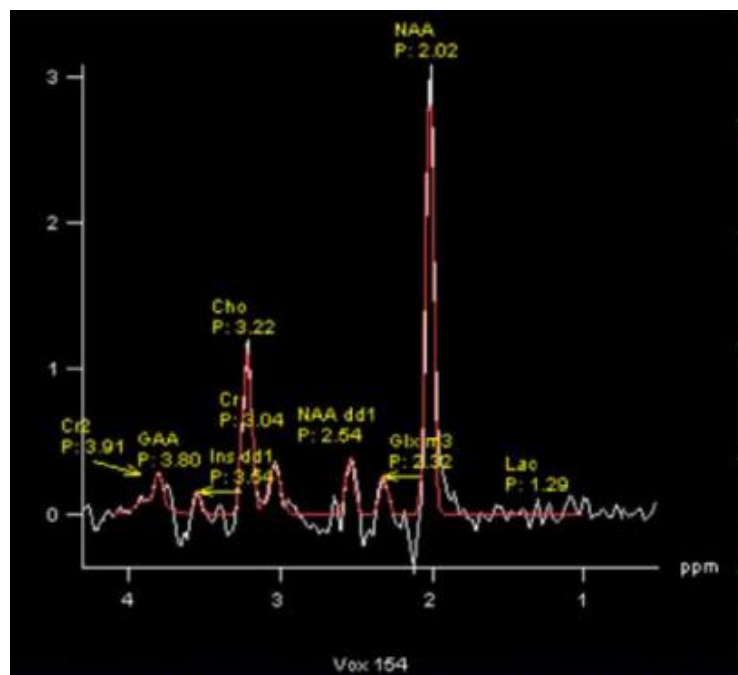
L'axe des abscisses représente les déplacements protoniques caractéristiques des métabolites détectés en ppm. Ainsi, on notera la présence du pic de la créatine à 3.04 ppm et celui de la choline à 3.22 ppm



Par contre, chez les patients atteints de déficit en transporteur de la créatine (Figure 21), on observe une diminution, voire une disparition du pic spécifique de la créatine. Chez certains patients, il est également possible d'observer parfois un pic plus intense de radiofréquence spécifique 3.80 ppm, ce qui traduirait une accumulation de GAA dans le cerveau <sup>153</sup>.

**Figure 21 : Analyse par spectroscopie RMN du proton d'un sujet pathologique**

On notera la disparition du pic de la créatine au déplacement chimique de 3.04 ppm.  
Extrait de Sijens et al. <sup>153</sup>



En revanche, le profil des femmes hétérozygotes indique une diminution partielle ou un niveau normal de la créatine cérébrale <sup>154</sup>. Cet examen n'est donc pas discriminant pour cette population, bien qu'une corrélation entre l'abaissement du pic de créatine et le quotient intellectuel semble exister.

Cette analyse est une approche très utile pour le diagnostic mais qui présente deux inconvénients majeurs : tout d'abord c'est une technique très coûteuse qui n'est donc pas disponible dans tous les centres de prise en charge des patients, et de plus, elle ne permet pas de poser le diagnostic différentiel entre les déficits de synthèse de la créatine et le déficit en transport <sup>155</sup>.

#### 1.2.4.2 Analyses biologiques

Les analyses biologiques spécifiques demandées pour les patients suspectés de présenter un déficit cérébral en créatine comprennent le dosage de la créatine et de l'acide guanidinoacétique dans le plasma, les urines et le liquide céphalo-rachidien. Cela permet notamment le calcul des ratios urinaires créatine/créatinine et acide guanidinoacétique/créatinine.

Le profil des analyses des patients homozygotes (hom) et des patientes hétérozygotes (hét) atteints de déficit en transporteur de la créatine est présenté dans le Tableau 1.

fluide biologique	GAA	créatine
urines	normale ou faiblement augmentée ( <i>hom</i> ) normale ( <i>hét</i> )	augmentée ( <i>hom</i> ) normale ou faiblement augmentée ( <i>hét</i> )
plasma	normale ( <i>hom &amp; hét</i> )	normale ou augmentée ( <i>hom</i> ) NA ( <i>hét</i> )
LCR	NA ( <i>hom &amp; hét</i> )	normale ( <i>hom</i> ) NA ( <i>hét</i> )
fluide biologique	créatinine	ratio cr/crn
urines	NA ( <i>hom &amp; hét</i> )	augmenté ( <i>hom</i> ) normal ou faiblement augmenté ( <i>hét</i> )
plasma	normal ou diminué ( <i>hom &amp; hét</i> )	NA ( <i>hom &amp; hét</i> )
LCR	diminuée ( <i>hom</i> ) NA ( <i>hét</i> )	NA ( <i>hom &amp; hét</i> )

**Tableau 1 : Analyses biologiques des patients atteints du déficit en transporteur de la créatine**

NA : information non disponible ; hom : patient homozygote pour la mutation ; het : patient hétérozygote pour la mutation

Comme le Tableau 1 le montre, pour les patients homozygotes, seul le ratio urinaire créatine/créatinine est un outil exploitable. Par comparaison, les déficits en biosynthèse de la créatine sont principalement marqués par une augmentation de la concentration plasmatique et urinaire de l'intermédiaire de synthèse acide guanidinoacétique.

#### **1.2.4.3 Analyse fonctionnelle**

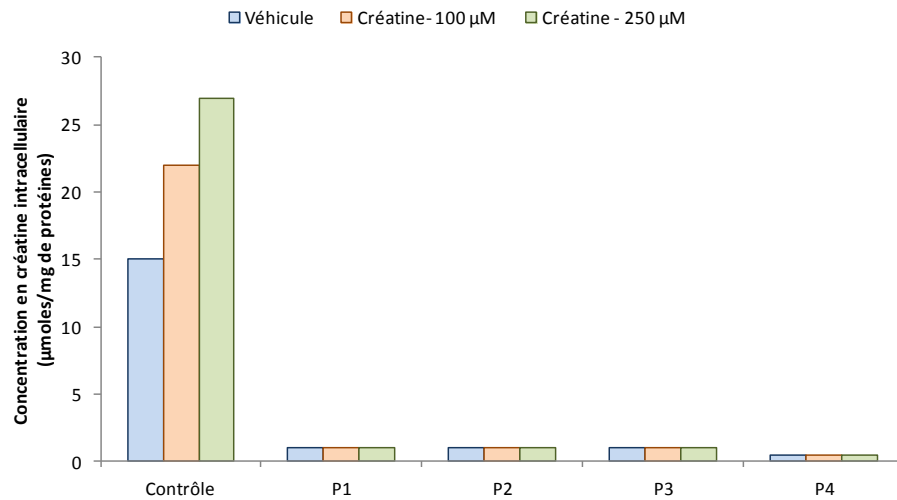
L'analyse de la fonctionnalité du transporteur SLC6A8 est évaluée dans des fibroblastes de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine. Brièvement, le protocole utilisé par nos collaborateurs hospitaliers le Pr Pascale de Lonlay et le Dr Vassili Valayannopoulos du Centre de Référence des Maladies Héritaires du Métabolisme de l'enfant et de l'adulte de l'Hôpital Necker-Enfants Malades repose sur l'étude de la reprise de la créatine dans des fibroblastes de patients. Ces fibroblastes sont obtenus à partir de prélèvements de peau obtenus par consentement des patients ou de leurs représentants légaux. Ces fibroblastes sont incubés avec 100 ou 250  $\mu\text{M}$  de créatine pendant 24h. Les concentrations intracellulaires de créatine dans les fibroblastes de patients sont ensuite comparées à celles des fibroblastes contrôles non atteints par une perte de fonctionnalité du transporteur SLC6A8.

Dans la Figure 22 A, il est bien démontré que les fibroblastes des quatre patients P1 à P4 présentent un taux intracellulaire inférieur de créatine endogène par rapport au patient contrôle. L'incubation des cellules avec de fortes concentrations en créatine (y compris à un niveau supra-physiologique de 250  $\mu\text{M}$ ) ne permet pas de restaurer la concentration intracellulaire en créatine. En revanche, celle-ci augmente dans les cellules contrôles lorsqu'elles sont incubées avec une solution de créatine, cette augmentation allant jusqu'à un facteur 1.5 en présence de la concentration 250  $\mu\text{M}$ <sup>156</sup>. De plus, il a été démontré que la faible incorporation de créatine dans les fibroblastes de certains patients, quant elle est possible, c'est-à-dire à des concentrations largement supra-physiologiques de 500  $\mu\text{M}$ , est insensible à la présence d'un inhibiteur spécifique du SLC6A8, l'acide guanidinopropionique ou GPA<sup>155</sup> (Figure 22 B). Ceci confirme donc que le transporteur SLC6A8 n'est pas fonctionnel dans les cellules des patients, et cela valide le diagnostic.

Il est intéressant de noter que lorsque cette étude est menée dans des fibroblastes issus de patientes hétérozygotes, le résultat peut être parfaitement identique aux fibroblastes contrôles. Bien que ces patientes expriment un variant du transporteur, celui-ci reste fonctionnel.

**Figure 22 : Incorporation de la créatine dans les fibroblastes**

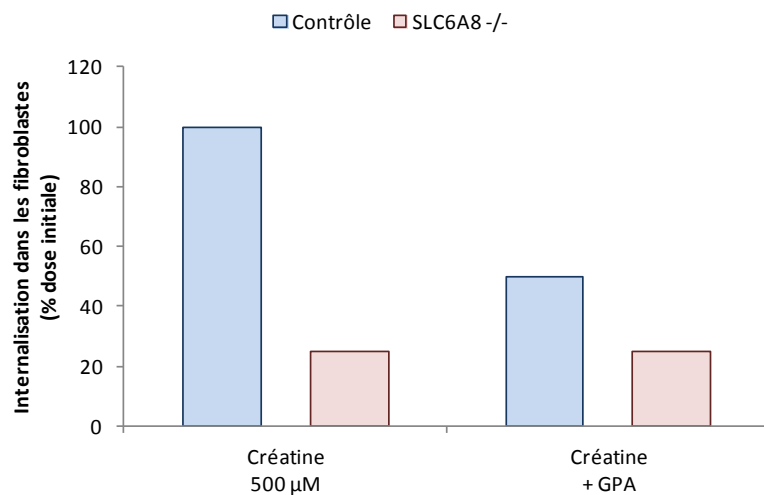
**A :**



Les fibroblastes des patients *SLC6A8* *-/-* (P1, P2, P3, P4) atteints du déficit en transporteur de la créatine présentent une quantité de créatine endogène beaucoup plus faible que les fibroblastes du sujet contrôle (histogrammes bleus). En présence de créatine, seule la quantité de créatine dans les fibroblastes du sujet contrôle augmente comparé aux patients (histogrammes oranges et verts). Ceci indique que le transport de la créatine dans les fibroblastes de patients est aboli.

Figure d'après Valayannopoulos V., thèse de sciences, Caractérisation fonctionnelle et pharmacologique de mutations du transporteur de la créatine (*SLC6A8*) *in vitro* et chez des patients atteints du déficit cérébral en créatine, soutenue le 25 novembre 2011.

**B :**

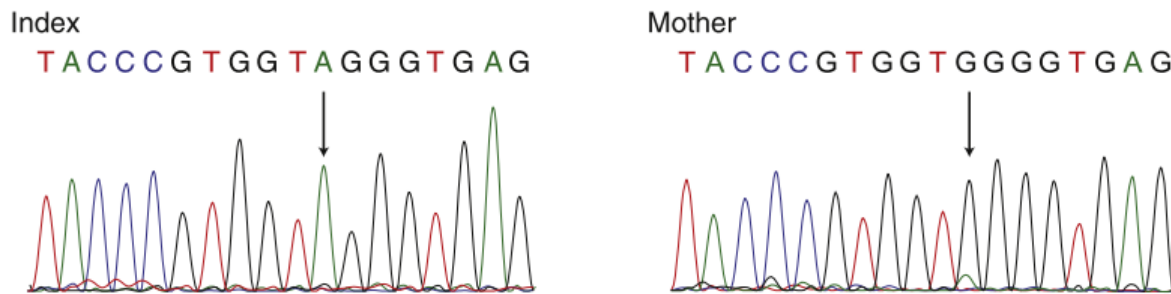


A gauche, l'incubation d'une concentration supra-physiologique de créatine (500 μM) diminue l'entrée dans les fibroblastes des patients (histogramme rose) par rapport au contrôle (histogrammes bleu). A droite, la co-incubation de la créatine avec un inhibiteur du transporteur *SLC6A8* (l'acide guanidinopropionique ou GPA) diminue l'entrée de la créatine dans les fibroblastes des contrôles (bleu) mais pas des patients (rose). Chez les patients, l'absence d'effet de l'inhibiteur montre que le transporteur n'est pas fonctionnel.

Figure adaptée de Nasrallah et al., 2010<sup>155</sup>.

#### 1.2.4.4 Analyse moléculaire du gène codant pour le SLC6A8

Grâce aux paramètres biologiques ainsi qu'à l'étude de l'incorporation de la créatine dans les fibroblastes, les cliniciens disposent d'un faisceau de présomptions pour poser le diagnostic de la déficience du transporteur de la créatine chez les patients. Toutefois, l'analyse moléculaire du gène codant pour le SLC6A8 seule permet de confirmer le diagnostic en révélant les mutations portées par le gène. Il s'agit notamment de la seule analyse discriminante pour les femmes hétérozygotes pour le SLC6A8<sup>154</sup>. L'analyse des mutations permet également de classer l'origine de la maladie : somatique ou *de novo*. Pour cela, les mutations sont recherchées chez les proches parents du patient, notamment sa mère (Figure 23).



**Figure 23 : Séquençage ADN du gène codant pour le SLC6A8 entre les positions c.1657 et c.1674**

*La comparaison du patient (index) et de sa mère montre que la mutation hémizygote c.1667G>A associée à la perte de fonctionnalité du transporteur de la créatine chez le patient est portée par sa mère (flèches)<sup>40</sup>. Ainsi, un petit pic est détectable à la position c.1667 du séquençage de l'ADN maternel, signe de la forme familiale de la maladie.*

En revanche, ceci n'est valable que si la mutation recherchée est déjà connue ou retrouvée chez des membres apparentés de la famille. En effet, on est ainsi en mesure d'établir une corrélation génotype-phénotype. Pour toutes les mutations nouvellement décrites et apparaissant *de novo*, il est excessivement difficile de corréliser ces modifications à la perte de l'activité de transport. Certaines mutations permettent de maintenir une fonction de transport résiduelle, ce qui rend l'étude plus complexe.

De façon consensuelle, il est admis que les variants dus à des délétions d'un acide aminé, des erreurs d'épissage et des mutations non-sens sont pathogènes. Cependant, les mutations faux-sens sont plus difficiles à interpréter. Une base de données a été créée récemment. Elle rassemble les données cliniques et moléculaires issues des diagnostics médicaux : il s'agit de la « Leiden Open Variation



Database » ou LOVD ([http://grenada.lumc.nl/LOVD2/vumc/variants\\_statistics.php](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/vumc/variants_statistics.php)). A ce jour, 762 variants de 146 types différents ont été recensés. Les mutations de ces variants sont réparties dans les différents exons et domaines transmembranaires du gène codant pour le transporteur (Figure 24). Plus d'une vingtaine de mutations considérées comme pathologiques ont été publiées<sup>40, 47, 157</sup>.

exon	# variants	percentage of variants per exon
01	5	
01i	29	
02	19	
02i	27	
03	98	
03i	2	
04	2	
04i	4	
05	32	
05i	8	
06	48	
06i	20	
07	30	
07i	45	
08	51	
08i	6	
09	35	
09i	5	
10	34	
10i	11	
11	15	
11i	22	
12	30	
12i	25	
13	133	

**Figure 24 : Répartition des variants du gène *slc6a8* en fonction des exons**

*La colonne 2 indique le nombre de variant détectable dans chaque exon et la colonne 3 leur proportion relative en %. Les variants du gène *SLC6A8* sont répartis dans les différents exons du gène.*

Le diagnostic du déficit en transporteur de la créatine est difficile à poser car les symptômes ne sont pas spécifiques de la pathologie. De nombreux patients attendent donc des années avant de bénéficier d'un diagnostic. De plus, le diagnostic biologique des patientes hétérozygotes est le plus difficile : le ratio créatine/créatinine urinaire ainsi que les études de capture de la créatine dans les fibroblastes n'apportent souvent aucune information, de même que la 1H-MRS qui ne montre que rarement un signal en créatine diminué. Le seul vrai diagnostic repose donc sur l'analyse moléculaire du gène *SLC6A8*.

### 1.2.5 Fréquence des déficits en transporteur de la créatine

Les troubles liés aux retards mentaux représentent 2 à 3% de la population des pays occidentaux <sup>158</sup>. 70% des patients atteints de retards mentaux sont des hommes, ce qui suggère une forte contribution des défauts liés au chromosome X <sup>159</sup>. Les retards mentaux liés au chromosome X représentent ainsi 5 à 12% des retards mentaux avec une contribution large du syndrome de l'X fragile (2%). Cette pathologie est due à une répétition du nucléotide CGG qui affecte le gène FMR1 (*fragile X mental retardation 1*) sur le chromosome X et qui conduit à des difficultés intellectuelles variables associées à un retard mental moyen à sévère. Une base de données européenne a vu le jour dans le but de recenser les patients atteints de retards mentaux liés à l'X. Il s'agit du consortium européen XLMR (X-Linked Mental Retardation). 290 patients étaient déjà recensés entre 1998 et 2004 et plus de 600 familles le sont aujourd'hui.

Plus d'une centaine de patients atteints d'un déficit en transporteur de la créatine ont été identifiés dans les 10 dernières années. Ceci montre donc non seulement une forte incidence de ce syndrome dans la population occidentale <sup>159</sup> mais également une amélioration de la stratégie diagnostique. La fréquence du déficit en transporteur de la créatine est calculée par rapport au nombre de patients diagnostiqués à ce jour et dont le dépistage repose sur l'imagerie confirmée par les études moléculaires et fonctionnelles. La fréquence est ainsi estimée entre 1 et 5.4% des retards mentaux d'étiologie inconnue chez les patients masculins. Le Tableau 2 rapporte les différentes études qui ont permis d'estimer ce paramètre.

Fréquence	nombre de patients/nombre total de sujet dans l'étude	référence
2.1%	2/96	<i>Mercimek-Mahmutoglu, 2007</i>
5.4%	2/37	
2.1%	6/288 (patients masculins avec XLMR)	<i>Lion-François, 2006</i> <i>Rosenberg, 2004</i>
2.2%	2/92 (patients masculins avec retard de développement et QI < 70)	<i>Newmeyer, 2005</i>
0.8%	4/478	<i>Clark, 2006</i>
3.5%	4/114 (patients masculins avec un retard mental non expliqué et négatifs pour le syndrome de l'X fragile)	<i>Lion-François, 2006</i>

**Tableau 2 : Fréquence du déficit en transporteur de la créatine dans la littérature**

L'incidence du déficit en transporteur de la créatine est probablement sous-estimée puisqu'il y a peu de recul sur cette pathologie décrite très récemment. Il y a donc probablement encore beaucoup de familles non dépistées et/ou non enregistrées. En effet, la base de données de recensement XMLR n'enregistre que les familles dont au moins 2 garçons sont atteints de retard mentaux lié à l'X. Donc dans les cas où un seul enfant garçon est atteint et que la mutation est portée par une femme ascendante, cette famille n'est pas enregistrée.

La seconde difficulté pour estimer la prévalence de cette pathologie est l'existence des mutations *de novo*. Celles-ci semblent d'ailleurs être un évènement fréquent si l'on considère que 2 des 16 patients décrits dans la littérature présentent une mutation *de novo* (soit 12.5%). Or, avec ce type de mutation, il est très difficile de savoir si elle est responsable de la pathologie. Toutefois les données publiées tendent à montrer que la fréquence des mutations du SLC6A8 est 3 à 5 fois plus importante que celle des autres gènes responsables des retards mentaux liés au chromosome X<sup>160</sup>.

### **1.2.6 Pronostic du déficit en transporteur de la créatine**

Les déficits en transporteur de la créatine font l'objet d'une découverte récente depuis le début des années 2000. De plus, étant donné qu'aucune thérapie efficace n'a pu être mise en place pour aider les patients, ce que je développerai dans la partie 1.3, le pronostic à long terme est inconnu. Néanmoins, des patients âgés de plus de 40 ans ont été décrits dans la littérature<sup>160</sup>.

### **1.2.7 Diagnostic différentiel du déficit en transporteur de la créatine**

Le dosage concomitant de la créatine, de la créatinine et de l'acide guanidinoacétique permet le diagnostic différentiel des déficits héréditaires de synthèse de la créatine du déficit en transporteur.

D'autres affections cérébrales peuvent aboutir à un déficit secondaire en créatine. Il s'agit, entre autre, des accidents vasculaires cérébraux, de l'hyperammoniémie retrouvée dans les défauts du cycle de l'urée<sup>161</sup> ou l'atrophie gyrée de la rétine<sup>162</sup>.

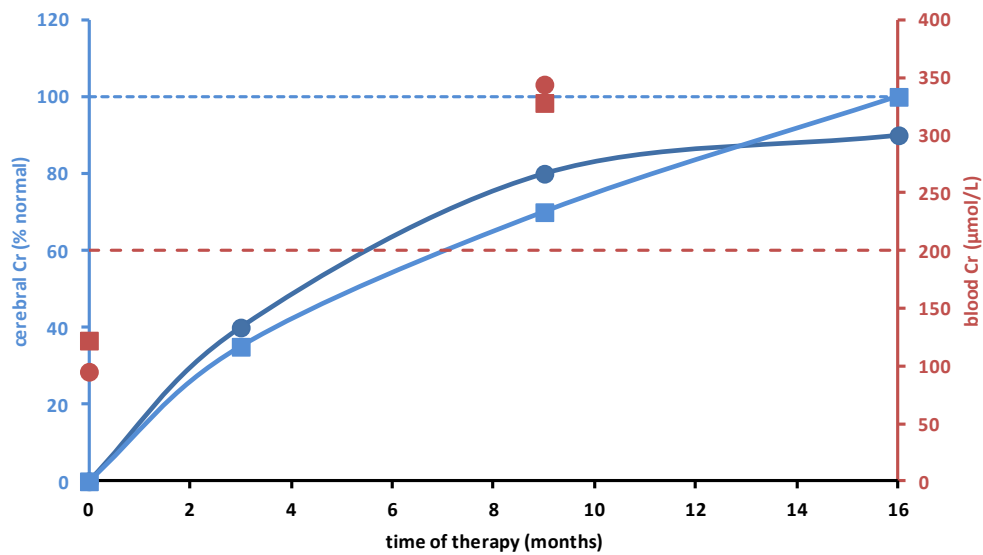
## **1.3 Stratégies thérapeutiques développées afin de traiter le déficit cérébral en transporteur de la créatine**

Face aux conséquences handicapantes du déficit cérébral en créatine dû à un défaut de transport de la créatine, les cliniciens ont développé trois stratégies thérapeutiques afin de traiter les troubles.

### **1.3.1 Traitement par le monohydrate de créatine**

Tout d'abord, les cliniciens ont adopté les traitements efficaces utilisés chez les patients atteints de déficit de biosynthèse en créatine. Ainsi, la première stratégie mise en place a été de proposer aux patients une supplémentation en créatine, l'acide aminé manquant.

Un apport en créatine dosé à 400 mg/kg/jour a montré des effets cliniques bénéfiques chez deux patientes hétérozygotes (Figure 25): amélioration des compétences non verbales (perception visuelle, mouvements fins) et verbales (parole spontanée, utilisation adéquate d'un langage cohérent et intelligible), amélioration du comportement socio-émotionnel et du contrôle de l'humeur. Ces effets ont été associés à une augmentation de la créatine cérébrale lors du suivi des patientes par spectroscopie RMN du proton <sup>163</sup>.



**Figure 25 : Effet d'un traitement au monohydrate de créatine chez deux patientes hétérozygotes**

*Evolution des paramètres biologiques de 2 patientes (rond = patiente 1, carré = patiente 2). Ce graphe montre une augmentation de la créatine cérébrale au cours du temps de traitement par la créatine qui atteint les valeurs contrôles (ligne pointillée bleue) en 16 mois. En parallèle, on note une augmentation de la créatine plasmatique au cours du temps qui dépasse alors la limite supérieure de la concentration en créatine plasmatique (ligne pointillée rouge).*

*Figure adaptée de Bianchi et al. <sup>163</sup>*

En revanche, tous les autres essais menés depuis les années 2000 se sont révélés inefficaces. Les patients atteints du déficit en transporteur de la créatine ne répondent pas au traitement à la créatine à des doses de 250-750 mg/kg/jour pendant plusieurs mois. Aucune amélioration des symptômes cliniques neurocognitifs ni d'augmentation du signal de la créatine en <sup>1</sup>H-MRS n'ont pu être détectées <sup>80, 164-168</sup>. Cette inefficacité thérapeutique n'a pas pu être corrélée ni au sexe ou à l'âge des patients ni avec la quantité et l'importance des troubles, ni encore avec la durée du traitement.

En 2003, une hypothèse de passage cellulaire passif de très faible capacité au niveau du cerveau était avancée, sous réserve que la supplémentation en créatine soit continue sur une longue période. Ceci permettrait notamment que la concentration en créatine sérique atteigne une valeur cible <sup>169</sup>. Le dernier essai clinique publié récemment a permis d'infirmer cette hypothèse. En effet, l'équipe de Van de Kamp a réalisé un suivi de 9 garçons atteints du déficit en transporteur de la créatine sous supplémentation pendant 4 à 6 ans (monohydrate de créatine + L-arginine + glycine). Leurs observations, publiées cette année, montrent qu'il n'y a pas d'augmentation de la quantité de créatine au niveau du parenchyme cérébral pas plus qu'il n'y a d'impacts positifs sur le développement cognitif de ces enfants. Au niveau biologique, ils détectent dans les urines une augmentation encore plus forte du ratio de créatine/créatinine (signe que la créatine absorbée est

éliminée dans les urines) et de l'acide guanidinoacétique. Toutefois, un point intéressant évoque une amélioration de la fonction musculaire, les enfants gagnant en poids et en taille grâce au traitement par comparaison avec des patients du même âge mais non supplémentés en créatine <sup>170</sup>.

Enfin, en 2002, il était évoqué que la supplémentation en créatine pouvait avoir un effet bénéfique à long terme chez les patients en limitant les complications qui apparaissent à l'âge adulte, à savoir les myopathies et les dysfonctions intestinales. Toutefois, cela n'avait pas été démontré en raison d'une durée trop courte du suivi des patients <sup>149</sup>. En revanche, de nouvelles données non publiées indiquent que la supplémentation en créatine chez 4 adultes masculins présentant un déficit en transporteur de la créatine conduit à des effets très positifs. Bien qu'elle ne soit pas en mesure de traiter les troubles neurocognitifs, une amélioration notable est observée sur le comportement général des patients, la constipation sévère ainsi que l'incontinence urinaire dont ils souffrent à un âge plus avancé <sup>170</sup>.

### **1.3.2 Acides aminés précurseurs de la synthèse de la créatine**

Devant les résultats décevants de la supplémentation en monohydrate de créatine, les cliniciens ont pris le parti d'administrer les acides aminés précurseurs de la voie de biosynthèse de la créatine. En effet, si la créatine ne peut pas franchir les membranes cellulaires du fait du défaut en transporteur spécifique, ces acides aminés relevant du transport par d'autres systèmes pourraient pénétrer dans le parenchyme cérébral et, tel que cela a été évoqué au début de cette introduction, ils seraient pris en charge par les enzymes en charge de la synthèse *in situ* de créatine intracérébrale.

Deux acides aminés ont été utilisés : la L-arginine à la dose de 300-450 mg/kg/jour et la L-glycine à la dose de 200 mg/kg/jour. Deux études publiées n'ont conduit à aucune amélioration de la créatine cérébrale : l'une portait sur 4 patients traités pendant 6 mois <sup>171</sup> et l'autre sur 9 garçons âgés de 8 mois à 10 ans et traités pendant 4 à 6 ans en combiné avec la créatine <sup>170</sup>. Deux autres études, au contraire, montrent des améliorations des capacités intellectuelles ainsi que des troubles du comportement et des épilepsies. Il est cependant à noter que malgré l'amélioration des IRM indiquant une augmentation de la créatine cérébrale, cette évolution reste discrète et bien loin de la normale <sup>172, 173</sup>.

Ces données indiquent que l'efficacité d'un traitement par les acides aminés précurseurs de la synthèse de la créatine reste très controversée dans le cadre du traitement des patients atteints de

déficit en transport de la créatine. Ceci s'explique par l'hypothèse des échanges cellulaires nécessaires lors de la synthèse cérébrale de créatine et qui repose sur la fonctionnalité du transporteur de la créatine.

### **1.3.3 Dérivés de la créatine**

Des dérivés de la créatine sont maintenant envisagés dans le cadre du traitement des patients. A ce jour, quatre catégories de dérivés de la créatine sont en cours d'évaluation. Au vu des informations réglementaires nécessaires à l'établissement d'une étude clinique, seuls deux composés ont pu être évalués en clinique chez les patients, comme nous le verrons par la suite.

#### **1.3.3.1 Complexes créatine-magnésium (Cr-Mg-CPLX) et phosphocréatine-magnésium (PCr-Mg-CPLX)**

Les complexes créatine-magnésium et phosphocréatine-magnésium présentent l'avantage de libérer *in vivo*, lors de leur décomplexation la créatine ou la phosphocréatine respectivement, qui sont les molécules d'intérêt dans ces essais thérapeutiques puisqu'elles représentent la réserve énergétique cellulaire.

*In vitro*, le Cr-Mg-CPLX et le PCr-Mg-CPLX conduisent à l'augmentation de la créatine dans des coupes d'hippocampe de souris après 3 heures d'incubation. Ceci n'est pas modifié en présence de conditions expérimentales inhibitrices du transport de la créatine (acide guanidinopropionique ou milieu sans chlorures)<sup>96, 174</sup>. D'autre part, après une injection intra-péritonéale dans un modèle d'attaque cérébrale chez la souris, le PCr-Mg-CPLX est capable de gagner le cerveau pour y exercer des fonctions neuroprotectrices<sup>175</sup>. Cet effet protecteur étant directement proportionnel à l'augmentation de la concentration en créatine dans le cerveau<sup>96</sup>.

### 1.3.3.2 Esters benzyliques et éthyliques de créatine

Deux esters de créatine ont été étudiés : l'ester benzylique de créatine et l'ester éthylique de créatine. Les esters de créatine sont plus lipophiles et ils auraient de ce fait une meilleure perméabilité membranaire. Leur efficacité thérapeutique reposerait sur un passage passif à travers les membranes cellulaires et notamment la barrière hémato-encéphalique ce qui permettrait un passage dans le cerveau de ces composés. Ils seraient ensuite pris en charge par les estérases cellulaires cérébrales afin de libérer la créatine au niveau des cellules cibles.

L'ester benzylique de créatine conduit à l'augmentation de la créatine dans des coupes d'hippocampe de souris, y compris après un pré-traitement à l'acide guanidinopropionique, tout comme le PCr-Mg-CPLX. Par contre, ce composé est très sensible à l'hydrolyse puisque plus de 50% du produit est converti spontanément en créatinine en 45 minutes à 37°C<sup>174</sup>. L'ester éthylique de créatine induit l'augmentation de la créatine et de la phosphocréatine dans les coupes d'hippocampe de souris après 3 heures d'incubation y compris en l'absence de chlore<sup>176</sup>. De plus, ce composé est capable de franchir les membranes cellulaires des fibroblastes de patients atteints de déficit en transporteur de la créatine<sup>177</sup>. Il a été également montré que l'ester éthylique de créatine peut être pris en charge par la créatine kinase et conduire à une hydrolyse d'ATP via la phosphorylation en ester éthylique de phosphocréatine. Ceci se produit à une température optimale de 35-37°C et à pH=7.5<sup>178</sup>. Ce composé apparaît donc comme un bon médicament candidat pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine. Une étude clinique a été menée dans ce contexte, sachant que l'ester éthylique de créatine est un produit commercial qui est apparu sur le marché des suppléments alimentaires utilisés par les sportifs pour augmenter leurs performances. Un traitement de 12 mois a été entrepris chez 4 patients masculins souffrant du déficit en transporteur de la créatine à la dose de 0.4 mg/kg/jour en 2 prises par voie orale<sup>177</sup>. Une bonne tolérance et une bonne observance du traitement ont été constatées et aucun effet indésirable n'a été rapporté. En revanche, à l'issue de la thérapie, aucune amélioration de l'IRM ou des troubles neuropsychologiques ni d'augmentation du pool de créatine cérébral n'a pu être détectées. En outre, le ratio urinaire créatine/créatinine est augmenté, signe qu'il y a eu une augmentation de la créatine dans le plasma qui est rapidement éliminée dans les urines. Deux explications sont avancées : étant administré par voie orale, l'ester éthylique de créatine subit une hydrolyse acide dans le compartiment gastrique, ce qui conduit à la dégradation en créatinine et explique la concentration sérique élevée en créatinine observée chez les sujets de l'étude. Enfin, il est important de garder à l'esprit que ces esters de créatine sont dégradés *in vivo* par les estérases plasmatiques, ils ne peuvent donc pas être



administrés tels quels <sup>179</sup>. Ceci explique notamment l'absence d'amélioration observée lors du traitement par l'ester éthylique de créatine. Celui-ci est rapidement converti en alcool éthylique et créatine qui ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique en l'absence du transporteur.

De façon surprenante et très contradictoire, une étude précédente <sup>180</sup> avait démontré les effets cognitifs bénéfiques d'une supplémentation en ester éthylique de créatine dans une population de 34 jeunes de 18 à 24 ans versus placebo (maltodextrine). Ces patients avaient été sélectionnés de sorte qu'ils ne présentaient aucune pathologie. Ces sujets avaient été amenés à réaliser des tests cognitifs sur ordinateur avant et après une supplémentation de 15 jours à la dose de 5 g par jour, soit une dose 180 fois supérieure à celle utilisée dans l'étude menée sur la cohorte de patients. Aucun problème d'observance ni d'effets secondaire n'avaient été rapportés. Dans ce contexte, il semble que l'ester éthylique de créatine augmente les performances intellectuelles dans plusieurs domaines notamment le temps de réaction. De plus, les auteurs ont noté une amélioration du processus cognitif global qui inclue l'élimination de stimulus, la pensée critique, la déduction logique ainsi que la mémoire de travail. Toutefois, il semble que dans les tests qui demandent moins de processus cognitif, l'intérêt de la supplémentation en l'ester éthylique de créatine soit plus limité. Ceci tend à indiquer que l'apport de la créatine aide plutôt dans la réalisation de tâches cognitives complexes <sup>180</sup>.

### 1.3.3.3 Dérivés acides aminés de créatine

La préparation de ces composés se fait par guanidinylation des peptides sarcosyl ou par acylation du p-toluène sulfonate de créatine. Les auteurs ont ainsi créé une chimiothèque de 15 composés qui présentent (pour 14 d'entre eux) une fonction guanidino de la créatine libre et sa fonction acide carboxylique engagée dans une liaison peptidique avec un autre acide aminé. Ils ont obtenus ainsi des dérivés de la glycine (N=5), des dérivés de la phénylalanine (N=3), des dérivés de la tyrosine (N=2), un dérivé du GABA ainsi que des chaînes plus complexes à 2 ou 3 acides aminés (brevet US 2011/0269986).

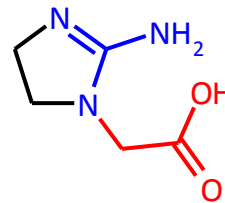
Un dérivé de la glycine (Cr-Gly-OEt), un dérivé de la phénylalanine (Cr-Phe-NH<sub>2</sub>), un dérivé de la tyrosine (Cr-Tyr-NH<sub>2</sub>) et un dérivé du GABA (Cr-GABA-OEt) ont été étudiés *in vivo* pour leurs capacités neuroprotectrices. Dans un modèle animal souris d'hypoxie induite par NaNO<sub>2</sub>, Cr-Tyr-NH<sub>2</sub> et Cr-Gly-OEt augmentent la durée de vie de l'animal d'un facteur 2 par rapport au contrôle constitué du solvant seul. Dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, un traitement de 48h avec chacun des

4 dérivés de la créatine conduit à une diminution de l'aire de la surface cérébrale nécrosée. Ces composés semblent donc être en mesure de gagner le système nerveux central et d'y exercer des fonctions neuroprotectrices<sup>181</sup>.

#### 1.3.3.4 Cyclocréatine : acide 2-imino-1-imidazolidineacétique

La cyclocréatine (ou acide 2-imino-1-imidazolidineacétique) est un dérivé cyclisé commercial de la créatine (Figure 26).

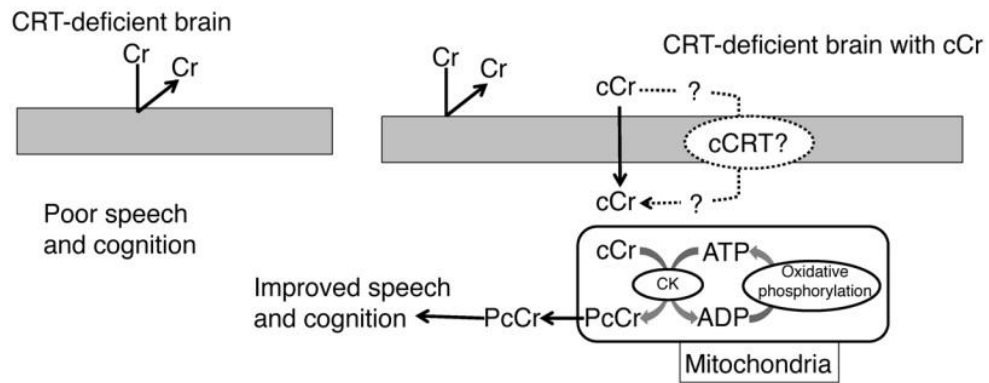
Figure 26 : Structure chimique de la cyclocréatine



Ce composé a été évalué sur un modèle *in vivo* de souris déficiente pour le SLC6A8, transport spécifique de la créatine. Ce modèle animal présente une diminution de la créatine dans les zones subcorticales et le cortex, associée à une augmentation de la créatine dans les urines<sup>182</sup>. Ceci est très similaire à ce qui est observé en pathologie humaine.

Après un traitement de 9 semaines à la cyclocréatine, celle-ci est détectée dans le cerveau des souris (Figure 27)<sup>183</sup>. Une augmentation du signal en phosphocréatine ainsi qu'en phosphocyclocréatine sont détectées par <sup>31</sup>P-MRS. De plus, les tests comportementaux réalisés sur les souris déficientes traitées par la cyclocréatine montrent une absence de différence par rapport aux contrôles, contrairement aux souris déficientes traitées par la créatine ou le placebo.

D'après les travaux publiés à ce jour, il semble donc que ce soit la cyclocréatine qui soit le plus proche d'un futur médicament candidat en termes d'efficacité pharmacologique et de stabilité dans les fluides biologiques.



**Figure 27 : Effet pharmacologique de la cyclocréatine dans le cadre du déficit en transporteur de la créatine**

*La cyclocréatine (cCr) n'étant pas dépendante de la fonctionnalité du transporteur de la créatine, elle pénètre le système nerveux central et réverse les troubles neurocognitifs induits par le déficit en SLC6A8 dans un modèle in vivo pathologique.*

*Extrait de Kurosawa et al. <sup>183</sup>*

## **1.4 Défi de l'administration des médicaments au niveau du système nerveux central**

Au vu du contexte physiopathologique du déficit en transporteur de la créatine, il apparaît clairement que le traitement des troubles neuro-cognitifs doit passer par la restauration du pool de créatine au niveau cérébral et plus spécifiquement du pool de phosphocréatine dans les réserves neuronales. La restauration du pool de créatine dans les déficits en biosynthèse de la créatine n'a lieu qu'après plusieurs semaines de traitement journalier par la créatine. Il est donc évident qu'un traitement par voie intracérébrale ne peut être envisagé. La thérapie devra donc être possible par voie entérale ou par voie parentérale. Ce mode d'administration d'un médicament à visée système nerveux central pose un défi majeur.

En effet, dès les années 1885, Paul Ehrlich démontrait pendant son doctorat qu'il est impossible pour un colorant administré dans le sang (le bleu d'Evans) d'atteindre le cerveau. Son étudiant Edwin Goldmann en 1913 expliqua ces observations par l'existence d'une barrière imperméable entre le sang et le cerveau. Appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE), elle constitue un écueil majeur à l'entrée des médicaments dans le cerveau. Donc, lorsque l'objectif est d'administrer un traitement à visée système nerveux central via le plasma dans le but de traiter une maladie cérébrale, il est fondamental de bien comprendre la physiologie de la vasculature cérébrale et plus particulièrement celle, complexe, de la BHE qui protège le cerveau.

### **1.4.1 Physiologie de la vasculature cérébrale**

Le cerveau est un organe très vascularisé. Chacune des sous-structures cérébrales est alimentée par un système artériel et drainée par un système veineux, qui ne sera pas détaillé ici. Les artères carotidiennes internes et les artères vertébrales remontent vers le cerveau à partir de la crosse aortique et des artères sous-clavières. Elles donnent naissance aux artères cérébrales interne, moyenne et postérieure au niveau du polygone de Willis à la base du cerveau (Figure 28).

Les artères cérébrales circulent à la surface du cerveau puis plongent dans le cortex cérébral au niveau des espaces de Virchow et Robin en se ramifiant en artérioles pénétrantes puis en capillaires parenchymateux (Figure 29). Ces derniers définissent la microvasculature cérébrale<sup>184, 185</sup>.

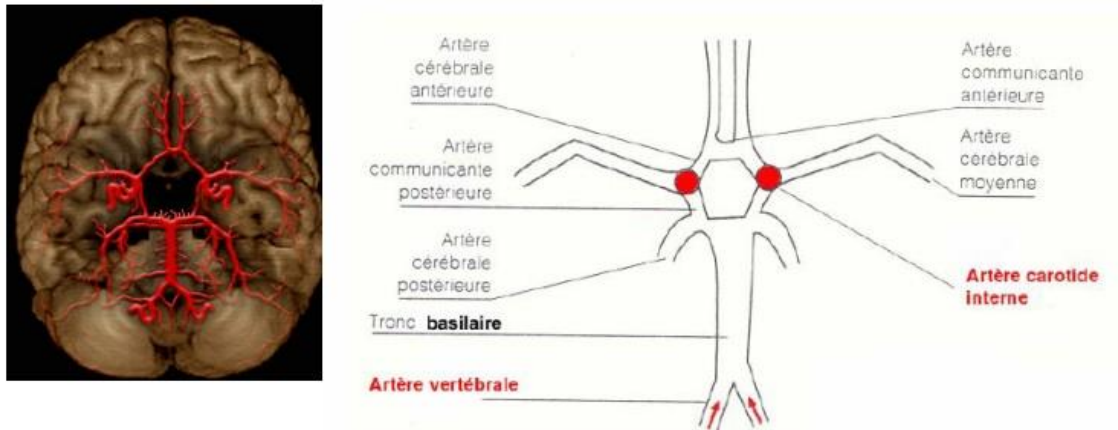
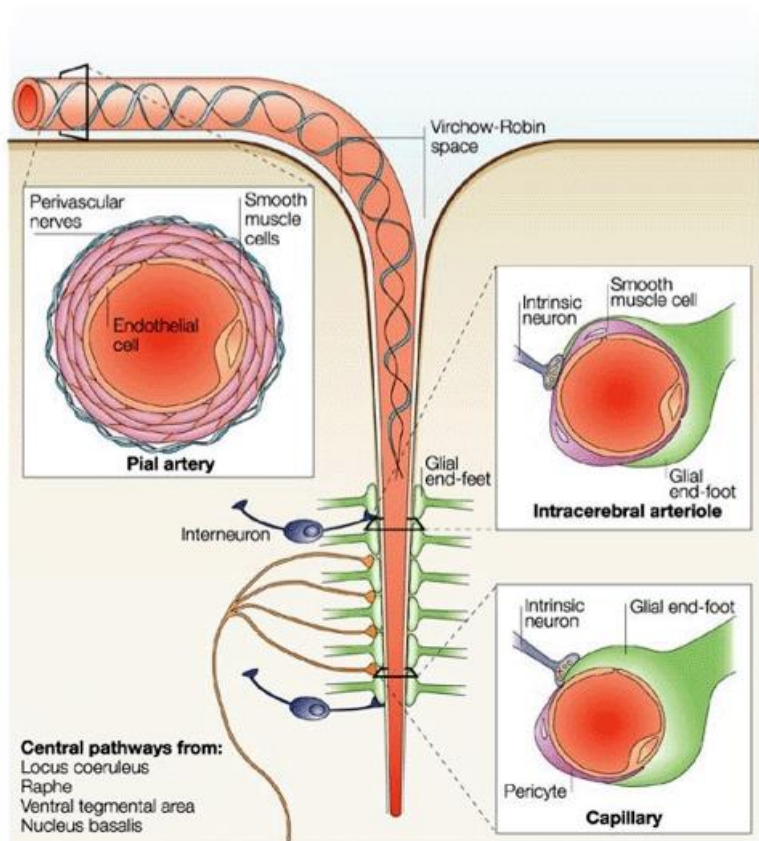


Figure 28 : Naissance de l'irrigation cérébrale

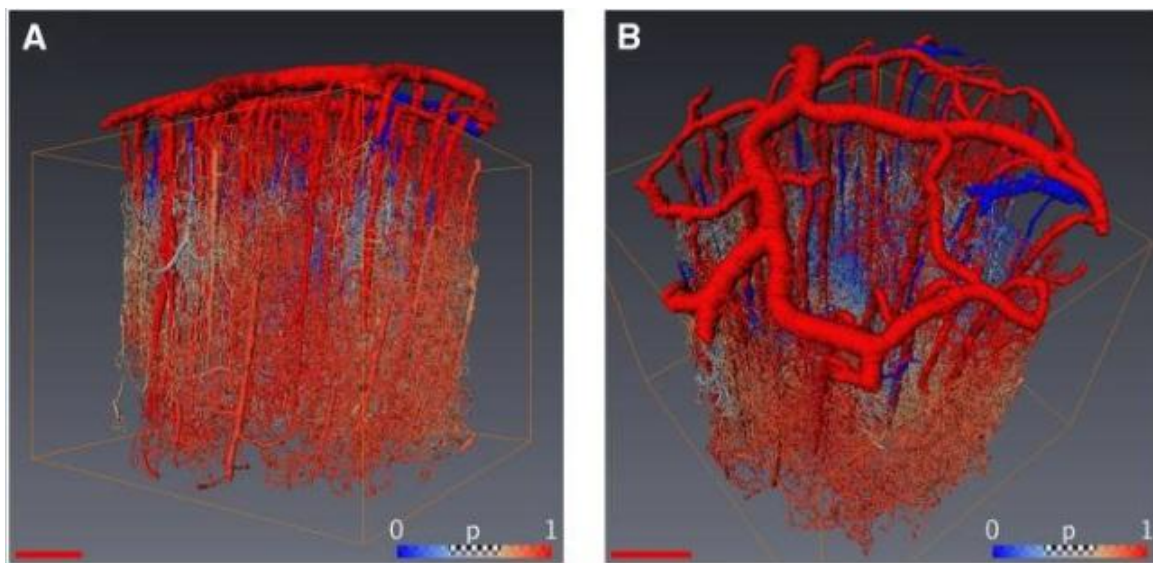


Nature Reviews | Neuroscience

Figure 29 : Microvasculature cérébrale<sup>186</sup>

### 1.4.2 La microvasculature cérébrale et l'unité neurovasculaire

La surface représentée par la microvasculature cérébrale correspond à 150 - 200 cm<sup>2</sup>/g de tissu, soit à peu près 12 à 18 m<sup>2</sup> pour un adulte <sup>187</sup>. Cette microvasculature est constituée d'un réseau dense de vaisseaux intercommunicants qui présentent un débit sanguin élevé et très hétérogène. Cette hétérogénéité repose sur les besoins en oxygène considérables mais fluctuants du tissu neuronal (Figure 30).



**Figure 30 : Modélisation des débits sanguins de la vasculature cérébrale**

*Sur cette modélisation, apparaît clairement la variabilité des débits sanguins cérébraux. En rouge : les débits élevés (capillaires, artérioles, artères) et en bleu les débits plus faibles (veinules, veines). Cette figure est tirée de Guibert et al. <sup>185</sup>*

La structure de la microvasculature cérébrale est unique par rapport aux autres organes. Les cellules endothéliales et les péricytes reposent sur une lame basale qui contient les protéines de la matrice extracellulaire et notamment le collagène de type IV, les protéoglycannes (héparanes sulfates), la laminine et la fibronectine <sup>188-190</sup>. La lame basale de l'endothélium cérébral est entourée par les pieds astrocytaires.

Les cellules endothéliales cérébrales présentent des propriétés structurales et fonctionnelles spécifiques. Ces cellules polarisées expriment un phénotype unique comparé aux autres endothélium et elle forment la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette BHE est décrite dans tout le cerveau à

l'exception des organes cérébro-ventriculaires où les capillaires sont fenestrés puisqu'ils sont impliqués dans le relargage et le transport des hormones synthétisées par la neurohypophyse. La BHE est constituée des quatre types cellulaires : cellules endothéliales, pieds astrocytaires, cellules microgliales, péricytes (Figure 31). C'est une barrière physique ou structurelle, métabolique et fonctionnelle qui est incluse dans une unité plus large appelée unité neurovasculaire et intégrant également les cellules neuronales.

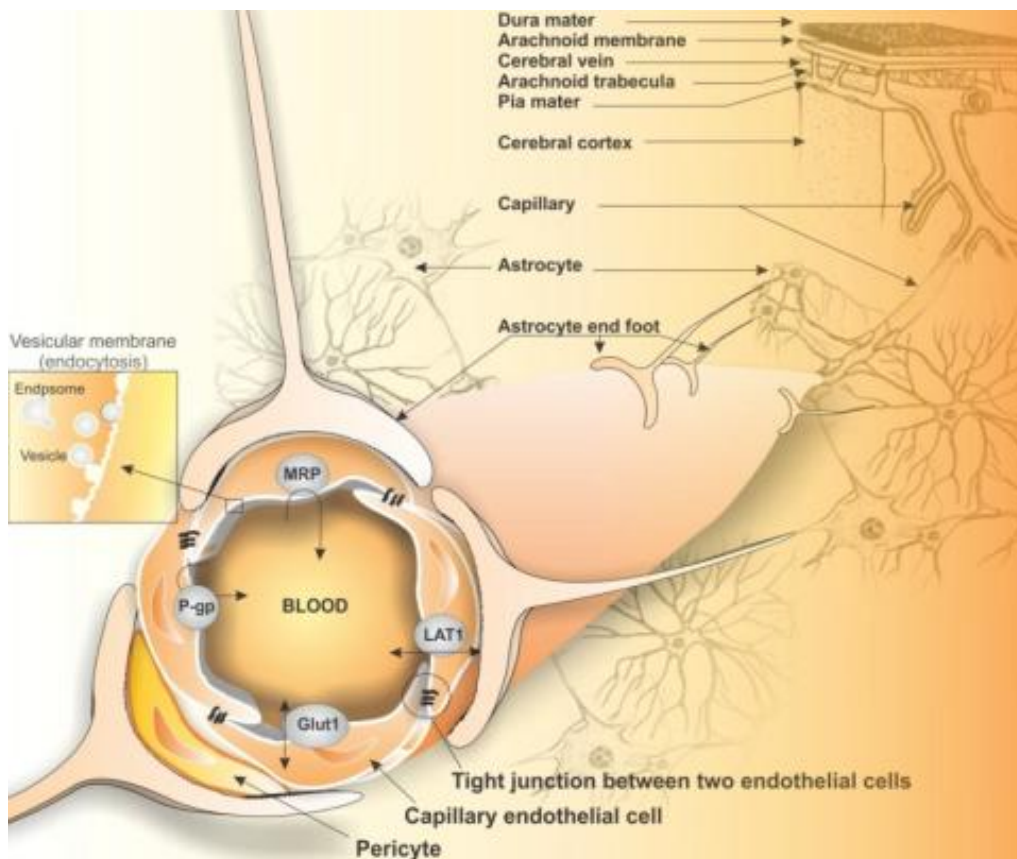
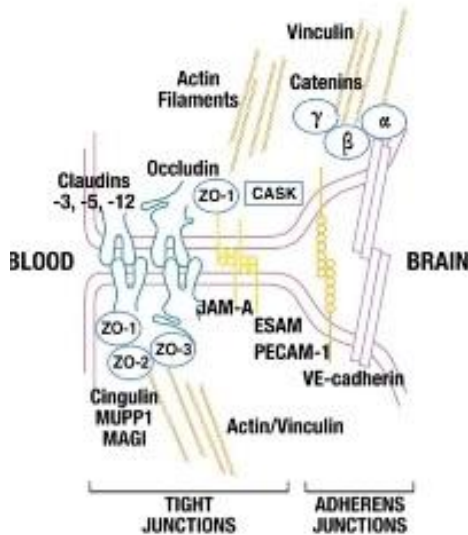


Figure 31 : Structure de la barrière hémato-encéphalique <sup>191</sup>

#### 1.4.2.1. La barrière hémato-encéphalique est une barrière structurelle

Les cellules endothéliales sont connectées entre elles par des complexes jonctionnels qui assurent l'intégrité de la BHE ainsi que sa très faible perméabilité <sup>191</sup> (Figure 32). En effet, l'organisation moléculaire des protéines de jonction les relie au cytosquelette d'actine et ceci forme une

membrane continue d'une très forte résistance électrique (1500 à 2000  $\Omega/\text{cm}^2$ ). Ces jonctions sont de trois types : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes.



**Figure 32 : Protéines de jonction exprimées par les cellules endothéliales**<sup>184</sup>

*Les protéines de jonctions serrées comprennent les occludines et les claudines et les molécules de jonctions adhérentes ou JAM. Les jonctions adhérentes sont constituées d'interactions fortes entre les cadhérines et les caténines. L'ensemble de ces protéines sont reliées au cytosquelette d'actine et contribuent à la très faible perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.*

Les jonctions serrées forment un réseau protéique complexe au niveau luminal des cellules endothéliales. Celui-ci est constitué de trois protéines principales (les claudines, les occludines et les molécules de jonctions adhérentes ou JAM) qui interagissent avec des protéines accessoires (notamment les zonules occlusives ou ZO et les cingulines) qui sont elles-mêmes en association avec le cytosquelette d'actine. Ces jonctions serrées permettent ainsi de contrer le passage paracellulaire des molécules<sup>184</sup>.

L'attachement des cellules entre elles ainsi qu'à la matrice extra-cellulaire est assuré par les jonctions adhérentes. Ceci est médié par les interactions homophiliques entre les domaines extracellulaires des protéines membranaires cadhérines exprimées à la surface des cellules adjacentes. Ces cadhérines sont liées au cytosquelette d'actine via des protéines intermédiaires : les caténines.

Enfin, les jonctions communicantes médient le passage de signaux chimiques ou électriques entre les cellules partenaires.



### 1.4.2.2. La barrière hémato-encéphalique est une barrière fonctionnelle

La BHE permet le passage passif de l'oxygène, du dioxyde de carbone ainsi que de certaines petites molécules lipophiles mais elle est imperméable aux molécules hydrophiles (comme le glucose ou les acides aminés), qui sont pourtant fondamentales à la fonction des cellules cérébrales. Comme elle participe au maintien de l'homéostasie cérébrale, la BHE est en charge de la fine régulation du transport non seulement des nutriments, de l'eau et des cations univalents ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) mais également d'autres molécules vers le cerveau.

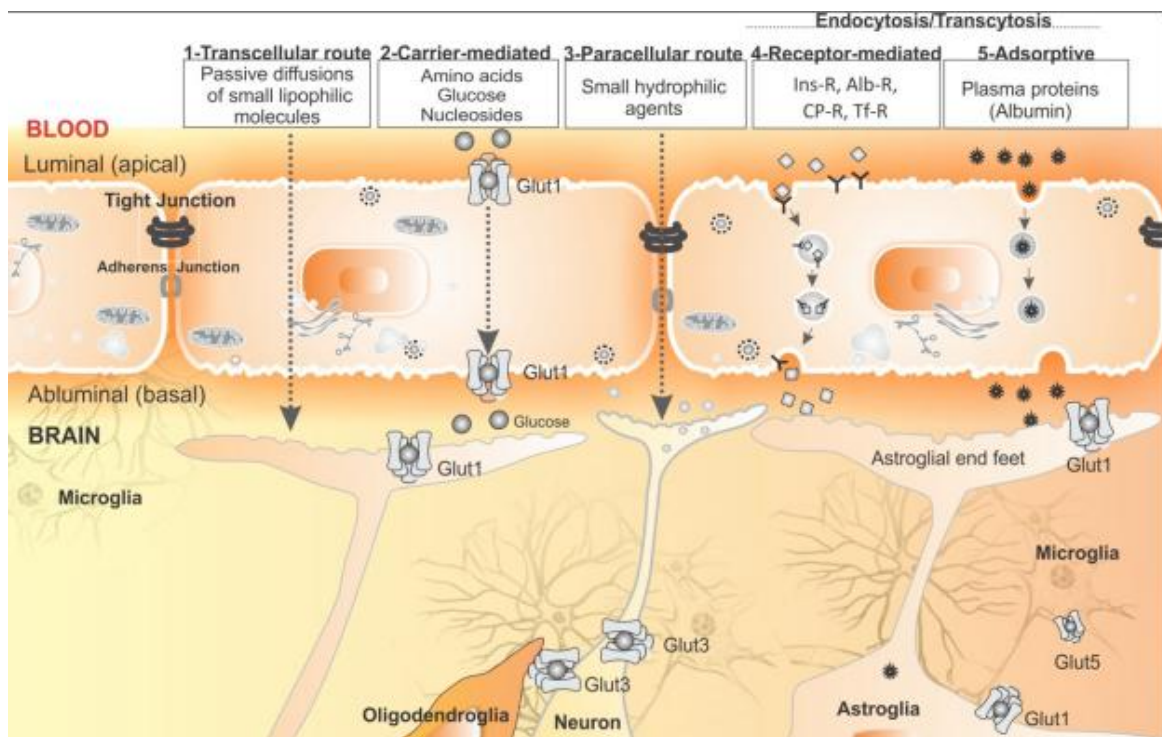


Figure 33 : Types de transport à travers la barrière hémato-encéphalique <sup>191</sup>

Il existe cinq types de transport possibles au niveau de la BHE (Figure 33). Le **passage transcellulaire** ou la diffusion passive dépend uniquement des paramètres physico-chimiques des molécules. Dans ce cas, le poids moléculaire, la lipophilicité, le pKa, la capacité des molécules à former des liaisons hydrogènes vont conditionner le franchissement de la monocouche endothéliale. Pour des composés hydrophiles de très petite taille, il est possible d'envisager un **passage paracellulaire**.

Le passage par **endocytose/transcytose** médié par un récepteur reconnaissant un ligand spécifique ou par un mécanisme dit adsorptif lorsque les molécules reconnaissent le glycolemme ou les phospholipides chargés négativement à la surface des cellules.

Dans les conditions pathologiques, un troisième mécanisme d'endocytose peut être observé lorsque des macromolécules sont internalisées sans liaison à la surface cellulaire.

Enfin, les cellules endothéliales expriment divers transporteurs spécifiques qui permettent un **transport facilité** des molécules. C'est le cas notamment du glucose qui pénètre dans le cerveau grâce à GLUT1. Ces transporteurs peuvent être exprimés à la face luminale et/ou abluminale des cellules endothéliales. Ils peuvent être en charge d'un transport uni ou bidirectionnel et donc permettre l'influx c'est-à-dire le passage des molécules du sang vers le cerveau et/ou l'efflux c'est-à-dire le passage des molécules du cerveau vers le sang. Il existe un très grand nombre de transporteurs à spécificité de substrat plus ou moins élevée exprimés à la surface de la BHE<sup>187</sup>. Deux familles principales sont décrites : les transporteurs SLC et les transporteurs ATP-binding cassette (ABC). La famille des transporteurs SLC est une famille très diverse dont les principaux représentants sont le transporteur GLUT1 ou SLC2A1 (glucose), la famille SLC7 (CAT, transporteurs d'acides aminés cationiques et LAT, transport d'acides aminés neutres), des membres de la famille SLC38 et SLC1 (transport des acides aminés) et SLC6 (spécifiques du transport de la glycine – SLC6A9 – ou de la taurine – SLC6A6 -) ainsi que des transporteurs d'anions organiques (OAT et OATP)<sup>187</sup>. Les composés lipophiles sont capables de franchir la BHE par diffusion passive mais il a été montré que leur taux d'entrée peut être largement contrebalancé par une prise en charge par les transporteurs d'efflux de la famille ABC. Les principales protéines sont la P-glycoprotéine (P-gp ou ABCB1), la « Breast cancer resistance protein » (BCRP, ABCG2) ainsi que les « multi drug resistance-associated proteins » (MRPs, ABCC1, 2, 4, 5)<sup>187</sup>.

De plus, les transporteurs sont également impliqués dans l'inactivation et la recapture des neurotransmetteurs.

Sur la Figure 34, il est intéressant de noter la présence du transporteur de la créatine CRT. Bien qu'il soit positionné à l'interface entre la cellule endothéliale et le pied astrocytaire, il est indiqué dans le texte des auteurs que ce transporteur est un transporteur d'influx<sup>191</sup>. La localisation du transporteur de la créatine est encore controversée. Un autre point intéressant est la représentation du transporteur de la taurine (SLC6A6) proche en termes de structure et de fonction. Il y est décrit comme étant un transporteur d'efflux luminal et abluminal<sup>187, 191</sup>, ce qui est donc tout à fait envisageable pour le transporteur de la créatine.

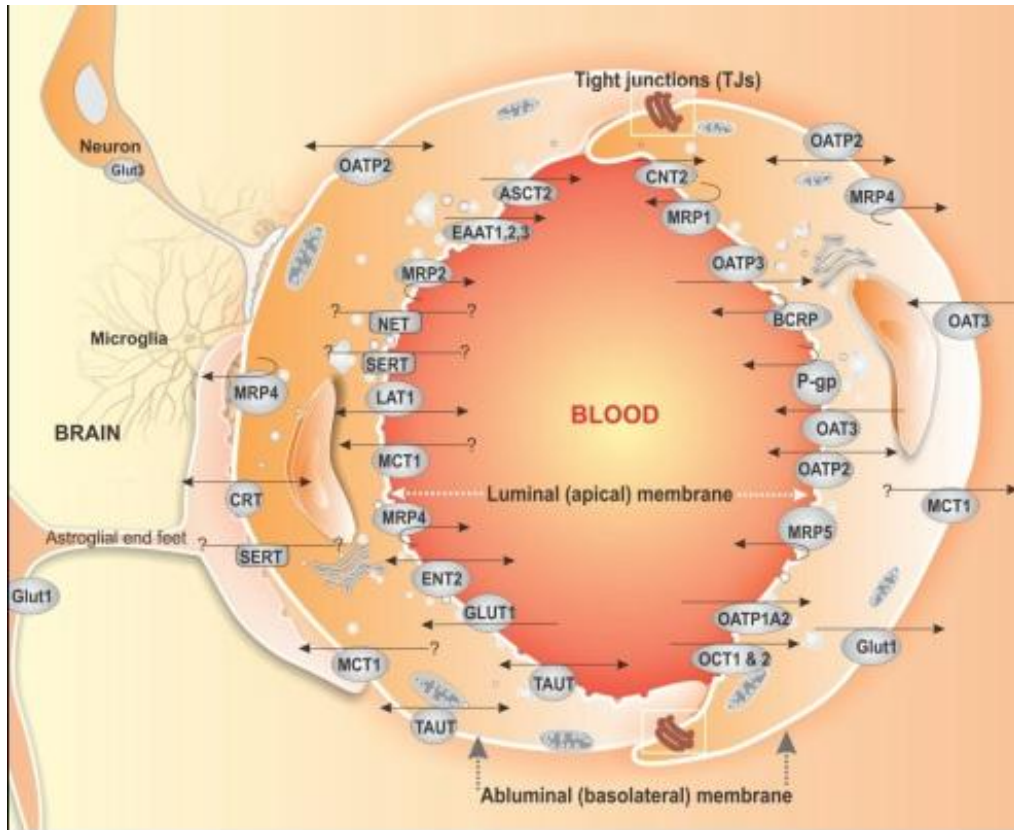


Figure 34 : Transporteurs à la barrière hémato-encéphalique <sup>191</sup>

A ce jour, seuls les transporteurs d'efflux et surtout les pompes d'efflux type P-glycoprotéine (ABCB1) sont pris en compte dans le développement des médicaments puisqu'ils sont responsables de l'efflux des molécules des organes cibles et donc de la perte d'efficacité des thérapies. Ainsi un consortium d'universitaires, d'industriels pharmaceutiques et de représentants de l'agence réglementaire américaine Food and Drug Administration appuie l'importance de prendre en compte les transporteurs membranaires dans l'évaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique des candidats médicaments et proposent des arbres décisionnels pour aider au développement <sup>192</sup>.

### 1.4.2.3. La barrière hémato-encéphalique est une barrière métabolique

Les cellules endothéliales expriment différents systèmes responsables du métabolisme des médicaments ou des prodrogues notamment les enzymes de phase I et de phase II du métabolisme <sup>193-197</sup>. Un des exemples les plus classiques est le transport de la dopamine pour le traitement de la maladie de Parkinson. La dopamine ne peut pas être captée directement par les

cellules endothéliales. En revanche, la L-dopa est substrat d'un transporteur d'acides aminés qui permet son entrée dans la cellule endothéliale. Elle y est alors convertie par la DOPA-decarboxylase en dopamine, un système enzymatique actif dans ce type cellulaire <sup>198</sup>.

Les différentes caractéristiques de l'endothélium vasculaire cérébral sont assurées par les interactions avec les types cellulaires connexes et tout particulièrement par les interactions physiques et paracrines avec les astrocytes et les péricytes <sup>198-201</sup>. Les astrocytes enveloppent plus de 99% de l'endothélium BHE <sup>202</sup>. Ils sont impliqués dans l'expression des jonctions serrées, l'expression et la polarisation des transporteurs et des enzymes <sup>203</sup>. Il a été montré que ce sont les facteurs relargués par les astrocytes qui participent au phénotype endothélial spécifique et à sa fonctionnalité en termes de perméabilité et de transport <sup>191</sup>. *In vitro*, les facteurs astrocytaires TGF $\beta$ , GDNF,  $\beta$ FGF et l'angiopoïétine 1 peuvent induire le phénotype de BHE chez des cellules endothéliales. Les astrocytes interviennent également dans le contrôle du flux sanguin cérébral. De même, les péricytes participent aux propriétés de barrière des cellules endothéliales ainsi qu'au développement de la matrice extra-cellulaire <sup>198, 201, 204</sup>. Ils entourent 32% de la surface des capillaires cérébraux <sup>205, 206</sup>.

Les travaux menés ces dernières années sur les interactions cellulaires entre les différentes entités pré-citées (cellules endothéliales, astrocytes, péricytes, membrane basale) ainsi qu'avec les neurones sont à l'origine du concept d'unité neurovasculaire. Celle-ci est au cœur de la compréhension de la physiopathologie de nombreuses maladies cérébrales comme les hémorragies, les infections ou les processus inflammatoires <sup>184</sup>.

Les communications cellulaires au niveau de la BHE fait du transport des molécules vers le cerveau un processus contrôlé et très sélectif. La BHE reste donc à ce jour un obstacle majeur à l'entrée des thérapies dans le cerveau. La BHE empêche ainsi l'entrée d'environ 100% des neurothérapies de grande taille et 98% des petites molécules <sup>207</sup>. De nombreuses stratégies pour contourner cette protection ont été mises en œuvre ces dernières années. Quelques unes sont décrites ci-après et leur pertinence a été évaluée au regard de la problématique soulevée dans le cadre de cette thèse : le développement de prodrogues de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine.

### **1.4.3 Les stratégies exploitées pour contourner la BHE**

#### **1.4.3.1 Injection intra-cérébrale**

Tout d'abord, nous pouvons considérer les injections intra-cérébrales. Deux possibilités s'offrent aux cliniciens : l'injection dans le liquide céphalo-rachidien (injection intra-thécale) ou dans les ventricules cérébraux (injection intra-ventriculaire). Ces administrations sont utilisées actuellement dans des contextes pathologiques très particuliers comme les anesthésiques (lidocaïne et dérivés), le traitement de la douleur (dérivés morphiniques), le traitement de la spasticité chez des patients atteints de sclérose en plaque (baclofène) ou encore la chimiothérapie par méthotrexate dans le cadre des lymphomes<sup>208-210</sup>. Une autre possibilité est la voie qui suit les nerfs olfactifs et trigéminaux innervant la cavité nasale, ce qui permet une communication directe avec le cerveau<sup>211</sup>.

Ces voies d'administration intra-cérébrales qui permettent d'éviter la BHE ne peuvent pas être considérées dans notre contexte pathologique pour deux raisons. La première repose sur le peu de connaissances sur la diffusion cérébrale à partir du point d'injection et la seconde raison est liée au caractère traumatisant de ces voies d'administration pour le patient.

#### **1.4.3.2 Rupture de l'intégrité de la BHE**

Trois autres approches exploitent une rupture de l'intégrité de la BHE par ouverture transitoire des jonctions serrées : les modulateurs des jonctions serrées, l'ouverture osmotique et l'utilisation du couplage ultrasons et microbulles.

##### **1.4.3.2.1 Modulateurs des jonctions serrées**

Les modulateurs des jonctions serrées dérivent du criblage à haut débit et de la chimie combinatoire qui ont permis de sélectionner des séries de substances ayant pour cible des peptides exprimés aux jonctions serrées ou adhérentes. Ainsi, les plus connus sont les dérivés des entérotoxines des bactéries *Vibrio cholerae* ou *Clostridium perfringens* via les toxines pour les zonula occludens ou les

vasodilatateurs dérivés de la bradykinine qui augmentent la concentration en ions calcium libres dans la cellule, ce qui active le complexe actine-myosine et distend les jonctions serrées. Ces derniers ont notamment été évalués dans un modèle de gliome de rat où ils favorisent la pénétration des anticancéreux dans le cerveau.

#### **1.4.3.2.2. Ouverture osmotique**

L'ouverture osmotique repose sur l'administration intra-carotidienne de solutions hyperosmolaires (mannitol ou arabinose). La différence de pression osmotique modifie les flux d'eau dans les cellules. Ce procédé semble intéressant pour augmenter la perméabilité des anticancéreux dans le cerveau <sup>212</sup>.

#### **1.4.3.2.3 Couplage des ultrasons et des microbulles**

Enfin, l'utilisation des ultrasons couplés à l'injection de microbulles, par exemple, des microbulles chargées d'un gaz lourd, l'hexafluorure de soufre Sonovue® montre des résultats intéressants en termes d'ouverture transitoire de la BHE <sup>213, 214</sup>. Néanmoins, à l'heure actuelle, l'ouverture de la BHE dans ces conditions n'est pas encore un processus parfaitement contrôlé, bien que cela soit pris en compte <sup>215</sup>. Il existe notamment deux points cruciaux : il faut limiter le risque de faire pénétrer des molécules toxiques pour le cerveau et il faudrait pouvoir maîtriser la fenêtre temporelle d'ouverture au pic de concentration plasmatique de l'agent thérapeutique que l'on veut faire pénétrer. Cette approche ne sera pas considérée dans le cadre de cette thèse.

#### **1.4.3.3 Exploiter les caractéristiques structurales et fonctionnelles**

Une dernière approche pour contourner la BHE est d'exploiter ses caractéristiques structurales et fonctionnelles. On peut lister entre autres : l'utilisation d'inhibiteurs des pompes d'efflux pour limiter l'efflux des molécules ; l'augmentation de la lipophilicité des molécules ou la vectorisation par une reconnaissance ligand/récepteur à la surface des cellules endothéliales de la microvasculature pour favoriser l'influx.

#### **1.4.3.3.1 Inhibition des pompes d'efflux**

Limiter l'efflux des composés ayant eu la capacité de pénétrer dans le parenchyme cérébral est déjà une approche utilisée. Actuellement, plusieurs inhibiteurs compétitifs des pompes d'efflux sont étudiés en protocoles pré-cliniques notamment pour permettre d'augmenter la perméabilité des antirétroviraux dans le cerveau <sup>216</sup>.

#### **1.4.3.3.2 Augmentation de la lipophilie des molécules**

Les travaux de Charles Lipinski sur la relation structure-activité d'une librairie de molécules ont permis de montrer que la diffusion passive des composés à travers la BHE repose sur des critères physico-chimiques. Les deux critères principaux que nous évoquerons ici sont la lipophilie et la taille du composé <sup>217, 218</sup>. Ainsi, plus la lipophilie d'une molécule sera importante (plus grand sera le logP), plus il aura de probabilité de franchir passivement la BHE. La stratégie consistant à modifier le squelette chimique d'une molécule par des groupements augmentant sa lipophilie est tout particulièrement intéressante dans ce contexte. Un exemple classique est la diacétylation de la morphine (logP = 0.2) qui conduit à la synthèse de l'héroïne (logP = 1.12). Celle-ci pénètre 25 fois plus facilement dans le cerveau <sup>219</sup>. Toutefois, il existe une taille limite de molécule. Au-delà de 500 daltons, la taille du composé ne sera plus adaptée à une diffusion passive et la lipophilisation ne pourra rien y changer.

#### **1.4.3.3.3 Peptides permettant l'entrée dans les cellules**

Les peptides permettant l'entrée dans les cellules ou « CPP : Cell-penetrating peptides » réfèrent à un groupe de petits peptides de taille inférieure à 30 acides aminés qui, lorsqu'ils sont couplés à une autre molécule, potentialise son internalisation cellulaire. La revue de Chen et al. <sup>220</sup> illustre la diversité en longueur et en séquence de ces peptides. De nombreux essais fructueux ont permis de coupler des petites molécules, des protéines, des fragments d'ADN ou même des nanoparticules. Ainsi, par exemple, le couplage de la doxorubicine ou du paclitaxel au peptide SynB3 (dérivé d'un

peptide antimicrobien) a permis d'augmenter leur pénétration cérébrale d'un facteur 30 et 22 respectivement sans porter atteinte à l'intégrité de la BHE dans des expérimentations de perfusion *in situ* ou de passage à travers un modèle de BHE *in vitro*<sup>221</sup>. Egalement, les peptides TAT (issus de la protéine activatrice de la transcription Tat du Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1) couplés à des liposomes favorisent l'accumulation cérébrale des nanoparticules<sup>222</sup>.

#### **1.4.3.3.4 Reconnaissance ligand/récepteur : transcytose médiée par un récepteur endogène**

Les cellules endothéliales de la BHE expriment de nombreux récepteurs et transporteurs qui peuvent devenir des cibles intéressantes à exploiter pour un ciblage actif des médicaments vers le système nerveux central. Cela permet d'augmenter la sélectivité et la spécificité du passage à travers la BHE. La reconnaissance d'une cible exprimée à la surface des cellules endothéliales conduit à un mécanisme de transcytose médiée par un récepteur qui se déroule en trois phases. Tout d'abord, la liaison ligand-récepteur, qui se fait à la face luminale (du côté sanguin) de la cellule endothéliale, entraîne l'endocytose du complexe. Puis, les mouvements qui ont ensuite lieu dans le cytoplasme permettent le transfert de la molécule de la face apicale vers la face abluminale (du côté du parenchyme cérébral). Un mécanisme d'exocytose libère alors le produit dans le parenchyme cérébral<sup>220</sup>.

Plusieurs récepteurs sont en cours d'étude dans ce contexte, il s'agit notamment du récepteur à la transferrine, du récepteur à l'insuline ou encore des récepteurs aux lipoprotéines.

Le récepteur qui est le plus largement décrit dans la littérature dans ce contexte d'administration des médicaments est le récepteur à la transferrine. Cette glycoprotéine homodimérique présente une expression ubiquitaire puisqu'on la retrouve dans les hépatocytes, les érythrocytes, les cellules intestinales, les monocytes en plus des cellules endothéliales de la BHE. La stratégie repose sur l'utilisation par exemple d'anticorps dirigés contre le récepteur comme l'OX26 (spécifique du rat) ou le 8D3 (spécifique de la souris)<sup>223</sup>. Ainsi des nanoparticules de chitosan recouvertes d'OX26 présentent un meilleur passage intra-cérébral *in vivo*<sup>224</sup>.

Le récepteur à l'insuline est une protéine de 300 kDa hétérotétramérique<sup>225</sup>. Un anticorps monoclonal couplé au peptide  $\beta$ -amyloïde reconnaissant le récepteur à l'insuline présente des propriétés intéressantes comme outil diagnostique précoce de la maladie d'Alzheimer<sup>226</sup>. De même un anticorps humanisé administré par injection intra-veineuse chez le singe est internalisé dans le



cerveau et diffuse dans les différentes structures cérébrales <sup>227</sup>. Toutefois, il est nécessaire de prendre en compte le risque d'un tel ciblage dans la régulation de l'homéostasie du glucose <sup>220</sup>.

Enfin, le dernier exemple est le ciblage via les récepteurs aux lipoprotéines de basse densité (LRP1 et LRP2). Ces récepteurs présentent une affinité pour de nombreux substrats comprenant l'apolipoprotéine E, l'activateur du plasminogène tissulaire, la protéine précurseur de l'amyloïde, la lactoferrine ou l' $\alpha$ 2 macroglobuline <sup>220</sup>.

#### **1.4.3.3.5 Nanovectorisation**

Les nanoparticules sont des objets définis par la spécification anglaise PAS71 (2005) et l'Institut National de la recherche et de la sécurité (INRS) selon leur taille nanométrique : il s'agit de structures supramoléculaires solides ultra dispersées ayant une taille de l'ordre de 100 nm ou moins. Ancien rêve de Paul Ehrlich qui, en 1908, imaginait le concept de balle magique « magic bullet » afin de cibler et de détruire spécifiquement les pathogènes, la technologie nanoparticulaire offre aujourd'hui de nombreuses possibilités notamment dans le développement de stratégies thérapeutiques ciblées. Les nanoparticules utilisées dans le domaine médical servent comme agent diagnostique (dans l'imagerie médicale <sup>228</sup>) ou comme agent thérapeutique. Dans ce cas, on peut développer des nanoparticules de type matriciel, c'est-à-dire que le principe actif est dispersé dans toute la structure nanoparticulaire, ou vésiculaire dans lesquelles le principe actif est contenu dans une vésicule à l'intérieur de la nanoparticule. Dans d'autres cas, le principe actif peut être adsorbé ou lié de façon covalente à la surface. De nombreux types de structures sont décrits dans la littérature pour l'utilisation de nanoparticules comme nanovecteurs de principes actifs: liposomes à cœur aqueux, nanosphères, nanocapsules, micelles polymériques, particules lipidiques solides, particules métalliques...<sup>229</sup> La structure doit être adaptée au principe actif que l'on souhaite vectoriser : il est ainsi fondamental de prendre en compte ses caractéristiques physico-chimiques comme son caractère hydrophile, lipophile ou amphiphile. En revanche, différentes classes thérapeutiques peuvent être associées à des nanovecteurs : protéines, peptides, acides nucléiques <sup>230</sup> ou encore des molécules de synthèse chimique comme les antirétroviraux <sup>231</sup> et les anticancéreux comme le paclitaxel <sup>232</sup>.

Dans le contexte de l'administration des médicaments dans le système nerveux central, les nanoparticules constituent une approche intéressante pour franchir la BHE. De nombreuses voies

d'administration sont envisagées : voie orale, voie parentérale, ou encore des voies plus originales prometteuses *in vivo* : administration via le nerf olfactif <sup>233, 234</sup> ou l'oreille interne <sup>235</sup>, qui permettraient d'éviter le passage par la BHE. Les nanoparticules pénétreraient par deux mécanismes distincts : la perméabilité vasculaire augmentée (effet EPR « Enhanced Permeability and Retention ») principalement dans les néo-vaisseaux à proximité des tumeurs <sup>236</sup> ou par un mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur, qui repose alors sur l'interaction d'un ligand et d'un récepteur spécifique, de préférence sur-exprimé au niveau des cellules endothéliales de la BHE. Il existe beaucoup d'exemples dans ce domaine. Ainsi, des nanoparticules recouvertes d'un anticorps OX26 (dirigé contre le récepteur à la transferrine) et encapsulant du lopéramide ont montré que le ciblage par le récepteur à la transferrine favorisait le passage du lopéramide dans le cerveau, qui pouvait alors y exercer son effet anti-nociceptif <sup>237</sup>. Une autre équipe a montré que des nanoparticules d'albumine recouvertes d'insuline encapsulant la même molécule, le lopéramide, entraînait également un passage plus prononcé de la molécule dans le cerveau <sup>238</sup>.



## ***CHAPITRE 2***

### ***OBJECTIFS***

---



Cette thèse s'inscrit dans une problématique large visant à développer des dérivés de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine, pathologie neurologique lourde conduisant à des déficits mentaux profonds chez les enfants atteints. Cette pathologie décrite au début des années 2000 est due à une altération génique dont la transmission est héréditaire. Elle conduit à l'absence de fonctionnalité du transporteur de la créatine, un acide aminé impliqué dans les boucles de régulation de l'énergie cellulaire. L'absence de créatine dans les cellules provoque des déficits énergétiques ayant des répercussions importantes en termes de physiologie, notamment neuronales, comme nous avons pu le voir en introduction.

Dans ce cadre et bien que la physiologie des échanges de la créatine au niveau cérébral soient encore mal compris, il nous semblait important de considérer une voie d'exploration destinée à suppléer l'absence de créatine au niveau cérébral. Pour ce faire, il fallait donc développer une molécule ayant non seulement les capacités de franchir la barrière hémato-encéphalique sans nécessiter la fonctionnalité du transporteur de la créatine mais encore capable de libérer la créatine au sein des cellules cibles neuronales dans le parenchyme cérébral.

Le rationnel de ce projet de thèse repose sur l'observation que les molécules lipophiles ont une prédisposition forte à interagir avec les membranes cellulaires et qu'elles sont exploitables pour franchir la barrière hémato-encéphalique selon un processus passif. Nous avons donc cherché à créer une chimiothèque de prodrogues de la créatine lipophiles selon un schéma de synthèse tout à fait novateur qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet afin de valoriser cette propriété intellectuelle. Cette synthèse chimique a permis le greffage d'alcools gras au squelette de la créatine créant ainsi des esters de créatine à longueur de chaîne carbonée variable, de façon à créer une librairie de composés aux propriétés physico-chimiques diverses. Le choix de la liaison ester s'est fait spontanément au vu du très grand nombre d'estérases cellulaires actives. Celles-ci réaliseraient le clivage de la fonction ester conduisant à la libération de la créatine en intracellulaire.

La capacité de ces dérivés à pénétrer dans le cerveau a été obtenue dans un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique en culture primaire et leur internalisation dans les cellules cibles neuronales a été étudiée dans un modèle *in vitro* de culture primaire de neurones. Enfin, la preuve de concept pharmacologique a été réalisée sur un modèle cellulaire de fibroblastes humains de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine.

Soucieux de raccorder la recherche fondamentale à la clinique, notre réflexion s'est portée sur l'administration d'une telle prodrogue de la créatine puisque les esters sont des composés instables

car dégradés par les estérases présentes dans la circulation plasmatique. Ils ne peuvent donc pas être évalués tels quels ni *in vivo* ni en clinique.

L'idée était là de développer une approche globale de la recherche vers le patient. Deux objectifs devaient être remplis par la formulation galénique que nous allions retenir : la protection de la structure chimique de la molécule d'une part et la capacité sélective à circuler dans l'organisme pour gagner le système nerveux central d'autre part. L'élément de formulation qui nous a paru le plus adéquat est la nanovectorisation. En effet, l'essor actuel des nanomédecines montre bien les intérêts de ces approches pharmaceutiques notamment en termes de confort d'administration pour le patient, et en termes de ciblage de protéines cellulaires permettant d'augmenter la balance bénéfice/risque en favorisant l'internalisation dans les cellules exprimant la cible tout en limitant sa diffusion dans les autres types cellulaires ce qui limite le risque toxique et donc les effets indésirables. Nous avons évalué dans ce projet une formulation par nanocapsules lipidiques sur les aspects d'encapsulation de l'ester de créatine et sur les capacités à franchir la monocouche endothéliale.

Dans le contexte de cette thèse, cette approche par nanovectorisation a exploité une technologie brevetée : les nanocapsules lipidiques (NCL). Ces nanocapsules sont constituées d'un cœur lipidique de triglycérides de chaînes moyennes (acide caprique et caprylique C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Labrafac C-C®) entouré par une coque de tensioactifs (Solutol® : mélange de PEG 660 et d'hydroxystéarate de PEG 660 et Lipoïd S75-3® : lécithine de soja, phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine). Elles sont produites selon un procédé simple sans utilisation de solvant organique et de basse énergie<sup>239, 240</sup> qui conduit à une distribution monomodale dont la taille varie entre 20 et 100 nm selon la proportion des constituants<sup>241</sup>. L'ensemble des constituants de ces NCL sont approuvés par l'autorité de santé américaine Food and Drug Administration. Ces vecteurs sont des outils parfaitement biocompatibles, exploitables pour l'administration de molécules actives vers le cerveau. Elles peuvent faire l'objet de post-insertions<sup>242</sup> de chaînes PEG pour en faire des vecteurs furtifs dont le temps de circulation dans l'organisme sera augmenté ainsi que de greffages d'anticorps en surface afin de réaliser un adressage moléculaire par exemple en ciblant le récepteur à la transferrine exprimé à la surface des cellules endothéliales<sup>243-246</sup>. Par ailleurs, les NCL sont administrables *in vivo*<sup>247</sup> car elles sont peu immunogènes<sup>248</sup> et elles ne présentent pas de toxicité chez l'animal<sup>249</sup>. Lors des études de biodistribution *in vivo*, elles ont montré une capacité, bien que faible, à pénétrer le cerveau<sup>245</sup>. Il est aisé d'encapsuler diverses molécules lipophiles comme des anticancéreux (paclitaxel<sup>249</sup> ; 2-ferrocenyl-1,1-bis(4-hydroxyphenyl)-but-1-ene<sup>246</sup> ; 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin<sup>250</sup> ; ethyl [2-amino-6-bromo-4-diethylmalonate]-4H-chromene-3-carboxylate<sup>251</sup>...), des dérivés

hépariniques (Fondaparinux®<sup>252</sup>) ou encore des acides nucléiques<sup>253, 254</sup>. L'encapsulation d'anticancéreux non solubles dans le cœur aqueux (doxorubicine, erlotinib) est également possible grâce à des micelles inverses à cœur aqueux dispersées dans le cœur lipophile des NCL<sup>255-258</sup>. Les NCL sont administrables par voie parentérale classique, par voie *per os* puisqu'elles résistent à l'acidité gastrique<sup>252, 259</sup> ou pulmonaire<sup>260</sup>.

Au niveau cellulaire, les NCL entrent dans le compartiment intracellulaire via un processus d'endocytose<sup>261</sup>. En revanche, elles sont peu retrouvées dans les lysosomes, ce qui indiquerait un échappement de la voie endolysosomyale et donc une meilleure biodisponibilité de la molécule encapsulée. De plus, elles présentent des propriétés d'inhibition de la P-glycoprotéine, un transporteur responsable de l'efflux des molécules actives hors des cellules, ce qui limiterait l'échec thérapeutique<sup>262-264</sup>. Ces propriétés semblent reposer sur la présence des chaînes PEG à la surface des nanoparticules (Solutol®).

Ces nanovecteurs seraient donc des outils de choix pour favoriser le passage intra-cérébral de molécules thérapeutiques. Cette formulation pourrait être envisagée pour protéger la structure de l'ester de créatine en vue d'une administration chez l'animal afin de réaliser des études de pharmacocinétique et pharmacodynamie.

Cette thèse se situe ainsi à l'interface pluridisciplinaire des trois arts impliqués à la source même de la création d'une nouvelle thérapeutique : la chimie, la biologie et la formulation pharmaceutique.





***CHAPITRE 3***  
***METHODES EXPERIMENTALES***

---



## **3.1 Suivi de la synthèse organique et caractérisation des lots d'esters de créatine**

### **3.1.1 Méthodes utilisées pour le suivi de la synthèse organique et pour la purification des produits**

#### **3.1.1.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince sur des plaques en verre recouvertes de gel de silice imprégné d'un indicateur fluorescent (60 F<sub>254</sub> Merk). Les produits sont révélés à l'aide d'une lampe UV à 254 nm. Les systèmes éluants sont indiqués dans les caractéristiques des produits dans la publication Trotier-Faurion et al., soumise au *J. Med. Chem*, dans la section « Experimental section ».

#### **3.1.1.2 Purification par chromatographie sur colonne**

La purification des produits par chromatographie sur colonne a été réalisée par un Combiflash Rf Teledyne isco avec des colonnes de silice SI HC, les analytes étant détectés en UV à 254 nm. Les colonnes et les éluants utilisés pour la purification de chaque produit sont indiqués dans la publication Trotier-Faurion et al., soumise au *J. Med. Chem*, dans la section « Experimental section ».

### **3.1.2 Méthodes utilisées pour la caractérisation des esters de créatine**

Les esters de créatine ont été caractérisés selon les techniques classiques : analyse par résonance magnétique nucléaire, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, spectroscopie infrarouge et la mesure des points de fusion.

### 3.1.2.1 Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer les structures de molécules organiques. Elle permet de déterminer l'environnement chimique d'un atome et donc la structure d'une molécule en étudiant la fréquence de résonance de cet atome soumis à un champ électromagnétique d'intensité connue. La RMN du proton (fréquence fixée à 400 MHz) et la RMN du carbone 13 (fréquence fixée à 100 MHz) ont été utilisées. Les spectres ont été obtenus sur un spectromètre Brücker 400 Ultrashield. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million ou ppm par rapport au signal du solvant. La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplets), q (quadruplet), m (multiplet), dd (doublet de doublet) et bs (singulet large). Les spectres du  $^{13}\text{C}$  sont des spectres découplés du proton. Les différents solvants deutériés utilisés selon la solubilité des produits sont indiqués dans la publication Trotier-Faurion et al., soumise au *J. Med. Chem*, dans la section « Experimental section ».

### 3.1.2.2 Analyse par spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie IR est une technique d'analyse de la structure chimique d'une molécule basée sur la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde d'un faisceau de lumière infra-rouge. Elle permet de déterminer les liaisons chimiques covalentes présentes dans le composé. Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil Perkin Elmer 2000 FT-IR entre 4500 et 600  $\text{cm}^{-1}$ . Deux types d'échantillons ont été préparés : un dépôt entre deux pastilles de chlorure de sodium pour les produits solubles dans le dichlorométhane, ou un dépôt entre deux pastilles de bromure de potassium pour les solides. Les bandes sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$  et leurs caractéristiques sont indiquées dans la publication Trotier-Faurion et al., soumise au *J. Med. Chem.*, dans la section « Experimental section », comme suit :  $\nu$  (élongation) et  $\delta$  (déformation angulaire).

### 3.1.2.3 Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) combine les capacités de séparation physique de la chromatographie liquide (HPLC) avec l'analyse en masse (MS). C'est une technique sensible et spécifique qui permet d'identifier les composés par leurs propriétés physicochimiques et leur rapport masse/charge (cf Annexe 2). Les analyses HPLC-MS ont été réalisées sur une chaîne Waters semi-préparative équipée d'un passeur d'échantillon 2767 et d'un

système de gradient binaire 2545. Cette chaîne est couplée à un spectromètre de masse de type triple quadripôle Waters 3100. La colonne HPLC utilisée est une Waters XBridge 100 x 4.6 mm avec une phase stationnaire greffée en C18 et une granulométrie de 3.5  $\mu\text{m}$ . Les phases mobiles sont A : 100% eau à 0.1% d'acide formique et B : 100% d'acétonitrile à 0.1% d'acide formique. Le gradient de routine est le suivant : de 0 à 8 min 95% de A et 5% de B ; de 8 à 13 min 100% de B et à 13 min, retour aux conditions initiales.

#### **3.1.2.4 Analyse par mesure des points de fusion**

La mesure des points de fusion correspond à la détermination de la température à laquelle un composé chimique passe de l'état solide à l'état liquide. Le point de fusion a été déterminé à la pression atmosphérique grâce à un appareil Büchi Melting Point B-545.

#### **3.1.3 Estimation des paramètres physico-chimiques des esters de créatine**

L'estimation des paramètres physico-chimiques de molécules de la chimiothèque a été réalisée grâce à des outils de prédiction informatique, exploitant la structure chimique de chaque molécule. Tout d'abord, la masse molaire du composé, la formule brute et la composition chimique ont été déterminées par le logiciel IsisDraw (version 2.3, MDL Information System). Le logiciel MarvinSketch (version 5.11, ChemAxon) a été utilisé pour prédire les paramètres de protonation (pKa), de partage (logP), de géométrie (aire de la surface polaire 2D et 3D) et le nombre d'atomes accepteurs ou donneurs d'hydrogène. Le calcul du pKa a été réalisé sur une échelle de pH allant de 0 à 14 (avec un pas de 0,2 unités) à une température de 298 K, soit 25°C. Le mode « macro » a été utilisé et le préfixe acide/base a été fixé comme « static », aucun facteur de correction n'a été appliqué. Le calcul du logP permet d'estimer l'hydrophobicité moléculaire. La méthode (pondérée) du logiciel exploite à part égale trois jeux de données Viswanadhan et al., Klopman et al.<sup>265, 266</sup> et la méthode Physprop® (Physical Properties Database, SRC). Les électrolytes Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> ont été fixés à une concentration de 0.1 mol/dm<sup>3</sup>. Le nombre d'accepteurs et de donneurs d'hydrogène de même que les surfaces de l'aire polaire 2D et 3D ont été estimés pour l'espèce majoritaire en solution à un pH physiologique (fixé égal à 7.4).

## 3.2 Développement des méthodes analytiques d'identification des esters de créatine

Nous avons utilisé une colonne à greffage diol en phase inverse afin de retenir la créatine et les esters de créatine par le motif guanidine, grâce à la même phase stationnaire. La séparation HPLC a ainsi été réalisée grâce à une chaîne de chromatographie liquide (Shimadzu HPLC system LC 20AD) avec une colonne Uptisphère diol 2.0 x 150 mm (UP120-6OH, Interchim, 150 x 2.1 mm, 6.0 µm de granulométrie) placée dans un four à colonne à 40°C, et sur laquelle 10 µl d'échantillon ont été injectés. Nous avons travaillé en isocratique avec une phase mobile A : eau supplémentée à 0.1% d'acide formique et une phase mobile B : acétonitrile supplémenté à 0.1% d'acide formique, en proportion 20/80 pour les composés à longues chaînes carbonées supérieures à 4 atomes de carbone (esters de créatine en C8, C9, C12, C16 et C18) ou 40/60 pour les composés à courtes chaînes carbonées inférieures à 4 atomes de carbone (ester de créatine en C2 et C4) ou sans chaîne carbonée (créatine, créatinine). Le débit était de 0.4 ml/min et le temps total d'analyse était de 6 minutes.

La détection était ensuite assurée par un spectromètre de masse de type triple quadripôle en tandem (Finnigan TSQ Quantum Discovery géré par le logiciel Xcalibur v.2.0, Thermo) en mode électrospray positif. La tension appliquée au niveau du capillaire était de 3.0 kV, les pressions de gaz de désolvatation et de gaz auxiliaire étaient fixées à 50 et 20 en unités arbitraires respectivement. L'énergie de la source était de 12 V et la température du capillaire de 350°C. Les énergies de collision ( $E_{\text{coll}}$ ) et les paramètres de transfert des ions (tube lens) ont été optimisés pour chaque composé et sont rapportés dans le Tableau 10, page 139. Les quantifications absolues des concentrations en analyte ont été réalisées grâce au logiciel LC Quan v.2.5 (Thermo) contre une gamme de concentration et les courbes de calibration ont montré une relation linéaire ou quadratique en fonction des esters permettant une quantification robuste de chaque analyte. Les quantifications ont été réalisées dans chaque surnageant après dilution au  $1/5^{\text{ème}}$  dans un mélange constitué à 95% d'acétonitrile et à 5% d'acide formique ainsi que dans les lysats cellulaires des cellules endothéliales, gliales, neuronales et fibroblastiques après la lyse cellulaire dans un mélange constitué de 20% d'eau, 76% d'acétonitrile et 4% d'acide formique, suivie d'une centrifugation pendant 10 minutes, 13 000 g à +4°C. Lorsque les quantifications ont été faites avec un étalon interne (études de stabilité), il s'agit de l'acide amino-octanoïque à la concentration de 1 µg/ml (T1 : (m/z) 160.19 → 97.2,  $E_{\text{coll}} = 5$  et « tube lens » = 60 ; T2 : (m/z) 160.19 → 55.3,  $E_{\text{coll}} = 20$  et « tube lens » = 60). La créatinine était suivie à titre de contrôle car elle représente ici une impureté de synthèse chimique.

## 3.3 Préparation des nanocapsules lipidiques

### 3.3.1 Préparation des nanocapsules lipidiques

La préparation des nanocapsules lipidiques (NCL) repose sur des propriétés topologiques micellaires de micro-émulsions obtenues par effet thermique. Les nanocapsules lipidiques sont des nanovecteurs constitués d'un cœur lipidique stabilisé par une coque tensioactive (Figure 35). Leur préparation repose sur un processus d'inversion de phase entre une émulsion huile dans eau (H/E) et une émulsion eau dans huile (E/H) suite à des cycles d'augmentation et diminution de la température<sup>240</sup>. L'ajout d'un volume d'eau à 0°C (volume de trempage) au cours de cette d'inversion de phase, suivie par conductimétrie, permet de figer le système et d'obtenir une suspension de NCL (Figure 36).

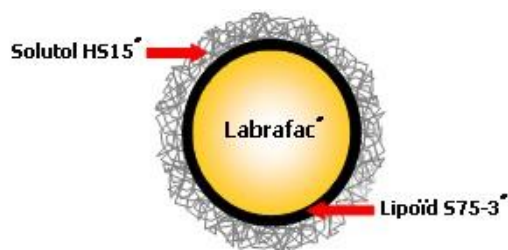


Figure 35 : Composition des NCL

Les NCL sont constituées d'un cœur huileux constitué de triglycérides (Labrafac®) et d'un film solide enrobant comprenant des tensio-actifs lipophiles (phospholipides, Lipoid 575-3®) et hydrophiles (Solutol HS 15®)

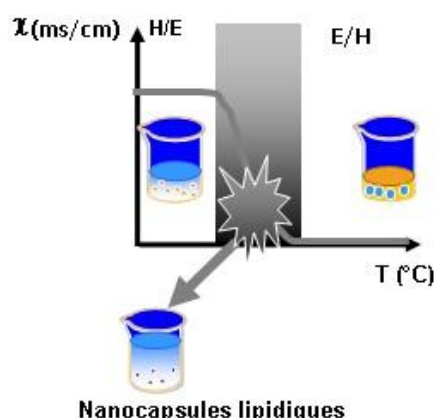


Figure 36 : Inversion de phase en fonction de la température

Ce graphe présente la conductimétrie en fonction de la température. A basse température, l'émulsion Huile dans l'Eau (H/E), de forte conductivité, est privilégiée et à forte température c'est l'émulsion Eau dans Huile (E/H), de faible conductivité. La zone grisée correspond à la zone d'inversion de phase qui permet d'obtenir les NCL.

La taille des objets obtenus au laboratoire sont homogènes (un seul pic, mono dispersion) et le tableau montre la proportion des constituants permettant d'obtenir des objets entre 20 et 100 nm



(Tableau 3). Dans cette étude, nous avons choisi des objets de taille moyenne 50 nm en suspension dans un tampon HEPES à pH = 7.4 qui est constitué de 9.5 g d'HEPES, 16.8 g de NaCl et 0.584 g d'EDTA qsp 2 litres et ajusté au pH adéquat.

Constituants	Quantité en g		
	NCL 20 nm	NCL 50 nm	NCL 100 nm
Solutol HS 15®	1.934	0.846	0.484
Lipoïd 75-3®	0.075	0.075	0.075
NaCl	0.089	0.089	0.089
Labrafac CC®	0.846	1.028	1.209
Tampon HEPES	2.055	2.962	3.143

**Tableau 3 : Proportions des constituants pour la préparation de différentes tailles de NCL**

### 3.3.1.1 Réalisation des NCL

Les pesées des différents constituants sont réalisées dans un pilulier et le volume obtenu est de 5 ml. Le pilulier est chauffé ( $\theta = 85-90$  °C) et la suspension est blanche et opaque. Tous les suivis de température sont réalisés à l'aide d'une sonde thermométrique. La suspension est ensuite refroidie sur un agitateur non chauffant. Quand la température de la suspension atteint 60°C, deux nouveaux cycles de chauffe à 90°C et de refroidissement à 60°C sont effectués. Lors du troisième refroidissement, lorsque l'on atteint la zone d'inversion de phase (environ 75°C) et que la suspension devient limpide, 5 ml de tampon HEPES à 0°C sont ajoutés, ceci correspondant au volume de trempe, qui permet l'obtention des nanocapsules. La formulation dite blanche (**NCL ou NCL blanches**) est alors filtrée avec un filtre à seringue de porosité 0.22  $\mu\text{m}$ . Sa concentration est déterminée par une approximation des volumes en pesées, c'est-à-dire que la concentration en NCL est égale à la somme des masses des matières sèches divisée par la somme des volumes des solutions.

### 3.3.1.2 Réalisation des NCL-PegMal et des NCL-PegOMe

On réalise d'abord la post-insertion d'un « linker » constitué de chaînes poly-éthylène glycol (PEG), permettant la fonctionnalisation adéquate de la surface des nanocapsules pour le greffage. Ceci est réalisé à 60°C par l'ajout de 22 mM de 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyéthylène glycol)-2000] ou DSPE-PegMal ou de 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyéthylène glycol)-2000] ou DSPE-PegOMe sur 600  $\mu\text{l}$  de la

formulation blanche. Les formulations dites « **NCL-PegMal** » ou « **NCL-PegOMe** » sont alors purifiées sur une colonne d'extrusion stérique constituée de sépharose CL-4B avant d'être utilisées, afin d'éliminer le DSPE-PegMal ou le DSPE-PegOMe qui ne se seraient pas post-insérés.

### **3.3.1.3 Réalisation des NCL-PegProtéine**

Le greffage entre le DSPE-PegMal (présent à la surface des NCL-PegMal) et la protéine (dans notre cas un anticorps OX26 dirigé contre le récepteur à la transferrine ou l'insuline) se fait par une liaison thiol. Pour cela, une thiolation préalable des amines primaires de la protéine avec 40 équivalents de réactif de Traut (communément utilisé pour cela) doit être réalisée sous agitation à température ambiante pendant 1h dans un tampon HEPES à pH=7.4. La protéine ainsi thiolée est ensuite purifiée sur une colonne PD10 Séphadex G25M, avant d'être mise à incuber avec la suspension de NCL PegMal pendant une nuit à +4°C sous agitation afin d'obtenir les « **NCL-PegProtéine** ». Une purification est enfin réalisée sur une colonne d'extrusion stérique, contenant du sépharose CL-4B, afin d'éliminer le reste de protéines qui ne se serait pas greffé. Grâce à cette technique, nous avons pu greffer la protéine Insuline « **NCL-PegInsuline ou NCL-PegIns** » ou un anticorps OX26 reconnaissant le récepteur à la transferrine « **NCL-PegOX26** ».

La facilité de mise en œuvre des procédés de formulation, la non-toxicité des adjuvants, la stabilité et les propriétés structurales, en font des candidats de choix pour la vectorisation de principes actifs lipophiles.

## **3.3.2 Encapsulation de composés dans les nanocapsules lipidiques**

### **3.3.2.1 NCL-DiD : pour l'identification par fluorimétrie**

Le DiD, un fluorochrome lipidique, a été encapsulé dans les NCL (**NCL-DiD**). Il est ajouté aux poudres de départ à la quantité de 0.6 mg/g de Labrafac CC®. Il permet de détecter les NCL-DiD par lecture de la fluorescence grâce à un fluorimètre aux longueurs d'onde d'absorption 620 nm et d'émission 685 nm. Les formulations encapsulant le DiD qui ont été réalisées sont les NCL-DiD (blanches), les NCL-DiD-PegOMe, les NCL-DiD-PegIns et les NCL-DiD-PegOX26.

### 3.3.2.2 NCL-amiodarone : pour l'identification par UPLC-MS/MS

L'amiodarone a été encapsulée dans les NCL selon Lamprecht et al.<sup>267</sup> à la concentration de 2 mg/ml (**NCL-amiodarone**). Les formulations encapsulant l'amiodarone qui ont été réalisées sont les NCL-amiodarone (blanches), les NCL-amiodarone-PegOMe et les NCL-amiodarone-PegIns.

Cela permet leur identification et leur quantification dans les échantillons par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS), après une étape de lyse au 1/5<sup>ème</sup> dans le méthanol et une centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes à +4°C. Le principe de la technique est développé dans l'Annexe 2. L'UPLC permet d'améliorer la rétention et de diminuer le temps d'analyse. La séparation a été réalisée sur 5 µl d'échantillon grâce à une colonne UPLC greffée C18 CSH (Waters, 75 x 2.1 mm, 1.7 µm de granulométrie) sur une chaîne Waters Acquity. La phase mobile A était constituée d'eau supplémentée à 0.1% d'acide formique et la phase mobile B était constituée de méthanol. Le gradient d'élution débutait à 20% de phase B pendant 0.5 min suivi d'une augmentation jusqu'à 80% de B à 1.1 minutes et d'un plateau jusqu'à 2.0 min avant de redescendre aux conditions initiales à 2.1 min. Le temps total de « run » était 3.5 min. Le temps de rétention de l'amiodarone est 1.99 min.

La détection était réalisée par un spectromètre de masse de type triple quadripôle Xévo TQ MS (Waters) géré par le logiciel MassLynx v4.1 (Waters). Les tensions du capillaire et du cône étaient fixées respectivement à 3 000 et 50 V, la température de la source à 150 °C et la température de désolvatation à 400 °C. La transition suivie spécifique de l'amiodarone était (m/z) 645.80 → 99.90 avec une énergie de collision de 36 eV et un dwell de 0.2 sec. La quantification des échantillons a été réalisée par le logiciel MassLynx contre une gamme en solution dans un mélange 20/80 eau/méthanol. La limite inférieure de détection obtenue était 0.5 nM et la limite de quantification (LLOQ) de 1 nM. La limite supérieure de quantification était fixée à 1.5 µM.

### 3.3.2.3 NCL-C12 : pour la protection et la vectorisation de l'ester dodécylique de créatine

Un des objectifs de cette étude repose sur l'encapsulation de l'ester de créatine en C12 dans les NCL (**NCL-C12**). Ses propriétés physico-chimiques ainsi que sa grande sensibilité à l'hydrolyse de la fonction ester en milieu aqueux à chaud, nous ont obligés à apporter une légère modification au procédé de formulation décrit précédemment, inspirée de l'étude Roger et al.<sup>250</sup> Dans ces formulations NCL-C12, le cœur huileux est constitué par un mélange de Labrafac® et de Labrafil® et

l'ester de créatine en C12 est incorporé en solution dans du Transcutol® lors du dernier refroidissement à la concentration finale théorique de 300 µg/ml.

Une lyse des échantillons solutions de NCL-C12 est réalisée au 1/5<sup>ème</sup> dans un mélange d'acétonitrile et d'acide formique en proportion 95% - 5%. Une centrifugation est réalisée à 20000 g pendant 10 minutes à +4°C. Le dosage de l'ester dodécylque de créatine est réalisé suivant la méthode décrite dans Méthodes expérimentales, §3.2.

### **3.3.3 Caractérisation des NCL**

#### **3.3.3.1 Caractérisation physico-chimique**

Les NCL sont caractérisées par leur taille et leur potentiel zéta, c'est-à-dire la charge électrique de la particule, grâce à un Zetasizer (Nanoseries ZS, Malvern) piloté par le logiciel Zetasizer (Malvern).

La présence de protéines à la surface des NCL est validée par un test microBCA : la présence de protéines en milieu alcalin catalyse la réduction du Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>1+</sup> qui peut alors chélater 2 molécules d'acide bicinchoninique (BCA) et former un produit de réaction de couleur violette. 100 µl d'un mélange de réactifs du kit de dosage sont mis en contact de 100 µl de suspension de NCL PegProtéine et une incubation de 2 h est réalisée à 37°C. La densité optique est ensuite lue à 560 nm et comparée à un contrôle sans protéines.

La caractérisation physico-chimique a été réalisée pour les NCL-DiD ± greffage Peg ± Insuline, pour les NCL-amiodarone ± greffage Peg ± Insuline ainsi que pour les NCL-C12.

#### **3.3.3.2 Détection d'une éventuelle réponse immunitaire inappropriée**

Afin de vérifier que les NCL ainsi synthétisées n'entraînent pas de réponse immunitaire lors de l'administration par voie intraveineuse, un test de capture macrophagique ainsi qu'un test d'activation du système du complément ont été réalisés avec les NCL-DiD. Les protéines du complément présentes dans le sérum entraînent l'opsonisation et recrutent les cellules immunitaires (les lymphocytes B et les macrophages), activant la réponse immunitaire.

❖ Test de capture macrophagique

Pour le test de capture macrophagique, des cellules de type THP-1 (monocytes humains) sont cultivées en suspension à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub>. Après une mise en plaque 24 puits à la densité de 0.5 x 10<sup>6</sup> cellules par puits, une différenciation en macrophages est induite par l'incubation de 100 nM de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Ces macrophages sont alors incubés avec les solutions dosées à 1.5 mg/ml de nanocapsules chargées en fluorophore (NCL-DiD) pendant 90 min à 37°C et à +4°C. La proportion de nanocapsules phagocytées par les macrophages est alors évaluée par cytométrie de flux (FACS).

❖ Test d'activation du complément

L'activation du complément a été évaluée dans le sérum humain normal (SHN) par la mesure de la capacité hémolytique résiduelle du système du complément après sa mise en contact avec des suspensions de nanocapsules lipidiques. La technique consiste à déterminer la part de sérum capable de lyser 50% d'un nombre fixe (2 x 10<sup>8</sup>) d'érythrocytes de mouton sensibilisés par un anticorps spécifique (hémolysine). Dans un premier temps, plusieurs concentrations de NCL-DiD (de 0.156 à 1.56 mg/ml) sont incubées pendant 1 heure à 37°C avec un volume fixe de SHN dans un milieu isotonique. Ces solutions sont ensuite mises au contact d'un nombre fixe d'érythrocytes de mouton pendant 45 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de chlorure de sodium et une centrifugation est réalisée à 2000 rpm pendant 10 min à 4°C. Si les NCL ont activé le système du complément, les protéines du complément contenues dans le SHN vont induire la lyse des érythrocytes et libérer l'hémoglobine qui peut être détectée par spectrophotométrie à la longueur d'onde 405 nm. Dans un premier temps, la comparaison avec des contrôles positif et négatif de lyse des érythrocytes permet d'évaluer la proportion de lyse pour chaque concentration. Puis l'activation du complément est exprimée en fonction de la surface des nanocapsules, ce qui permet la comparaison des différents types de nanocapsules lipidiques.

❖ Détection d'endotoxines éventuelles dans les suspensions de NCL (inconvenient) :

Un test de détection des endotoxines a été réalisé sur des solutions de nanoparticules NCL-amiodarone, NCL-amiodarone PegOMe, NCL-amiodarone PegInsuline et NCL-C12 à mg/ml dans le

sérum physiologique grâce au protocole Pierce LAL Chromogenic endotoxine quantitation kit (Fisher Scientific). Ce test repose sur l'activation d'une enzyme (Limulus Amebocyte Lysate, LAL) catalysée par les endotoxines présentes en solution. Cette enzyme permet alors le clivage d'un substrat en p-nitroaniline qui absorbe à 405-410 nm. La quantification absolue de la quantité d'endotoxines est effectuée contre une gamme linéaire en endotoxines d'*Escherichia coli*.

Dans un second temps, nous avons déterminé les concentrations en endotoxines dans une gamme de concentration de 0.1 ng/ml à 1000 ng/ml en lipopolysaccharide issu d'*Escherichia coli* afin de les comparer aux valeurs d'endotoxines détectées dans les solutions de NCL.

## 3.4 Etudes réalisées en culture cellulaire

### 3.4.1 Modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique (BHE) de rat adulte

#### 3.4.1.1 Isolement des cellules endothéliales de rat

Les cerveaux de rats âgés de 5 semaines (Wistar, Charles River) sont prélevés le matin du jour programmé pour l'isolement. Ces cerveaux sont ensuite disséqués de façon à ôter le tronc cérébral, le cervelet, les bulbes olfactifs, la substance blanche et les méninges. Ils subissent une première étape de fragmentation mécanique par découpage au scalpel et allers-retours à la pipette dans du tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) + 1% PSN. Après une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à +4°C, l'homogénat de cerveau est digéré pendant 60 minutes à 37°C par 15 ml d'une solution enzymatique constitué de collagénase-dispase à 1 mg/ml dans du tampon HBSS + 1% PSN, de DNase type I à 20 Unités/ml finales et d'un cocktail d'inhibiteurs de trypsine et de protéases trypsine-like TLCK (ou Na-Tosyl-Lys-chlorométhylkétone) à 0.147 µg/ml. Après homogénéisation, une centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Puis cet homogénat est soumis à un gradient de BSA qui permet de séparer l'anneau de myéline (astrocytes, microglie, oligodendrocytes) du culot des microvaisseaux (cellules endothéliales microvasculaires, érythrocytes). Ces microvaisseaux sont engagés dans une seconde étape de digestion dans la même solution enzymatique que précédemment pendant 1 heure. Une dernière étape de centrifugation

conduit à l'obtention d'un culot cellulaire qui est ensemencé en flasques de culture de 75 cm<sup>2</sup> préalablement enduites (coating) d'une solution de collagène de type IV (2 heures, 3.5 ml) à 0.1 mg/ml dans l'eau et 1 heure par 3.5 ml d'une solution de fibronectine à 10 µg/ml. Les cellules sont cultivées pendant 5 à 6 jours dans du milieu EBM-2 supplémenté par le kit EGM-2 MV Single Quots et par une concentration décroissante (3 à 0 µg/ml) de puromycine au fur et à mesure de la culture. Le milieu est remplacé tous les 2 à 3 jours.

Lorsque la confluence des cellules atteint 80 à 90%, la trypsinisation des cellules est réalisée après 3 rinçages au PBS. Les cellules sont ensuite congelées dans l'azote liquide dans des cryotubes à 1.2×10<sup>6</sup> cellules/ml dans du SVF + 10% DMSO.

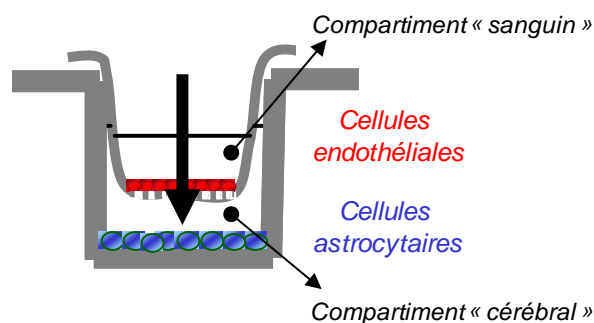
### **3.4.1.2 Isolement des cellules gliales de rat**

Les cerveaux de rats âgés de 2 jours (Wistar, Charles River) sont prélevés le jour programmé pour l'isolement. Ces cerveaux sont ensuite disséqués de façon à ôter le tronc cérébral, le cervelet, les bulbes olfactifs et les méninges. Ils subissent une première étape de fragmentation mécanique par découpage au scalpel et allers-retours à la pipette dans du tampon HBSS + 1% PSN. Après une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à +4°C, l'homogénat de cerveau est digéré pendant 30 minutes à la trypsin-EDTA à une concentration de 0.025% dans de l'HBSS + 1% PSN. Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est repris dans 20 ml de milieu dit « glial » constitué de 500 ml d'un mélange volume/volume de MEM-α/F-12, supplémenté par 5% de SVF décomplémenté, 1% de sérum humain décomplémenté, 1% d'un mélange d'antibiotiques - pénicilline, streptomycine, néomycine -, 5 µg/ml de fGF. La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur tamis cellulaire avant d'être ensemencée dans des flasques 75 cm<sup>2</sup> préalablement enduites (coating) avec une solution de poly-L-lysine à 0.1 mg/ml. Les cellules sont cultivées pendant 5 à 6 jours avec remplacement du milieu tous les 2 à 3 jours.

Lorsque la confluence des cellules atteint 80 à 90%, la trypsinisation des cellules est réalisée après 3 rinçages au PBS. Les cellules sont ensuite congelées dans l'azote liquide dans des cryotubes à 500×10<sup>6</sup> cellules/ml dans du SVF + 10% DMSO.

### **3.4.1.3 Genèse de la barrière hémato-encéphalique (BHE)**

Les BHE sont constituées d'une co-culture de cellules gliales et de cellules endothéliales séparées par une membrane poreuse semi-perméable (un Transwell®) permettant les échanges (Figure 37).



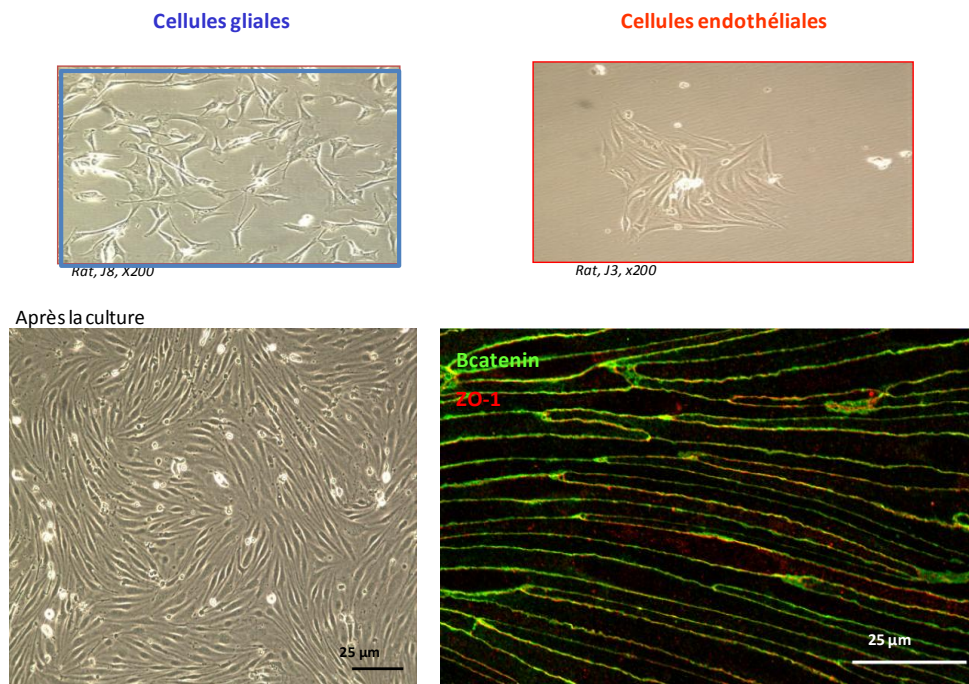
**Figure 37 : Schéma du modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique**

*Le modèle in vitro de BHE est caractérisé par une co-culture de cellules endothéliales et de cellules gliales primaires de rat. Le système expérimental définit deux compartiments, l'un apical mimant le compartiment sanguin et l'autre basolatéral mimant le parenchyme cérébral, séparés par une membrane poreuse semi-perméable.*

A J-1, les cellules gliales (encadrées en bleu sur la Figure 38) sontensemencées à 20 000 cellules par puits dans 1 ml dans des puits de plaque 12 puits dans le milieu glial décrit précédemment. Si les cellules sontensemencées à J-2 ou J-3, elles sont disposées à 15 000 cellules/puits dans 1 ml ou 12 000 cellules/puits dans 1 ml respectivement.

Le jour de l'ensemencement de la co-culture, les inserts ou Transwell sont enduits d'une solution de collagène de type IV (2 heures, 150 µl) à 0.1 mg/ml dans l'eau et 1 heure par 150 µl d'une solution de fibronectine à 10 µg/ml. Puis, les cellules endothéliales primaires de rat (encadrées en rouge sur la Figure 38) sont comptées dans le bleu trypan etensemencées à 80 000 cellules/puits dans 500 µl de milieu endothélial incomplet : milieu EBM-2 supplémenté par le kit EGM-2 MV Single Quots mais sans l'aliquot de VEGF. L'entretien des barrières se fait tous les 2 ou 3 jours par le remplacement des 500 µl de milieu endothélial sans VEGF et de 750 µl de milieu « glial » (cf § 3.4.1.1 et 3.4.1.2).





**Figure 38 A : Co-culture de cellules endothéliales et gliales**

*Les cellules gliales (encadré bleu) sont des cellules étoilées dont la fonction est d'induire l'expression de protéines de jonction comme les  $\beta$ -caténines ou la zonula occludens 1 chez les cellules endothéliales (encadré rouge et immunofluorescence) qui sont des cellules fusiformes et étroites.*

#### 3.4.1.4 Validation des BHE

Le modèle de BHE que nous utilisons a déjà fait l'objet d'une validation *in vivo* et présente les principales caractéristiques de la BHE *in vivo* <sup>268</sup>.

La validation des BHE lors de la réalisation de nos expériences est un test de passage qui permet de mesurer l'intégrité et la fonctionnalité des BHE obtenues *in vitro*. Il repose sur le passage de molécules radiomarquées :

- le <sup>14</sup>C-sucrose, une molécule non transportée par les cellules et qui ne peut franchir la barrière que dans le cas où il y a une perte d'intégrité et des jonctions serrées
- le <sup>3</sup>H-propranolol, une molécule qui subit un passage passif et qui doit donc franchir la barrière
- la <sup>3</sup>H-vinblastine, une molécule effluée c'est-à-dire qu'elle est prise en charge par les protéines d'efflux qui lui font passer la barrière dans le sens apical vers basolatéral ainsi que dans le sens basolatéral vers apical.

Les molécules sont solubilisées dans un tampon de transfert mis au point au laboratoire <sup>269</sup>. Il est constitué de 151 mM de NaCl, 5.2 mM de KCl, 2.16 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.42 mM de MgCl<sub>2</sub>, 6.0 mM de NaHCO<sub>3</sub>, de 3.1 mM de glucose et de 5 mM d'HEPES. Ce tampon est filtré sur une membrane de porosité 0.22 µm et il est conservé à +4°C pendant au maximum un mois.

Les inserts, sur lesquels ont été cultivées les monocouches endothéliales en co-culture avec les cellules gliales, sont transférés sur une plaque 12 puits et le milieu de culture est enlevé. Les molécules en solution dans le tampon de transfert sont incubées dans les compartiments appropriés (500 µl en apical ou 1500 µl en basolatéral) pendant 60 minutes à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub>. L'autre compartiment est rempli avec du tampon de transfert vierge (500 µl en apical ou 1500 µl en basolatéral). Chaque condition expérimentale est testée en triplicat. A l'arrêt de l'incubation, 100 µl de chaque compartiment est prélevé et transféré dans des tubes avec 4 ml de liquide de scintillation. Le comptage de la radioactivité des échantillons se fait par un compteur à scintillation étalonné sur les conditions <sup>14</sup>C ou <sup>3</sup>H comme approprié.

La validation de la barrière repose sur le calcul des bilans expérimentaux ou « recovery » ainsi que des constantes de perméabilité. Les bilans expérimentaux sont calculés comme la somme des quantités de matière dans les deux compartiments rapporté à la quantité de matière déposée initialement. Ce bilan doit être compris entre 80 et 120% pour que le puits soit considéré dans l'analyse. On considère dans ces calculs le nombre de désintégrations radioactives par minute (dpm) qui représente l'activité du radioélément dans les compartiments. Dans un second temps, la constante de perméabilité apparente (P<sub>app</sub>), de chaque molécule radiomarquée (S pour <sup>14</sup>C-sucrose, P pour <sup>3</sup>H-propranolol et V pour <sup>3</sup>H-vinblastine) est calculée selon la formule suivante :

$$P_{app} = \frac{[dpm_{basolatéral}] \times V_B}{[t_{incubation}] \times S_{filtre} \times [dpm_{initial}]}$$

Où [dpm<sub>basolatéral</sub>] représente le nombre de désintégrations par minutes détectées dans le compartiment basolatéral, V<sub>B</sub> le volume du compartiment basolatéral (en cm<sup>3</sup>), t<sub>incubation</sub> le temps d'incubation en secondes, S<sub>filtre</sub> la surface du filtre en cm<sup>2</sup> et dpm<sub>initiale</sub> le nombre de désintégrations par minutes à T0.

Pour la vinblastine qui est une molécule effluée, on calcule le ratio de la P<sub>app</sub> Apical vers Basolatéral divisée par la P<sub>app</sub> Basolatéral vers Apical. Les limites de validation sont indiquées dans le Tableau 4.

Molécule testée	Sens d'incubation	Concentration radioactive	Limite de validation
<sup>14</sup> C-sucrose	Apical vers Basolatéral	0,1 µCi/ml	$P_{app} S < 5.10^{-6}$ cm/s
<sup>3</sup> H-propranolol	Apical vers Basolatéral	1 µCi/ml	$P_{app} P > 16.10^{-6}$ cm/s
<sup>3</sup> H-vinblastine	Apical vers Basolatéral Basolatéral vers Apical	0,1 µCi/ml	Ratio V > 2

Tableau 4 : Paramètres de validation des BHE

### 3.4.1.5 Suivi de l'intégrité des monocouches endothéliales au jaune de Lucifer

Une solution de jaune de Lucifer (Lucifer Yellow, LY) est préparée dans du tampon de transfert (cf Méthodes expérimentales, §3.4.1.4) à la concentration de 100 µM. L'incubation se fait dans le sens Apical vers Basolatéral en même temps que l'incubation des composés dont on veut vérifier l'absence de conséquence sur l'intégrité de la monocouche endothéliale. A la fin de l'incubation, 100 µl des compartiments apicaux et basolatéraux sont prélevés et transférés dans une plaque noire 96 puits pour lecture de la fluorescence. La détection utilise une longueur d'onde d'excitation de 426 nm et une longueur d'onde d'émission de 538 nm. La quantification de la concentration en LY présente dans les compartiments utilise une gamme en LY dans le tampon de transfert (concentration des points de gamme : 0.06 ; 0.12 ; 0.3 ; 0.6 ; 1 ; 1.5 ; 2 ; 4 ; 20 ; 40 ; 55 ; 80 et 100 µM) ainsi que des points de contrôle qualité (concentration des QC : 0.18 ; 0.9 ; 1.6 ; 6 ; 50 ; 75 µM) qui permettent de vérifier la droite de calibration utilisée. Pour chaque puits testé, les bilans expérimentaux sont calculés comme la somme des quantités de matière dans les deux compartiments rapportée à la quantité de matière déposée initialement, qui doit être comprise entre 80 et 120%.

Dans un second temps, la constante de perméabilité  $P_{app}$  du LY est calculée selon la formule suivante :

$$P_{app} LY_{A \rightarrow B} = \frac{[LY_{basolatéral}] \times V_B}{t_{incubation} \times S_{filtre} \times [LY_{initiale}]}$$

Où  $[LY_{basolatéral}]$  représente la concentration en LY dans le compartiment basolatéral,  $V_B$  le volume du compartiment basolatéral (en  $cm^3$ ),  $t_{incubation}$  le temps d'incubation en secondes,  $S_{filtre}$  la surface du filtre en  $cm^2$  et  $LY_{initiale}$  la concentration en LY déposée à T0.

Les  $P_{app}$  LY inférieures à  $5.10^{-6}$  cm/s indiquent que les barrières sont intègres et les  $P_{app}$  LY supérieures à  $7.10^{-6}$  cm/s indiquent qu'il y a eu rupture des monocouches endothéliales.

### **3.4.2 Passage de molécules à travers le modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique**

#### **3.4.2.1 A travers la monocouche endothéliale seule**

Les expérimentations de passage de molécules à travers la monocouche endothéliale consistent à transférer les inserts sur lesquels ont été cultivées les cellules endothéliales pendant 12 ou 13 jours. Les solutions-test sont préparées dans du tampon de transfert (cf §3.4.1.4) et incubées dans le compartiment apical (pour le sens apical vers basolatéral, soit sang vers cerveau) ou dans le compartiment basolatéral (pour le sens inverse cerveau vers sang) à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub>.

Ce protocole a été exploité lors des expérimentations :

- de passage de la créatine (concentrations comprises entre 0.5 et 2000 µM) chargée avec une concentration de 0.5 µM en <sup>14</sup>C-créatine, pendant 120 minutes
- d'inhibition du passage de la créatine (concentration 5, 100 et 2000 µM) en présence d'un inhibiteur spécifique du SLC6A8, le GPA, à la concentration de 5 ou 50 µM ou de cyclosporine, inhibiteur des pompes d'efflux, à la concentration de 1.3 µM

#### **3.4.2.2 Dans le modèle en co-culture (cellules endothéliales et astrocytaires)**

Les milieux présents dans les compartiments apicaux et basolatéraux sont ôtés délicatement et remplacés par les solutions d'incubation appropriées. Dans ce cadre, seul le passage apical vers basolatéral a été considéré car l'efflux ne peut être étudié du fait de la présence des cellules gliales qui internalisent une partie du produit.

Ce modèle a été exploité dans l'étude du passage de la BHE par les esters de créatine et des NCL-amiodarone. En effet, l'intérêt était de franchir la BHE mais également d'étudier l'entrée des molécules dans le parenchyme cérébral mimé par les cellules gliales.

##### ❖ Passage des esters de créatine

Le passage des esters de créatine a été testé aux concentrations de 10 µg/ml et 1 µg/ml et le passage des NCL-C12 aux concentrations de 2, 5 et 10 mg/ml pendant 60 minutes, en solution dans le tampon

de transfert (cf Méthodes expérimentales §3.4.1.4). Les échantillons issus de ce passage sont traités de la façon suivante : les surnageants (S) sont dilués immédiatement au 1/5<sup>ème</sup> dans un mélange constitué de 95% d'acétonitrile et 5% d'acide formique et les cellules sont lavées 3 fois au PBS 37°C, subissent une étape de congélation/décongélation avant d'être lysées dans 100 µl d'un mélange à 20% d'eau, 76% d'acétonitrile et 4% d'acide formique. Une centrifugation à 13000 g pendant 10 minutes à +4°C permet de récupérer le surnageant (s). Les esters de créatine sont ensuite quantifiés dans ces surnageants (S) et (s) par HPLC-MS/MS (cf Méthodes expérimentales, §3.2) et les résultats sont exprimés en quantité de molécule associée aux cellules par mg de protéines. Pour cela, les protéines présentes dans les lysats cellulaires sont dosées selon la technique de Bradford (1 µl d'échantillon + 250 µl de réactif) par lecture de l'absorbance à 595 nm par un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés selon la  $DO_{(595\text{ nm, échantillon})} - DO_{(595\text{ nm, mélange 20/76/4})}$ . La quantification protéique absolue est faite en fonction de la régression linéaire calculée à partir d'une gamme d'albumine sérique bovine (BSA) entre 0.5 et 4 mg/ml. La présence de solvant organique dans les échantillons peut conduire à des interférences dans le dosage protéique par Bradford. Nous avons donc au préalable confirmé que nos conditions expérimentales de lyse cellulaire n'induisaient pas de biais dans la quantification protéique.

#### ❖ Passage des NCL-amiodarone

Le passage des NCL-amiodarone a été testé aux concentrations de 0.1 et 0.5 mg/ml dans le milieu de culture endothélial sur des durées d'incubation de 4, 24, 48 et 96 heures et l'amiodarone en solution à des concentrations de 0.05 et 1 µM pendant des temps d'incubation de 4, 24 et 96 h. Les solutions déposées et les échantillons issus de ce passage sont traités de la façon suivante : les surnageants sont dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans du méthanol et les cellules sont lysées dans un mélange constitué de 20% d'eau et 80% de méthanol. L'amiodarone est ensuite quantifiée par UPLC-MS/MS (cf Méthodes expérimentales §3.3.2.2) et les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose initiale contenue dans la solution déposée.

### **3.4.3 Internalisation des NCL-amiodarone dans les cellules gliales primaires de rat**

Les cellules gliales ont étéensemencées à 80 000 cellules/puits de plaque 12 puits dans 1 ml de milieu de cellules gliales suivis de 4 jours de culture afin d'évaluer l'efficacité de différentes techniques de lyse par des solvants organiques.

Ces cellules ont ensuite été traitées par 700 nM d'amiodarone ou 0.1 mg/ml de NCL-amiodarone-PegInsuline en solution dans de l'HBSS. Après 3 lavages au PBS 37°C, 3 lysés cellulaires ont été étudiées : par un mélange au 1/5<sup>ème</sup> d'eau et de méthanol ; par un mélange au 1/5<sup>ème</sup> d'eau et d'acétonitrile et par un cycle de congélation-décongélation suivi par un mélange au 1/5<sup>ème</sup> d'eau et de méthanol. Les signaux en amiodarone de chaque lysat cellulaire ainsi que dans les surnageants et les solutions déposées ont été quantifiés par la méthode UPLC-MS/MS mise au point et décrite dans Méthodes expérimentales §3.3.2.2. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la dose initiale contenue dans les solutions déposées.

### **3.4.4 Modèle de culture primaire de neurones**

#### **3.4.4.1 Préparation des supports de culture**

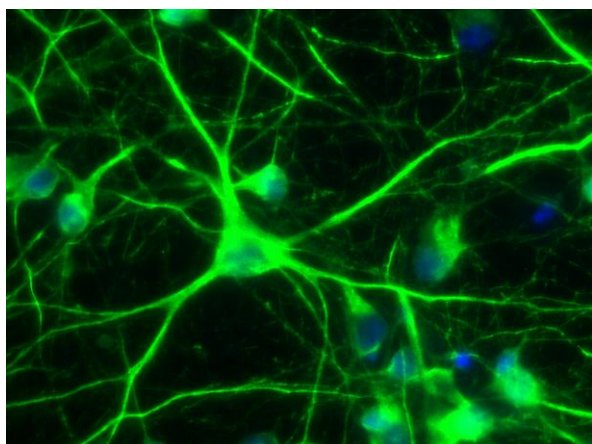
Afin de permettre aux neurones corticaux d'adhérer dans les puits des plaques de culture, ceux-ci sont recouverts de poly-D-lysine 50 µg/ml dissoute dans du tampon borate (50 mM acide borique, 13 mM borax, pH 8.5) ; ceci est réalisé à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les puits sont abondamment rincés à l'eau distillée stérile et remplis de milieu d'ensemencement, constitué de DMEM supplémenté avec 10% de sérum de cheval.

#### **3.4.4.2 Mise en culture des neurones corticaux**

Les neurones corticaux sont prélevés dans des cerveaux d'embryons de rat OFA (Oncins France Strain A, CRF) au 18<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire, conformément à la Directive n°86/609 du Conseil de la Communauté Européenne.

La femelle gestante est anesthésiée à l'isoflurane avant la décapitation. L'utérus contenant les embryons est prélevé par laparotomie, puis placé dans une boîte contenant du HBSS 37°C (concentré une fois et supplémenté avec 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4). Les embryons sont transférés dans une nouvelle boîte avec du HBSS 37°C, où ils sont décapités. Les cerveaux sont extraits des boîtes crâniennes. Par observation sous loupe binoculaire, les hémisphères cérébraux sont séparés puis les méninges soigneusement enlevées ; les hippocampes sont éliminés et les cortex peuvent alors être prélevés. Ils sont placés au fur et à mesure dans du HBSS 37°C. Après trois rinçages à l'HBSS 37°C, les cortex sont incubés pendant 15 min à 37°C dans 0.25% trypsine-EDTA supplémentée avec

15 mM HEPÈS et 33 mM glucose. Ils sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS 37°C. La trypsine est ensuite inhibée pendant 3 minutes à 37°C avec 2 mg/ml d'inhibiteur de trypsine, supplémenté avec 150 U/mL de DNase afin de digérer l'ADN des cellules lysées pendant la dissection, et faciliter la dissociation mécanique. Les cortex sont ensuite lavés deux fois à l'HBSS 37°C et triturés dans 3 mL d'HBSS 37°C, avec une pipette de 5 mL puis de 1000 µL. Les neurones sont comptés sur lame de Malassez et semés à la densité de  $10^5$  cellules par centimètre carré, dans les puits préalablement recouvert de poly-D-lysine. Le milieu d'ensemencement, constitué de DMEM supplémenté avec 10% de sérum de cheval est remplacé deux heures plus tard par le milieu de culture, constitué de Neurobasal supplémenté avec du B27 concentré une fois, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate de sodium, et 10 U/mL Pénicilline/Streptomycine/Néomycine. Quatre jours après la mise en culture, un antagoniste pyrimidique, la cytosine-β-D-arabinoose (AraC) est ajouté au milieu (3 µM) afin de stopper la division des cellules gliales présentes dans la culture de neurones. Tous les quatre jours, un quart de milieu de culture est ajouté à la culture afin de fournir de nouveaux nutriments aux neurones en développement.



**Figure 38 B : Neurones corticaux**

*Immunofluorescence : marquage MAP2 spécifique des neurones (en vert) et DAPI (noyaux, en bleu).*

### **3.4.5 Internalisation des esters de créatine et des NCL-C12 dans les neurones de rat en culture primaire**

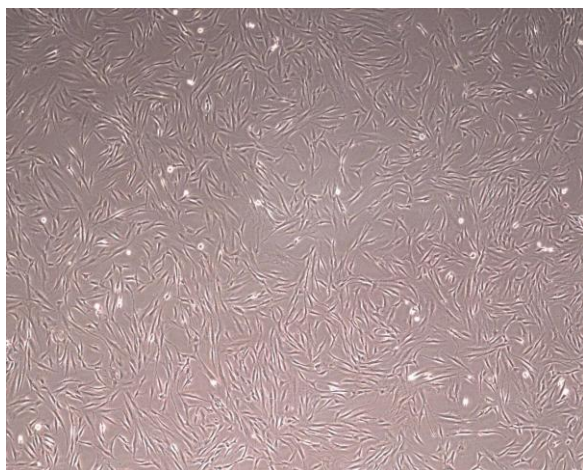
Dix jours après la mise en culture (*days in vitro* DIV 10), le milieu de culture est retiré et remplacé par de l'HBSS dans lequel les produits à tester sont solubilisés, les esters de créatine à la concentration 1 et 10 µg/ml et les NCL-C12 aux concentrations de 5, 10 et 20 mg/ml. L'incubation est réalisée à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> pendant 60 minutes. Les échantillons des solutions

déposées, des surnageants et des lysats cellulaires sont traités comme indiqué dans Méthodes expérimentales, §3.4.2.2.

### 3.4.6 Modèle de culture primaire de fibroblastes humains

Les fibroblastes humains ont été obtenus à partir de biopsies de peau réalisées chez des enfants, grâce à une collaboration avec les Pr Pascale de Lonlay et Dr Vassili Valayannopoulos du Centre de Référence des Maladies héréditaires du Métabolisme de l'Enfants et de l'Adulte à l'hôpital Necker. Ces cellules sont utilisées pour la caractérisation de la pathologie du déficit en transporteur de la créatine (cf §1.1.4.4). Quatre fibroblastes sont ainsi testés dans cette étude : DTp1, VLp2 et CTp3, qui proviennent tous les trois d'enfants atteints du déficit en transporteur de la créatine, et un sujet contrôle K, qui provient d'un enfant non atteint de cette pathologie. Les patients DTp1 (mutation p.Asn336del ; c.1006\_1008delAAC) et VLp2 (p.Gly499del ; c.1497\_1500delGAG) sont décrits comme les patients P3 et P4 respectivement dans Valayannopoulos et al.<sup>270</sup> et le patient CTp3 (p.G414del ; c.1221\_1223delTTC) est décrit dans Valayannopoulos et al. (P2)<sup>156</sup>.

L'ensemencement des fibroblastes pour les expérimentations d'incorporation a été réalisé en plaque 6 puits à 3 000 cellules par puits dans 3 ml de milieu DMEM supplémenté à 10% SVF, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate et 1% de mélange antibiotique PSN. La culture est maintenue pendant 6 jours jusqu'à l'obtention d'une confluence cellulaire comprise entre 80 et 90%. Le changement de milieux se fait tous les 2 à 3 jours par le renouvellement de la moitié du milieu. Les cellules ont été utilisées au passage 4 pour VLp2, 7 pour CTp3 et 8 pour le contrôle K et DTp1.



**Figure 38 C : Fibroblastes**

*Observation au microscope à contraste de phase*

*Grossissement : x40.*



### **3.4.7 Internalisation de l'ester dodécylique de créatine et des NCL-C12 dans les fibroblastes humains**

Une fois à confluence, les expérimentations d'internalisation de l'ester dodécylique ou des NCL-C12 sont menées en remplaçant le milieu de culture par 3 ml d'HBSS dans lesquels sont solubilisés les produits à tester. L'incubation est réalisée à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> pendant 60 minutes. Les solutions déposées et les surnageants sont dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans un mélange constitué à 95% d'acétonitrile et à 5% d'acide formique et stockés immédiatement à -20°C. Les cellules sont lavées trois fois au PBS 37°C puis subissent un cycle de congélation-décongélation avant d'être lysées par 250 µl d'un mélange à 20% d'eau, 76% d'acétonitrile et 4% d'acide formique. L'ester dodécylique de créatine est alors quantifié comme indiqué dans Méthodes expérimentales, §3.4.2.2.

### **3.4.8 Tests de viabilité des cellules après traitement avec les esters de créatine ou les NCL**

Les tests du MTT et du LDH visent à évaluer si les esters de créatine ou les NCL induisent une toxicité cellulaire au niveau de la fonction mitochondriale.

#### **3.4.8.1 Test de cytotoxicité au MTT**

Le test de cytotoxicité au MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) permet une quantification rapide et sensible de la viabilité cellulaire des cellules endothéliales, astrocytaires et fibroblastiques. En effet, ce test est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriale cellulaire. Il est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale : la succinate deshydrogénase. Cette enzyme transforme les sels de tétrazolium du substrat MTT (en cristaux insolubles de formazan, dont on peut suivre la production par spectrophotométrie UV à 550 nm.

- Cas des cellules endothéliales et gliales : le test au MTT a été réalisé sur le modèle de BHE.
- Cas des fibroblastes humains : le test a été réalisé en plaque 96 puits. Pour cela, les cellules ont étéensemencées à 3000 cellules par puits dans 200 µl de milieu DMEM supplémenté et cultivées pendant 6 jours.

Une solution mère de MTT est préparée à une concentration de 5 mg/ml (dite 5X) dans du tampon PBS. Cette solution est conservée pendant maximum 1 mois à +4°C. Après chaque incubation avec les conditions dont on veut tester l'impact sur la viabilité cellulaire (cf Méthodes expérimentales, §3.4.2.2 et 3.4.7), le surnageant est ôté des puits de culture. La solution de MTT est ajoutée à 1 mg/ml (1X) final dans un volume adapté au format de plaque utilisé (100 µl dans des puits de plaques 96 puits, 300 µl dans le compartiment apical du modèle BHE et 700 µl dans le compartiment basolatéral du modèle BHE). L'incubation se déroule à 37°C dans une atmosphère chargée à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4h. On contrôle alors visuellement la présence ou l'absence des cristaux de formazan, puis on enlève délicatement la solution de MTT. On ajoute alors un volume équivalent de DMSO 100% et on incube 5 minutes. Après une homogénéisation par allers-retours à la micropipette, on transfère 100 µl de surnageant dans une plaque 96 puits et la densité optique (DO) est lue par un spectrophotomètre UV à 550 nm et à 650 nm. Les résultats sont calculés comme la  $DO_{(550\text{ nm})} - DO_{(650\text{ nm})}$  exprimée en pourcentage de la condition contrôle. Les produits sont considérés comme non toxiques si le résultat obtenu est au moins égal à 80% du contrôle.

### 3.4.8.2 Test de cytotoxicité au LDH

Le test de cytotoxicité au LDH permet une quantification rapide et sensible de la viabilité cellulaire des neurones. En effet, ce test est un indicateur de l'activité mitochondriale cellulaire. Il est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale : la lactate deshydrogénase. Cette enzyme permet la conversion du pyruvate en lactate et notamment transforme NAD en NADH, dont on peut suivre la production par spectrophotométrie à 450 nm. Cette enzyme est libérée dans les situations de lyse cellulaire.

Après l'incubation avec les conditions dont on veut tester l'impact sur la viabilité cellulaire (cf Méthodes expérimentales §3.4.5), 100 µl est ôté de chaque puits de culture. Une centrifugation est réalisée à 10 000 g pendant 15 minutes à +4°C. 75 µl du surnageant sont transférés dans une plaque 96 puits et 150 µl du mélange « LDH assay » est ajouté pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. 150 µl d'HCl 1N permettent de stopper la réaction. La densité optique (DO) est ensuite lue par un spectrophotomètre à 490 nm et à 690 nm. Les résultats sont calculés comme la  $DO_{(490\text{ nm})} - DO_{(690\text{ nm})}$  exprimée en ratio par rapport à la condition contrôle. Un ratio inférieur ou égal à 1 indique une absence de toxicité cellulaire.

### **3.4.9 Dosage des concentrations endogènes de créatine dans les cellules endothéliales, gliales, neuronales et fibroblastiques**

Les concentrations endogènes de créatine dans les lysats cellulaires ont été évalués après 13 et 14 jours de culture pour les cellules endothéliales et gliales du modèle de BHE de rat respectivement, 10 jours de culture pour les cellules neuronales de cortex de rat et 6 jours pour les fibroblastes humains. Les tapis cellulaires sont contrôlés au microscope afin d'en évaluer la confluence. Le surnageant est retiré des puits de culture et les tapis cellulaires sont lavés 3 fois au PBS 37°C (1 fois seulement pour les tapis cellulaires neuronaux pour limiter la mort neuronale). Les cellules sont ensuite lysées par un mélange constitué de 20% d'eau, 76% d'acétonitrile et 4% d'acide formique dans 100 µl par puits de plaque 12 puits ou 250 µl par puits de plaque 6 puits rapidement afin de limiter l'évaporation du solvant. Egalement, le contenu en créatine des différents milieux de culture (milieu endothélial, milieu glial, milieu neurobasal et milieu DMEM pour fibroblastes) ainsi que des surnageants de culture prélevés précédemment est déterminé. Les échantillons de milieu de culture et de surnageant sont dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans un mélange 95% d'acétonitrile et 5% d'acide formique. Dans les deux cas, une centrifugation est réalisée à 13 000 g pendant 10 minutes à +4 °C. Le surnageant est prélevé et la créatine est quantifiée par HPLC-MS/MS sur la méthode analytique isocratique en 40/60 décrite dans Méthodes expérimentales §3.2.

### **3.4.10 Contrôle de l'activité des estérases cellulaires**

L'activité des estérases cellulaires a été évaluée dans les quatre types cellulaires (cellules endothéliales, gliales, neuronales et fibroblastes) d'après les travaux d'Anderson et al.<sup>271</sup> Pour cela, 20 µg de solutions protéiques de chaque type cellulaire ont été incubés avec une solution à 3.5 mM de 4-nitrophényl acétate (PNA) à 32 °C. Nous suivons la conversion du PNA en p-nitrophénol qui traduit l'activité estérasique au cours du temps par lecture de l'absorbance à 405 nm à différents points de cinétique.

## 3.5 Expression des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de la créatine et pour le transporteur de la créatine SLC6A8

Dans le but de déterminer l'expression des gènes d'intérêt, les transcrits (ARNs) sont isolés à partir des cellules. Par rétro-transcription, on obtient à partir de ceux-ci l'ADN complémentaire (ADNc) à partir duquel on peut identifier et quantifier les gènes d'intérêt après amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-qPCR).

### 3.5.1 Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir de morceaux de tissus, de microvaisseaux, de cellules endothéliales et gliales en passage 1 décongelées ou de cellules endothéliales et gliales en co-culture dans le modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique pendant 11 à 15 jours. Elle est réalisée grâce à l'utilisation de deux kits commerciaux : RNeasy mini kit et RNeasy fibrous tissue mini kit (QIAGEN).

La purification d'ARN à partir de tissu (muscle squelettique de rat) nécessite une étape préalable d'homogénéisation tissulaire. Trente mg de tissu sont disposés dans un tube Precellys contenant 50 billes de céramique de 1.4 mm avec un volume de 300 µl de tampon RLT (RNeasy fibrous tissue mini kit) chargé à 1% de β-mercaptoéthanol. Une étape de dissociation est réalisée par l'homogénéiseur Precellys-24 en 20 secondes à 5000 rpm en un cycle. Après l'ajout de 590 µl d'eau RNase-free et de 10 µl de protéinase K, une incubation de 10 min à 55°C dans un bain à sec est réalisée. Une centrifugation pendant 3 minutes à 10000 g à température ambiante permet de récupérer le surnageant auquel 0.5 volume d'éthanol 100% est ajouté. Le milieu est homogénéisé par allers-retours à la pipette et transféré sur une colonne de liaison par tranches de 700 µl et centrifugé 15 secondes à 13000 g à température ambiante.

Pour les autres types d'échantillons (lysats de cellules endothéliales et gliales après 13 jours de co-culture, lysat de cellules neuronales après 10 jours de culture et lysat de cellules fibroblastiques après 6 jours de culture), la première étape de l'extraction des ARNs totaux repose sur la lyse directe des cellules. On incube pendant 2 à 5 minutes avec un volume adapté de tampon de lyse commercial

chargé à 1% de  $\beta$ -mercaptoéthanol (600  $\mu$ l par culot de microvaisseaux, 175  $\mu$ l par puits de plaque). Le lysat cellulaire est ensuite homogénéisé afin de diminuer la viscosité des lysats et d'augmenter l'efficacité de la purification d'ARN. Ceci se réalise dans nos conditions expérimentales d'une part grâce à un passage à travers une aiguille de 0.7 mm et une seringue de 1 ml et d'autre part grâce au dépôt sur une colonne d'homogénéisation QIAshredder violette suivi d'une centrifugation à 13 000 g pendant 2 minutes à température ambiante. Un volume équivalent d'éthanol 70% est ajouté à l'éluat obtenu. Ce mélange est ensuite déposé sur colonne de liaison par tranches de 700  $\mu$ l et centrifugé 15 secondes à 13 000 g à température ambiante.

Dans les deux cas, la colonne de liaison est ensuite lavée par un tampon commercial RW1 (RNeasy mini kit) et les ARNs sont digérés pendant une incubation de 15 minutes à la DNase I à 340 Unités/ml dans un tampon commercial RDD (Qiagen). Les ARNs sont ensuite lavés quatre fois grâce à un tampon commercial RPE puis séchés par une centrifugation bouchon ouvert. L'éluat des ARNs se déroule en une dernière étape de centrifugation dans l'eau.

Les ARNs totaux ainsi obtenus sont ensuite dosés par spectrophotométrie UV-Visible afin de connaître leur concentration. Trois mesures sont réalisées à 230, 260 et 280 nm. La longueur d'onde 260 nm correspond à l'absorbance des ARNs et 280 nm à celle des protéines. Le ratio 260/280 sera donc un bon indicateur de la qualité de la purification des ARNs, il est compris entre 1.8 et 2.0. La longueur d'onde 230 nm représente l'absorbance d'impuretés liés au protocole expérimental utilisé et notamment à la contamination par le thiocyanate de guanidine qui est un constituant du tampon de lyse. Le ratio 260/230 doit être également supérieur à 2.0 afin de valider les lavages réalisés au cours du protocole. Nous avons ainsi eu besoin d'augmenter le nombre de lavages afin de respecter cette règle.

### **3.5.2 Amplification génique par RT-qPCR**

La rétro-transcription permet d'obtenir de l'ADN double brin à partir de mono brins d'ARN. L'ADN est alors dit complémentaire (ADNc) et peut être utilisé pour l'amplification génique. Le protocole suivi est celui fourni avec le kit RT<sup>2</sup> First Strand (SABiosciences). 1  $\mu$ g d'ARN est rétro-transcrit selon ce protocole.

La bonne qualité des ARNs extraits et des ADNs synthétisés est analysée par une PCR spécifique (RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array) utilisant les amorces indiquées dans le Tableau 7A. Les paramètres de contrôle qualité pris en compte dans cette étude sont présentés dans le tableau 7B.

A :		B :	
ACTB	Gène de ménage de haut niveau d'expression	Transcription inverse	$Ct_{RTC} - Ct_{PPC} < 5$
HPRT1	Gène de ménage de bas niveau d'expression	Contrôle positif de PCR	$Ct_{PPC} = 20 \pm 3$
RTC	Contrôle de transcription inverse	Contrôle d'absence d'ADN génomique	$Ct_{PPC, cDNA} - Ct_{PPC, eau} < 3$
PPC	Contrôle positif de PCR	Contrôle sans transcription inverse	$Ct_{GDC} > 32$
GDC	Contamination par de l'ADN génomique humain	Contrôle sans cDNA	$Ct_{NRT} \geq 32$
NRT	Contrôle de non transcription inverse		$Ct_{NTC} \geq 35$
PPC	Contrôle positif de PCR		
NTC	Contrôle sans matrice		

**Tableau 5 : Gènes de contrôle qualité des ARNs rétro-transcrit (A) et Paramètres de contrôle qualité indiquant une bonne qualité des ARNs (B)**

*Ct : cycle seuil*

L'amplification génique en temps réel, est effectuée dans des plaques 96 puits. Elle consiste en la réplication à la chaîne d'une séquence d'ADN par un enzyme, l'ADN polymérase. Le protocole suivi débute par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes suivi de 40 cycles comportant une étape de dénaturation (95°C pendant 15 secondes), une étape d'hybridation (60°C pendant 60 secondes) et une étape d'élongation (72°C pendant 30 secondes). La PCR en temps réel repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule « reporter » fluorescente : le SYBR Green, agent intercalant de l'ADN. La spécificité du signal obtenu est définie par la courbe de fusion post-PCR qui détermine les températures de fusion ( $T_m$  : « melting temperature »). Cette courbe est réalisée de 55 à 95°C, avec des incréments de 0,5°C toutes les 10 secondes.

La quantification des acides nucléiques a été faite de façon relative, c'est-à-dire par rapport à un gène de référence quantifié en même temps que le gène étudié (ici l'HPRT1 ou Hypoxanthine phosphoribosyltransférase-1). La quantification s'effectue donc selon la méthode comparative des Ct (« threshold cycles »), nombre de cycles seuil à partir duquel une amplification génique est détectée. Elle permet de calculer le nombre de molécules de gène contenues dans les cellules relativement au gène de référence selon la formule suivante :  $\Delta Ct = \Delta Ct (\text{gène d'intérêt}) - \Delta Ct (\text{gène de référence})$ . Les

niveaux relatifs d'expression d'ARN sont ensuite exprimés en fold-change (facteur de variation) calculés par le logiciel CFX Manager de Bio-Rad.

Les amorces utilisées dans cette étude proviennent toutes de SABiosciences (QIAGEN) et elles permettent l'amplification du gène codant pour le SLC6A8 (humain, référence : PPH01452B ; rat, référence : PPR44793B), pour l'enzyme AGAT (rat : PPR46519E), pour l'enzyme GAMT (rat : PPR48650A) et pour le gène de référence HPRT1 (humain : PPH01018C ; rat : PPR42247F).

Les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel Prism version 5.01 (GraphPad Software, Inc, San Diego SA). Les tests utilisés sont indiqués dans les légendes des figures correspondantes.

***CHAPITRE 4***  
***RESULTATS***

---





***PARTIE 1***

***SYNTHESE DES ESTERS DE CREATINE***

***ET EVALUATION DE LEURS PROPRIETES***

***PHARMACOLOGIQUES***

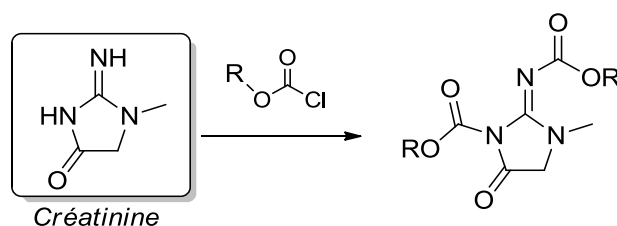
---



## 4.1 Synthèse des esters de créatine

### 4.1.1 Voie de synthèse des esters de créatine

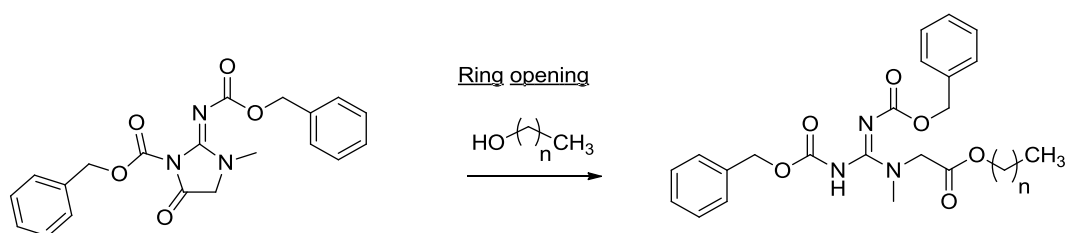
Nous avons développé une nouvelle voie de synthèse permettant la production des esters de créatine à chaîne grasse à partir de la créatinine. Celle-ci a fait l'objet d'un dépôt de brevet auprès de l'Office Européen des Brevets (cf p177) ainsi que d'une publication internationale dans un journal à comité de lecture (cf p221). Brièvement, cette voie de synthèse repose sur trois étapes successives. La première étape consiste en l'activation de l'électrophilicité du groupement carbonyle de la créatinine par di-protection du motif guanidine grâce au chloroformate de benzoyle (CBz) (Figure 39).



**Figure 39 : Protection du motif guanidine de la créatinine**

*Extrait de Trotier-Faurion et al., soumis au J. Med. Chem le 11 février 2013*

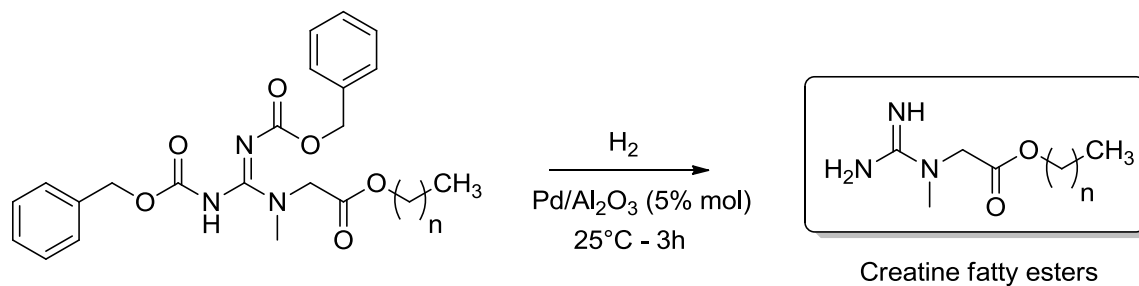
Cette créatinine, doublement protégée par des groupements benzoyles, subit ensuite une ouverture du cycle spontanée lorsqu'elle est dissoute dans un alcool gras (Figure 40). Le groupement hydroxyle de l'alcool effectue une attaque nucléophile sur le carbonyle de la créatinine diprotégée. Ceci se réalise à température ambiante pour l'ester méthylique di-protégé de créatine ou à 80°C pour les esters à plus longues chaînes.



**Figure 40 : Ouverture du cycle de la créatinine diprotégée et liaison ester avec l'alcool gras**

*Extrait de Trotier-Faurion et al., soumis au J. Med. Chem le 11 février 2013*

La dernière étape consiste à déprotéger la fonction guanidine des esters di-protégés de créatine (Figure 41) afin de libérer les esters gras de créatine. Nous l'avons réalisée par réaction avec du palladium sur alumine pendant 3h.



*Trotier-Faurion et al., soumis au J Med Chem le 11 février 2013*

Grâce à cette voie de synthèse, nous avons produit une chimiothèque de molécules d'esters gras de la créatine avec des chaînes carbonées saturées entre 2 à 18 carbones en faisant varier l'alcool gras utilisé (Tableau 6).

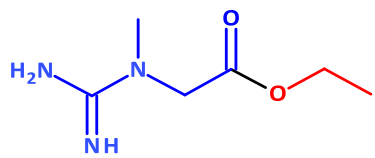
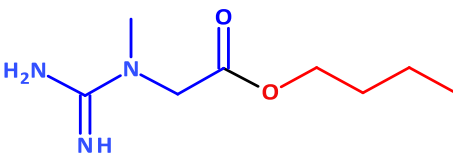
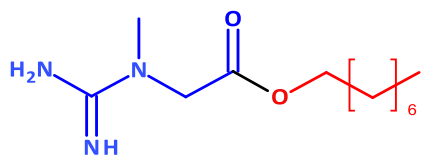
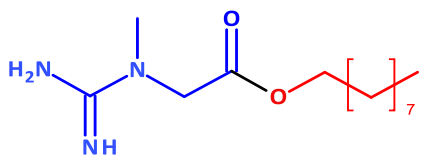
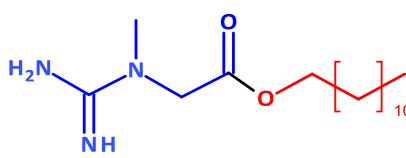
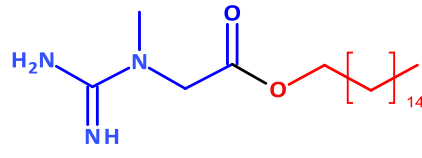
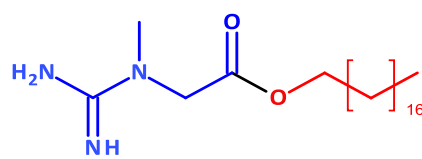
ester éthylique de créatine ou ethyl 2-(1-methylguanidino)acetate C2	
ester butylique de créatine ou butyl 2-(1-methylguanidino)acetate C4	
Ester octylique de créatine ou octyl 2-(1-methylguanidino) acetate C8	
ester nonylique de créatine ou nonyl 2-(1-methylguanidino) acetate C9	
ester dodécylique de creatine ou dodecyl 2-(1-methylguanidino)acetate C12	
Ester hexadécylique de créatine ou hexadecyl 2-(1- methylguanidino)acetate C16	
Ester octadécylique de créatine ou octadecyl 2-(1- methylguanidino)acetate C18	

Tableau 6 : Chimiothèque d'esters de créatine synthétisée selon la méthode décrite dans Trotier-Faurion et al., soumis au *J. Med. Chem*, 2013

## 4.1.2 Estimation des paramètres physico-chimiques des esters de créatine

Afin d'évaluer le potentiel des esters de créatine à franchir les membranes cellulaires et plus spécifiquement la barrière hémato-encéphalique, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des paramètres physico-chimiques de ces molécules. Dans ce contexte, les travaux de Charles Lipinski ont montré que, pour qu'une molécule présente des propriétés physico-chimiques favorables pour être un candidat médicament, sa masse molaire doit être strictement inférieure à 500 daltons, son logP strictement inférieur à 5 et le nombre de liaisons donneuses d'hydrogène et accepteuses d'hydrogène inférieur ou égal à 5 et 10 respectivement. Cette règle a été développée par la suite et les critères publiés adoptés de façon consensuelle sont publiés dans Pajouhesh et al.<sup>272</sup> :

- Poids moléculaire < 450
- clogP < 5
- nombre de donneur d'hydrogène < 3
- nombre d'accepteur d'hydrogène < 7
- nombre de liaison rotative < 8
- liaisons hydrogène < 8
- pKa neutre ou basique avec un pKa optimal entre 7.5 et 10.5
- Aire de la surface polaire < 60-70 Å

L'utilisation d'outils informatiques de prédiction des paramètres physico-chimiques (cf Méthodes expérimentales §3.1.3) nous a permis d'estimer théoriquement, pour chaque composé, la masse molaire, la formule brute, la composition chimique, la capacité de protonation (pKa), le coefficient de partage c'est-à-dire la balance hydrophilie/lipophilie, le nombre de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène ainsi que les aires de la surface polaire en 2D et en 3D. Ces informations ont été comparées à la molécule de référence : la créatine (Tableau 7).

Nous constatons que le greffage d'une chaîne carbonée saturée de longueur comprise entre 2 et 18 carbones sur le squelette de la créatine grâce à une liaison covalente de type ester conduit à une augmentation de la masse moléculaire (entre 159.19 pour l'ester éthylique et 383.61 daltons pour l'ester octadécylique), qui reste cependant toujours strictement inférieure à 450 daltons. Les structures synthétisées sont plus lipophiles que la créatine, le logP devient supérieur à 0 dès l'ester butylique de créatine contrairement à celui de la créatine qui est estimé à -1.22. Comme attendu, ce logP augmente également avec l'augmentation du nombre de carbones de la chaîne greffée jusqu'à atteindre une valeur de 5.59 et 6.47 pour les esters hexadécylique et octadécyliques de créatine respectivement. Par rapport à la « règle des 5 » de Lipinski, ces deux molécules devraient donc présenter un passage moins favorable à travers les membranes cellulaires.

Le nombre de donneurs d'hydrogène dans les esters de créatine est égal à 2 et le nombre d'accepteurs est égal à 3, ce qui est inférieur aux limites théoriques de 3 et 7 respectivement.

D'après Pajouhesh et al.<sup>272</sup>, le calcul « logP - nb d'accepteurs d'hydrogène » semble indiquer une propension de la molécule à franchir la BHE. Ces valeurs calculées pour les esters de la créatine comparées à celle de la créatine sont indiquées dans le tableau 3. Théoriquement, d'après Pajouhesh et al.<sup>272</sup>, ce paramètre est corrélé avec la capacité de la molécule à franchir de façon passive la BHE lorsqu'il est positif. Seules les structures obtenues en octyle, nonyle, dodécyle, hexadécyle et octadécyle présentent des valeurs positives.

En ce qui concerne la surface de l'aire polaire, le tableau 7 indique que les esters de la créatine présentent une surface polaire théorique de 81.15 Å<sup>2</sup>, quelle que soit la longueur de chaîne carbonée. Les articles de référence<sup>272</sup> s'accordent à dire que cette surface doit être au maximum de 60 à 90 Å<sup>2</sup> afin de favoriser l'internalisation cellulaire, ce qui est le cas pour l'ensemble des esters de la créatine mais pas pour la créatine (94.98 Å<sup>2</sup>).

En revanche, seule la créatine et les esters éthylique et butylique de créatine présentent un nombre de liaisons rotatives en accord avec les règles empiriques.

Enfin, il est intéressant de noter que ces prodrogues de créatine sont des molécules achirales puisqu'elles ne présentent pas de carbone asymétrique.



PARTIE 1 : Synthèse des esters de créatine et évaluation de leurs propriétés pharmacologiques

structure	Masse moléculaire <i>g/mol ou Da</i>	composition	formule brute	pKa	logP	nombre de donneurs hydrogène	nombre d'accepteurs hydrogène	liaison avec rotation	aire surface polaire (2D) Å <sup>2</sup>	aire surface polaire (3D) Å <sup>2</sup>	logP - nb accepteurs H
<b>Molécule de référence</b> créatine	131.13	C : 36.63% H : 6.92% N : 32.04% O : 24.4%	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	3.50 (acide carboxylique) 12.43 (guanidine)	-1.22	4	6	2	94.98	200.92	-5,22
<b>Chimiothèque : esters de créatine</b>	<b>C2</b>	C : 45.27% H : 8.23% N : 26.4% O : 20.1%	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.59	-0.72	2	3	4	81.15	269.96	-2,72
	<b>C4</b>	C : 51.32% H : 9.15% N : 22.44% O : 17.09%	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.42	0.25	2	3	6	81.15	331.23	-2,25
	<b>C8</b>	C : 59.23% H : 10.36% N : 17.27% O : 13.15%	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.27	2.03	2	3	10	81.15	454.14	0,03
	<b>C9</b>	C : 60.67% H : 10.57% N : 16.33% O : 12.43%	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.27	2.47	2	3	11	81.15	487.15	0,47
	<b>C12</b>	C : 64.17% H : 11.11% N : 14.03% O : 10.69%	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.27	3.81	2	3	14	81.15	575.99	1,81
	<b>C16</b>	C : 67.56% H : 11.62% N : 11.82% O : 9.00%	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.27	5.59	2	3	18	81.15	700.29	3,59
	<b>C18</b>	C : 68.88% H : 11.82% N : 10.95% O : 8.34%	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	11.27	6.47	2	3	20	81.15	758.60	4,47

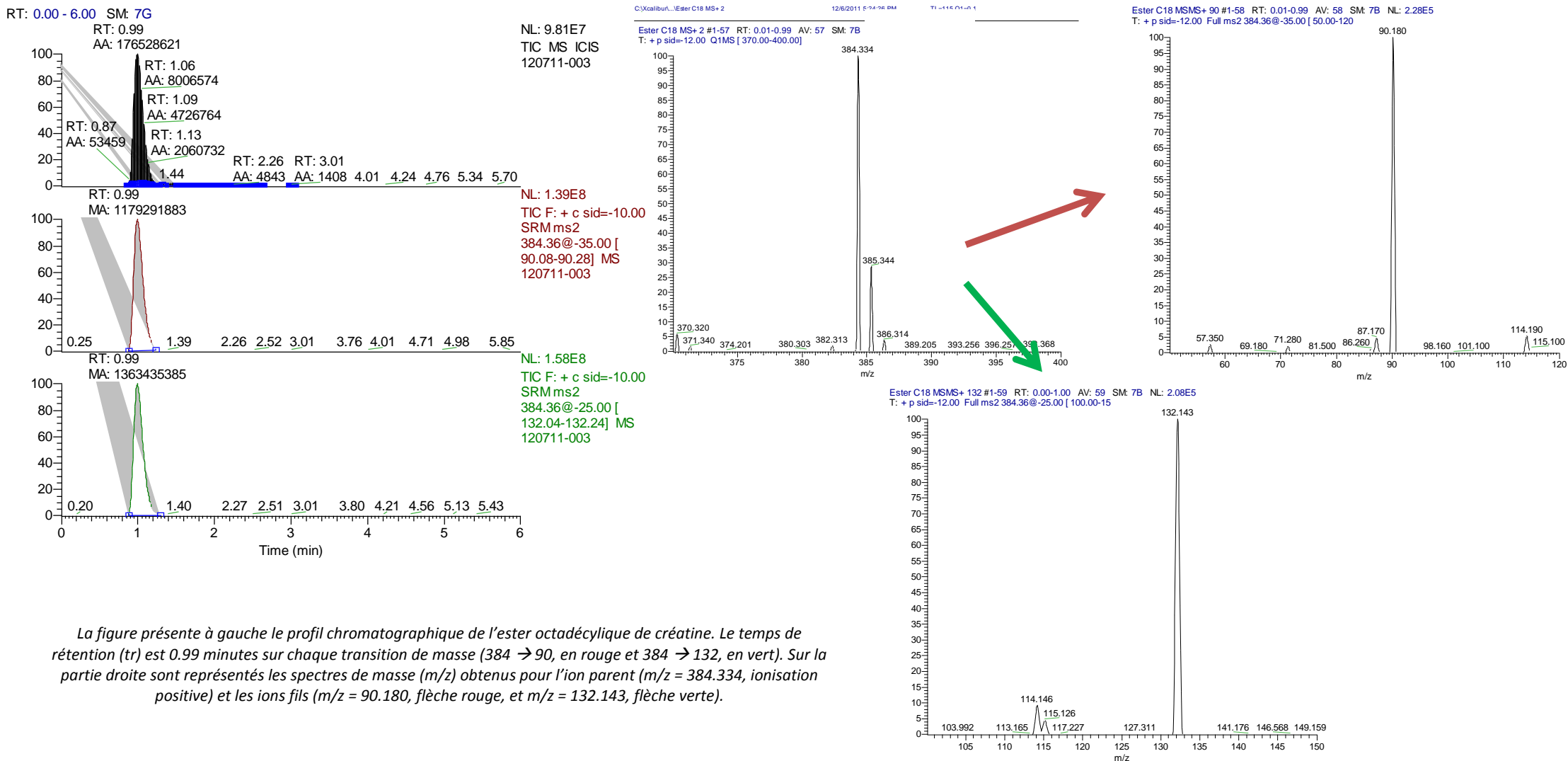
Tableau 7 : Estimation des paramètres physico-chimiques des esters de créatine (cf Méthodes expérimentales §3.1.3)

## 4.2 Identification et quantification des esters de créatine par HPLC-MS/MS

Les esters de créatine ont été identifiés dans les milieux biologiques d'intérêt grâce à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (pour le principe, voir Annexe 2). L'identification des esters de créatine a reposé sur deux séries successives de développement de méthodes analytiques. La première série de méthodes analytiques était basée sur la rétention des esters de créatine par la partie lipophile (longue chaîne carbonée). Les premiers essais en phase inverse sur des phases stationnaires greffées en C18 n'ont pas été concluants. En effet, nous avons constaté que les interactions fortes entre les molécules et la phase stationnaire empêchaient toute élution dans un temps inférieur à 20 min, ce qui n'était pas compatible avec des dosages d'échantillons biologiques. Nous avons par la suite testé des phases apolaires greffées avec des longueurs de chaînes carbonyle plus faible et nous avons rapidement constaté que chaque ester, au regard de sa longueur de chaîne carbonée, imposait un changement de colonne. Ainsi, une phase stationnaire greffée en C8 était compatible avec l'élution de l'ester octadécylrique mais elle s'avérait problématique pour la rétention des chaînes en dodécylrique et hexadécylrique qui présentaient des profils plus exploitables avec un greffage C4 BEH. Les esters à courtes chaînes (éthylrique) et la créatine nécessitaient une colonne en silice pure de type Hilic. Pour une même étude de relation structure-activité, le système LCMS devait donc être stoppé et les colonnes remplacées en fonction des analytes recherchés. Ceci était très contraignant en termes d'organisation et surtout cela limitait une comparaison fiable des résultats entre les différents esters.

Nous avons donc réalisé une seconde série de développements analytiques basés sur la rétention par un motif commun à toutes les structures chimiques : le motif guanidine selon la méthode décrite au paragraphe Méthodes expérimentales §3.2. A titre illustratif, la Figure 42 indique le profil chromatographique et les spectres de masse associés de l'ester octadécylrique de créatine.

PARTIE 1 : Synthèse des esters de créatine et évaluation de leurs propriétés pharmacologiques



La figure présente à gauche le profil chromatographique de l'ester octadécyle de créatine. Le temps de rétention (tr) est 0.99 minutes sur chaque transition de masse (384 → 90, en rouge et 384 → 132, en vert). Sur la partie droite sont représentés les spectres de masse (m/z) obtenus pour l'ion parent (m/z = 384.334, ionisation positive) et les ions fils (m/z = 90.180, flèche rouge, et m/z = 132.143, flèche verte).

Figure 42 : Profil chromatographique et spectres MS et MS/MS de l'ester octadécyle de créatine

### 4.2.1 Détermination des transitions spécifiques de chaque ester de créatine

Le mode Multiple Reaction Monitoring ou MRM a été utilisé pour la détection des transitions de chaque molécule (Tableau 8). Pour augmenter la spécificité, trois transitions spécifiques de chaque ester notées T1 à T3 dans le Tableau 8, deux transitions spécifiques de la créatinine et une seule transition disponible pour la créatine ont été suivies. Les quantifications n'ont été réalisées que sur la transition T1 qui présentait systématiquement les intensités les plus fortes.

Compound/chain length	Transition (ES+)	parent ion m/z	product ion m/z	collision energy (eV)	Tube lens
creatine (CR)	T1	132.156	90.185	10	100
creatinine (CRN)	T1	114.124	86.196	10	75
	T2	114.124	44.254	10	75
4b/C2	T1	160.153	90.195	15	20
	T2	160.153	132.126	12	20
	T3	160.153	118.175	12	20
4c/C4	T1	188.197	90.175	15	70
	T2	188.197	132.144	12	70
	T3	188.197	146.166	12	70
4d/C8	T1	244.236	90.165	20	80
	T2	244.236	132.137	15	80
	T3	244.236	202.185	15	80
4e/C9	T1	258.225	90.175	13	100
	T2	258.225	132.135	20	100
	T3	258.225	342.346	15	100
4f/C12	T1	300.285	90.125	25	110
	T2	300.285	132.146	20	110
	T3	300.285	258.195	15	110
4h/C18	T1	384.364	90.185	35	115
	T2	384.364	132.136	25	115
	T3	384.364	342.346	20	115

**Tableau 8 : Transitions MRM sélectionnées pour chaque ester de créatine, la créatine et la créatinine**

*ES+ : mode Electrospray positif ; m : masse de la molécule ; z : charge de la molécule. Extrait de Trotier-Faurion., et al., J. Med. Chem., 2013*

Nous avons vérifié que les transitions suivies étaient bien spécifiques de chaque ester et de la créatine. Pour cela, nous avons dosé des solutions d'ester de créatine seul ou en mélange et nous avons validé l'absence de réponse sur les transitions non spécifiques de la molécule. Le Tableau 9 montre ainsi que chaque transition est spécifique de l'ester considéré.

transition	ester de créatine C2	ester de créatine en C4	mélange C2 + C4
160 → 90	1,68E+09	-	1,35E+09
188 → 90	-	1,92E+09	1,48E+09

transition	ester de créatine en C9	ester de créatine en C12	ester de créatine en C18	mélange C9 + C12 + C18
384 → 90	-	-	3,79E+08	2,95E+08
300 → 90	9,00E+06*	6,30E+08	-	5,09E+08
258 → 90	1,77E+09	1,57E+06*	-	1,36E+09

**Tableau 9 : Spécificité des transitions MRM choisies pour chaque ester**

*Ce tableau présente les aires des pics chromatographiques répondant sur chaque transition d'ester en solution ou en mélange. – signe l'absence de pic chromatographique. L'ester nonylique (C9) et l'ester dodécylique (C12) présentent un pic écho (\*) sur leurs transitions respectives mais l'intensité de ces pics écho est négligeable et représente 0.5 et 0.25% des pics considérés comme spécifiques.*

Dans nos conditions expérimentales, la créatine est quantifiable de 0.05 à 10 µg/ml dans les lysats cellulaires et de 0.25 à 50 µg/ml dans les surnageants de culture ; les esters éthylique, butylique, octylique, nonylique, dodécylique et octadécylique de créatine sont, eux, quantifiables de 0.01 à 5 µg/ml dans les lysats cellulaires et de 0.05 à 25 µg/ml dans les surnageants de culture.

#### 4.2.2 Validation des méthodes analytiques de dosage des esters de créatine

Les deux méthodes analytiques exploitées pour le dosage des esters de créatine dans les échantillons biologiques ont fait l'objet d'une validation analytique. Pour cela la méthode en isocratique 20/80 a été validée pour le dosage de l'ester dodécylique et la méthode 40/60 pour, d'une part, la créatine et, d'autre part, l'ester éthylique de créatine. La validation analytique consiste à tester la spécificité, la fidélité, la linéarité de la méthode ainsi que la stabilité des échantillons (Tableau 10).

		Créatine	ester de créatine C2	ester de créatine C12
spécificité	LLOQ	<b>21,0%</b>	3,0%	0,0%
fidélité intra série <i>exactitude</i>	LLOQ	6,4%	6,4%	12,1%
		<i>116%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	SVA	5,2%	4,5%	2,4%
		<i>87%</i>	<i>114%</i>	<i>90%</i>
	SVB	7,7%	11,1%	5,5%
		<i>91%</i>	<i>108%</i>	<i>102%</i>
fidélité inter série <i>exactitude</i>	SVC	6,5%	4,8%	1,8%
		<i>95%</i>	<i>99%</i>	<i>92%</i>
	LLOQ	12,8%	10,3%	18,0%
		<i>102%</i>	<i>95%</i>	<i>95%</i>
	SVA	11,5%	11,6%	10,4%
		<i>91%</i>	<i>98%</i>	<i>97%</i>
stabilité 24h, +4 °C	SVB	6,5%	7,8%	2,8%
		<i>89%</i>	<i>91%</i>	<i>95%</i>
	SVC	5,6%	13,8%	9,6%
		<i>94%</i>	<i>91%</i>	<i>98%</i>
	F/T-1c	6,3%	-8,3%	-13,9%
		-10,6%	-14,1%	-14,9%
F/T-3c	SVA	-8,1%	-11,4%	<b>-26,7%</b>
	SVC	-10,4%	-9,1%	<b>-25,4%</b>

**Tableau 10 : Validation des méthodes analytiques pour le dosage de la créatine et des esters de créatine en C2 et C12**

Les pourcentages représentent la variabilité sur la mesure (coefficient de variation calculé sur la moyenne des mesures). Les chiffres en italique, indiquant l'exactitude de la mesure, ont été calculés par rapport à la valeur théorique :  $[(\text{valeur expérimentale} - \text{valeur théorique})/\text{valeur théorique}]$  en %.

La **spécificité** de la méthode permet l'évaluation non équivoque de l'analyte en présence de substances interférentes. Nous avons comparé l'aire du pic chromatographique obtenue pour la concentration la plus basse (limite la plus basse de quantification, LLOQ ou « Lower limit of quantification ») à celle obtenue pour les blancs sur 4 jours différents d'expérimentation. L'aire du blanc doit être inférieure à 20% de l'aire de la LLOQ. Nos résultats (Tableau 10) montrent que cette limite est vérifiée pour l'ester de créatine éthylique et l'ester dodécylique de créatine mais pas pour la créatine puisque l'aire de la concentration LLOQ représentait 21% de l'aire du blanc. C'est pourquoi la limite basse de quantification de la créatine a été relevée à 0.05 µg/ml. De plus, lors de chaque dosage analytique par la suite, nous avons vérifié que les blancs ne présentaient pas de pics sur l'ensemble des transitions d'esters suivies ou que l'aire de ce pic était toujours inférieure à 20% de l'aire du pic de la LLOQ.

Les **fidélités** intra et inter-série permettent d'étudier la répétabilité de la mesure et de la méthode. Elles sont évaluées sur 4 concentrations d'échantillon : la LLOQ, une concentration basse notée standard de validation A (SVA) correspondant à 3 fois la LLOQ, une concentration de milieu de

gamme notée standard de validation B (SVB) et une concentration élevée notée standard de validation (SVC) correspondant à 80% du point de gamme G6 de concentration la plus élevée ou ce G6 lui-même. La répétabilité de la mesure (fidélité intra-série) consiste à injecter 6 fois de suite chaque concentration et à évaluer la variation sur la valeur de la concentration (mesurée par le coefficient de variation par rapport à la moyenne). La répétabilité de la méthode (fidélité inter-série) consiste en l'injection de chaque concentration, sur 4 jours différents. Nous calculons les variations sur une même concentration lors des différents dosages ainsi que l'écart par rapport à la valeur théorique qui atteste de l'exactitude de la méthode analytique. La variation sur une même concentration lors des différents dosages doit être inférieure à 20% pour la LLOQ et inférieures à 15% pour les autres concentrations. L'exactitude doit, elle, être comprise entre 85 et 115% de la valeur théorique. Ces deux paramètres sont vérifiés pour les 3 molécules.

La **stabilité** des solutions a été évaluée au regard des contraintes expérimentales définies au préalable. Ainsi, les runs de dosage sont constitués d'une centaine d'échantillons (échantillons biologiques + blancs), à 6 minutes de run par échantillon, on obtient une durée totale de 10 heures. Les échantillons traités par les esters de créatine à longues chaînes grasses (>C4) nécessitent d'être dosés suivant les deux méthodes analytiques pour la détection de l'ester (20/80) et de la créatine (40/60), soit 20 heures de run. En prenant une marge de 4 heures, il nous faut donc vérifier que les échantillons sont stables pendant 24 heures dans l'injecteur automatique dont la température est réglée à +4°C. De plus, à la suite des expérimentations sur les cellules, une étape de congélation/décongélation est nécessaire afin de faciliter la gestion des échantillons avant le dosage analytique. Nous vérifions donc que les échantillons sont stables après un et trois cycles de congélation/décongélation dans le mélange de solvants. Les résultats de ces différentes études sont synthétisés dans le Tableau 10 où nous constatons que la congélation-décongélation sur 3 cycles dégrade l'ester dodécylrique de créatine.

La **linéarité** de la méthode analytique est vérifiée par le dosage de 6 points de gamme sur 4 jours différents, chaque concentration étant préparée nouvellement chaque jour. Nous déterminons ainsi la LLOQ et la pondération de la gamme de calibration.

Nous avons extrapolé ces observations aux autres esters en fonction de leur groupe. Notamment, les esters à longue chaîne carbonée (>C4) n'ont jamais subi les 3 cycles de congélation-décongélation qui diminuent la stabilité de l'ester dodécylrique de créatine.

### 4.2.3 Effet de la matrice protéique cellulaire sur le dosage des esters de créatine

L'objectif du développement des esters de créatine ainsi que des méthodes analytiques de dosage étant de pouvoir identifier et quantifier l'internalisation de ces produits dans les modèles cellulaires, des dosages intra-cellulaires étaient indispensables. Or on sait en chimie analytique que la présence de matrice (ici nous considérons les éléments constitutifs de la cellule, c'est-à-dire, la « matrice » sous forme du lysat cellulaire que l'on peut obtenir par lyse dans un solvant organique) peut engendrer des biais dans les dosages analytiques notamment par suppression de signal. Nous avons donc étudié l'impact de la présence du « lysat cellulaire » dans les échantillons sur les résultats du dosage des esters de créatine et de la créatine. Nous avons pour cela sélectionné deux matrices de lysat cellulaire de fibroblastes présentant des concentrations protéiques différentes (0.95 µg/ml et 1.45 µg/ml) et donc un nombre de cellules différent. Nous avons réalisé un mélange avec deux concentrations connues d'ester dodécylrique ; 0.05 µg/ml (valeur basse en terme de gamme de concentration) et 2.5 µg/ml (valeur de milieu de gamme) et nous avons évalué l'extinction du signal par la diminution de l'aire sous le pic correspondant.

Le Tableau 11 montre la diminution du signal obtenu pour l'ester dodécylrique en fonction des concentrations protéiques des lysats cellulaires. Nous observons que la concentration protéique 0.95 mg/ml conduit à une diminution du signal de 32% par rapport au signal obtenu en l'absence de matrice. Lorsqu'on augmente la concentration protéique dans l'échantillon de 0.95 à 1.45 mg/ml, on diminue encore d'un facteur 2 l'aire du pic correspondant à la mesure de la concentration d'ester dodécylrique (pour 2.5 µg/ml). En revanche la détection de la faible concentration d'ester n'est que peu impactée. Ceci signifie que le dosage des concentrations fortes d'esters sera sous-évalué en présence de concentrations élevées de protéines dans les échantillons de lysats cellulaires.



concentration protéique (mg/ml)	ester dodécylrique de créatine			
	0.05 µg/ml		2.5 µg/ml	
	AUC <sub>300 → 90</sub>	% ctrl	AUC <sub>300 → 90</sub>	% ctrl
0	2,10E+06	100	2,60E+07	100
0,95	1,88E+06	90	1,77E+07	68
1,45	1,88E+06	90	9,40E+06	36

**Tableau 11 : Effet de la présence de protéines sur la détection de l'ester dodécylrique de créatine**

*La réponse est exprimée par l'aire du pic chromatographique spécifique (AUC) obtenue de deux concentrations d'ester dodécylrique de créatine (0.05 et 2.5 µg/ml) en présence de deux surnageants de lysats cellulaires de concentration protéique 0.95 µg/ml (ligne 2) et 1.45 µg/ml (ligne 3).*

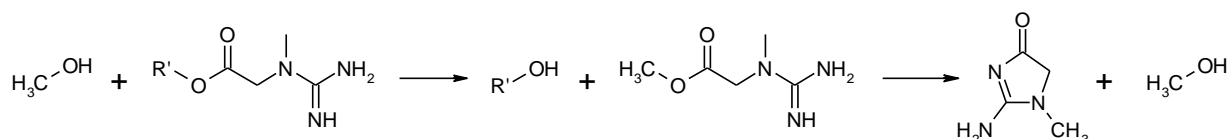
### 4.3 Solubilité des esters de créatine

Les esters à courtes chaînes (éthylrique et butylrique) sont solubles dans les solutions aqueuses (eau distillée, tampon de transfert, milieux de culture). En revanche, les esters à moyenne et longue chaîne carbonée (octyl, nonyl, dodécyl, octadécyl) présentent des propriétés physico-chimiques complexes rendant leur solubilité ardue. Ainsi, ils sont solubles à 1 mg/ml dans le méthanol, le chloroforme et l'acétonitrile acidifié préférentiellement (Tableau 12).

Solvants testés	Solubilité :
Eau	-
Méthanol	+
Ethanol	-
2-Propanol	-
Dichlorométhane	-
Chloroforme	+
Acétone	-
Acétonitrile	+
Acétonitrile acidifié	+
Ethyl acétate	-
Ethyl éther	-
DMSO	-

**Tableau 12 : Solubilité des esters de créatine dans les solvants pour une concentration de 1 mg/ml**

Le chloroforme présente un inconvénient majeur en termes de préparation de solutions-mère d'ester puisqu'il n'est pas miscible à l'eau, il est donc rapidement écarté. Le méthanol permet une solubilité rapide de l'ester de créatine mais avec un risque majeur de dégradation de la molécule par trans-estérification. Le mécanisme mis en jeu (Figure 44) conduit alors à la production de l'ester méthylique de créatine puis à sa recyclisation en créatinine, ce que nous avons constaté par des analyses RMN.



**Figure 44 : Trans-estérification des esters par le méthanol**

*La trans-estérification consiste en l'échange du groupement méthyle du méthanol avec la chaîne carbonée portée par l'ester (groupement R' qui dans notre étude est C2 à C18). Cela conduit à la libération de l'alcool gras correspondant et de l'ester méthylique de créatine qui se recyclise spontanément en créatinine.*

Nous retenons donc l'acétonitrile acidifié comme solvant de solubilisation des esters de créatine.

## 4.4 Stabilité des esters de créatine

La stabilité des esters de créatine représente le maintien des structures chimiques intègres en solution. Concernant la dégradation des esters, il existe deux phénomènes distincts. La dégradation recherchée dans cette étude est une bioconversion enzymatique catalysée par les estérases cellulaires qui vont pouvoir, à partir de l'ester de créatine, libérer la créatine (composé énergétique cellulaire) et l'alcool gras correspondant (composé endogène possédant des propriétés neurophysiologiques et limitant tout risque de toxicité des composés). Cependant, il existe une seconde dégradation qui est une hydrolyse non enzymatique des esters de créatine et qui dépend du pH. C'est donc cette seconde dégradation non souhaitée qui est étudiée dans ce paragraphe.

Plusieurs questions se posent donc quant à la stabilité des esters de créatine. Tout d'abord, il faut pouvoir conserver les produits synthétisés pendant une durée relativement longue, puis il est nécessaire de pouvoir réaliser l'expérimentation biologique dans des conditions expérimentales limitant le risque de dégradation de la molécule tout en respectant les contraintes liées aux modèles

expérimentaux cellulaires. Enfin, il faut pouvoir assurer la stabilité du signal entre la fin de l'expérimentation et le dosage des échantillons par HPLC-MS/MS, c'est-à-dire étudier la conservation des échantillons.

#### **4.4.1 Conservation des esters de créatine sur le long terme (produit sec)**

Nous avons validé l'absence de dégradation lors d'une conservation à sec par LC-MS/MS et par RMN du proton. Je présente ici les spectres associés de l'ester octadécylrique qui s'est révélé par la suite être le composé dont la stabilité était la plus faible. Néanmoins, nous avons constaté qu'une conservation à -20°C pendant 18 mois n'entraînait aucune dégradation détectable. Les Figures 45 et 46 sont les spectres  $^1\text{H}$  RMN avant et après conservation respectivement. On observe notamment dans ces deux spectres la présence du pic à 4.2 ppm qui correspond au méthylène présent en  $\alpha$  de la liaison ester et qui signe le couplage avec la chaîne carbonée. Ceci valide que l'ester octadécylrique ne s'est pas dégradé lors de la conservation à sec pendant 18 mois à -20°C.

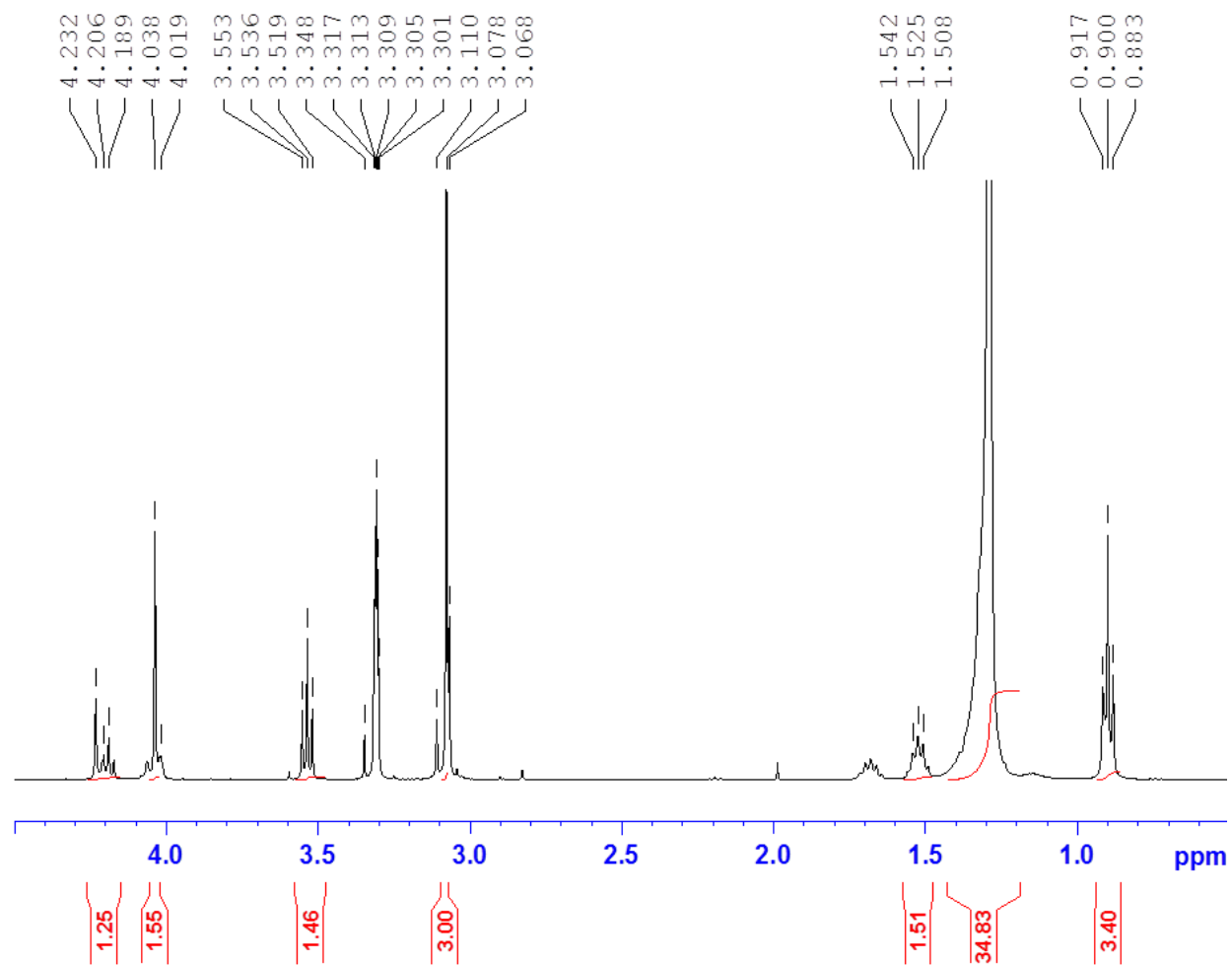


Figure 45 : Spectre <sup>1</sup>H RMN de l'ester octadécylique (contrôle de fin de synthèse)

Un des signaux caractéristiques est le triplet à 4.2 ppm qui correspond au méthylène en  $\alpha$  de la liaison ester.

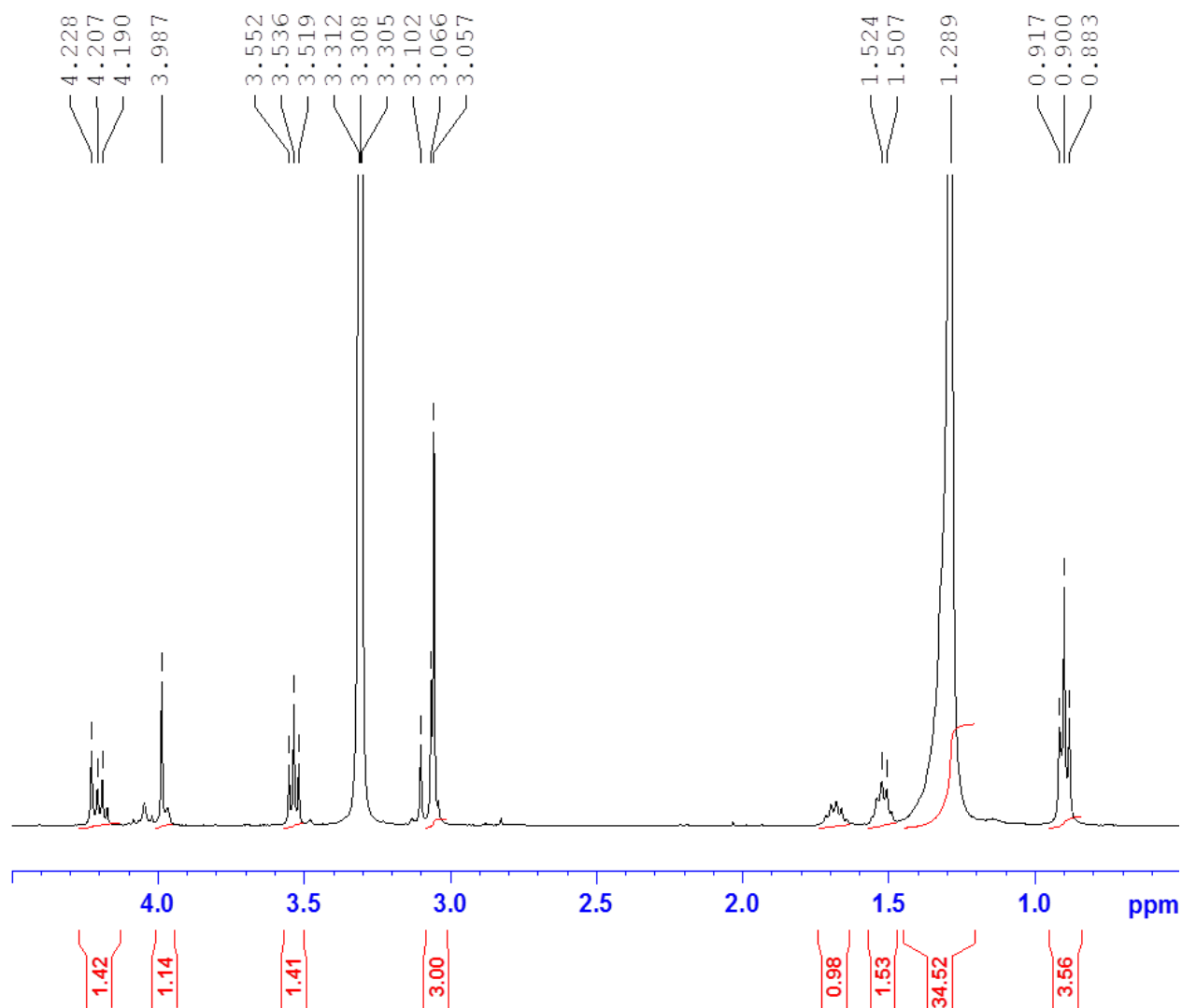


Figure 46 : Spectre  $^1\text{H}$  RMN de l'ester octadécyclique après conservation à sec pendant 18 mois à  $-20^\circ\text{C}$

*Nous notons la présence du le triplet à 4.2 ppm, ce qui indique que l'ester octadécyclique n'a pas été hydrolysé.*

#### 4.4.2 Réalisation des expérimentations en milieu biologique

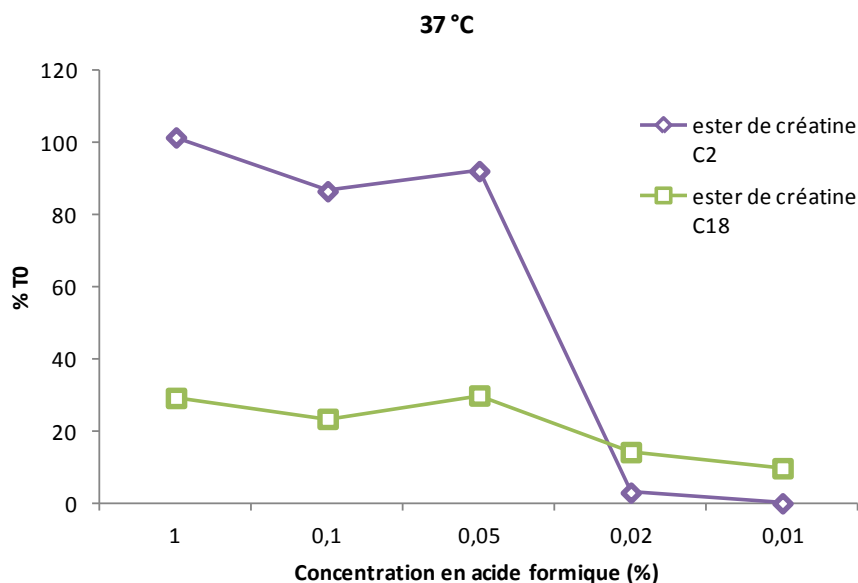
Considérant que les esters de créatine sont plus stables dans des milieux acides, nous avons évalué leur stabilité dans du tampon de transfert car c'est le véhicule utilisé lors des expérimentations dans le modèle *in vitro* de la BHE en présence de concentrations décroissantes en acide formique, de 1% à 0.01%. Ces concentrations d'acide font varier le pH de 2.5 à 7 (Tableau 13).

% d'acide formique	pH
0,01	7
0,02	5,3
0,05	4 - 4,5
0,1	3,5
1	2,5

**Tableau 13 : Evolution du pH en fonction du pourcentage d'acide formique en solution dans le tampon de transfert**

La durée initiale prévue pour les expérimentations dans les modèles cellulaires était de 2 heures, durée pendant laquelle nous avons réalisé les tests de stabilité à 25°C et 37°C. Les esters de créatine ont été solubilisés dans le tampon de transfert avec des quantités d'acide formique variant de 0.01% à 1% (v/v) et dosés par les méthodes HPLC-MS/MS décrites dans Méthodes expérimentales §3.2. Nous avons déterminé qu'à la température de 37°C pendant 2 heures (réalisation des expérimentations cellulaires), les esters à courtes chaînes (éthylrique – C2, courbe violette sur la Figure 47) présentent une bonne stabilité en présence de fortes concentrations d'acide formique (0.05 à 1% v/v). En revanche, la diminution de la quantité d'acide formique, c'est-à-dire l'augmentation du pH vers un pH physiologique, conduit à une instabilité et une dégradation de la molécule puisque le signal diminue jusqu'à être indétectable à 0.01% d'acide formique.

Pour les esters à longues chaînes (octadécylique – C18, courbe verte sur la Figure 47), on observe une très forte dégradation de la molécule puisque le signal obtenu ne représente plus que 25 à 30% en moyenne du signal initial quelle que soit la concentration en acide formique testée. Il est intéressant de constater que, même à des concentrations fortes en acide, l'ester octadécylique est difficile à détecter, et ce pour deux raisons : l'instabilité important de cette structure en tampon de transfert ainsi que la très faible solubilité du produit. Il a donc fallu mettre au point un protocole en dilutions successives afin d'augmenter progressivement la part aqueuse dans les solutions.

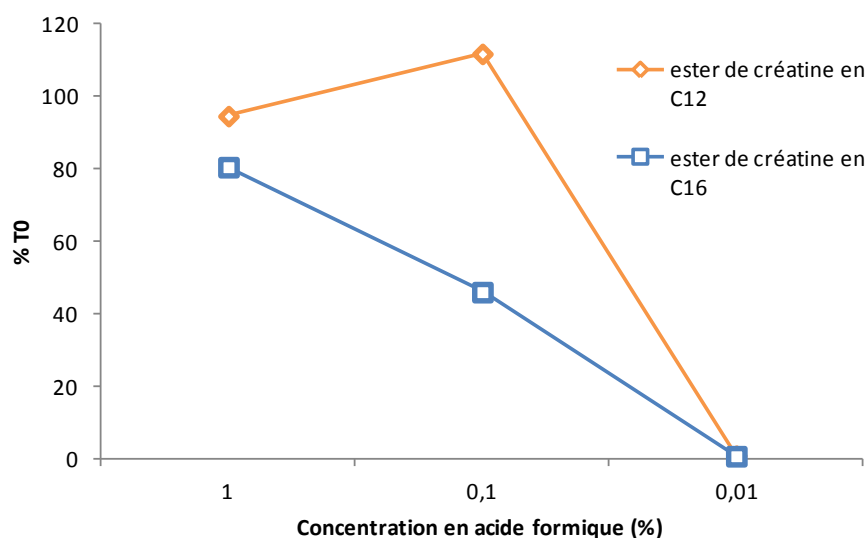


**Figure 47 : Dégradation des esters de créatine éthylique (C2) et octadécylique (C18) en fonction de la concentration d'acide formique pendant 2 h d'incubation dans le tampon de transfert à 37°C**

*Abscisse : % (v/v) ; ordonnée : %TO = (AUC<sub>ester</sub>/AUC<sub>étalon interne</sub>)/(AUC<sub>ester, TO</sub>/AUC<sub>étalon interne, TO</sub>) \*100*

La Figure 48 présente la dégradation de deux autres esters à longue chaîne (dodécylique et hexadécylique) suivant le même protocole d'incubation à 37°C pendant 2 heures. L'ester dodécylique présente une stabilité correcte dans le tampon contenant 0.1 ou 1% d'acide formique. En revanche, à la concentration de 0.01% d'acide, on observe une disparition totale du signal. L'ester hexadécylique, quant à lui, est stable en solution à 1% d'acide mais une dilution d'un facteur 10 conduit à une perte de 50% du signal et une dilution d'un facteur 100 à une dégradation complète.

Ces données indiquent de façon non équivoque la nécessité de travailler à un pH acide afin de maintenir la stabilité des esters de créatine en solution aqueuse.



**Figure 48 : Dégradation des esters dodécylique (C12) et hexadécylique (C16) de créatine en fonction de la concentration d'acide formique dans le tampon de transfert pendant 2h d'incubation à 37°C**

*Abcisse : % (v/v) ; ordonnée : %TO =  $(AUC_{ester}/AUC_{étalon\ interne})/(AUC_{ester, TO}/AUC_{étalon\ interne\ TO}) * 100$*

Afin de réaliser l'étude de passage de la BHE par les esters de créatine, ainsi que les tests de translocation dans le parenchyme cérébral et d'internalisation dans les cellules neuronales et les cellules pathologiques fibroblastiques, nous avons choisi de limiter l'incubation à un temps deux fois plus court : 60 minutes. Par ailleurs, nous n'avons pas été en mesure d'empêcher la dégradation des esters de créatine dans nos conditions expérimentales puisque nous ne pouvions pas utiliser des solutions à pH trop acide (contrainte liée aux modèles expérimentaux pharmacologiques). Nous avons donc d'une part adapté un protocole de solubilisation des esters en phase aqueuse acide à partir d'une solution mère d'ester préparée à 1 mg/ml d'ester en solution dans un mélange 95% d'acétonitrile et 5% d'acide formique. Cette solution est ensuite diluée dans la phase aqueuse au 1/100<sup>ème</sup> pour obtenir la solution d'incubation à 10 µg/ml dans 0.95% d'acétonitrile et 0.05% d'acide formique. L'absence de toxicité de ces conditions a été validée sur les différents modèles cellulaires exploités. D'autre part, nous avons ajouté dans les protocoles expérimentaux un échantillon contrôle permettant de suivre la dégradation spontanée de l'ester.

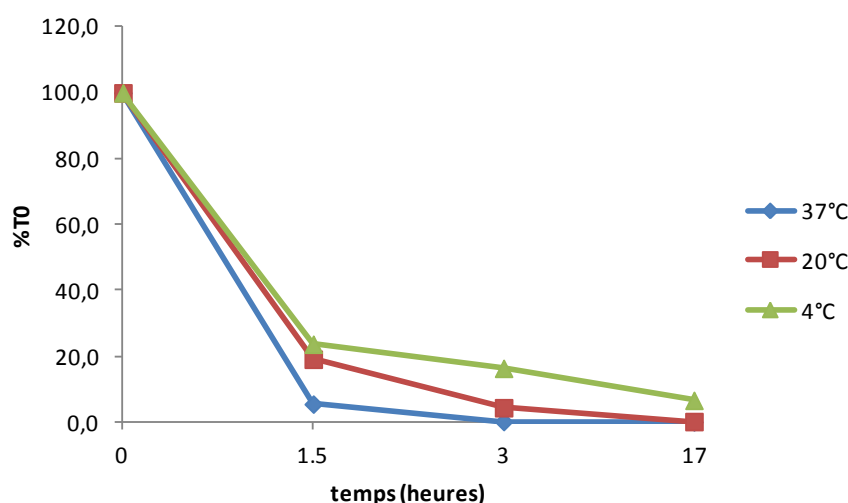


### 4.4.3 Conservation des échantillons (en solution)

Nous avons enfin évalué un protocole permettant de conserver les échantillons en limitant leur dégradation au cours du temps afin de pouvoir les doser par HPLC-MS/MS.

#### 4.4.3.1 Conservation à +4°C à court terme (24h)

La Figure 49 présente la quantité d'ester octadécyclique dégradée au cours du temps dans le tampon de transfert contenant 1% d'acétonitrile et 0.02% d'acide formique. Comme attendu d'après les expérimentations précédentes, nous constatons que la température de 37°C (courbe bleue) conduit à une dégradation rapide du produit puisque dès 1h30, 90% du produit n'est plus détectable. A 20°C, il faut attendre 3h pour observer cette dégradation de 90% (courbe rouge) et à +4°C, cela n'est le cas que pour le temps 17h (courbe verte).

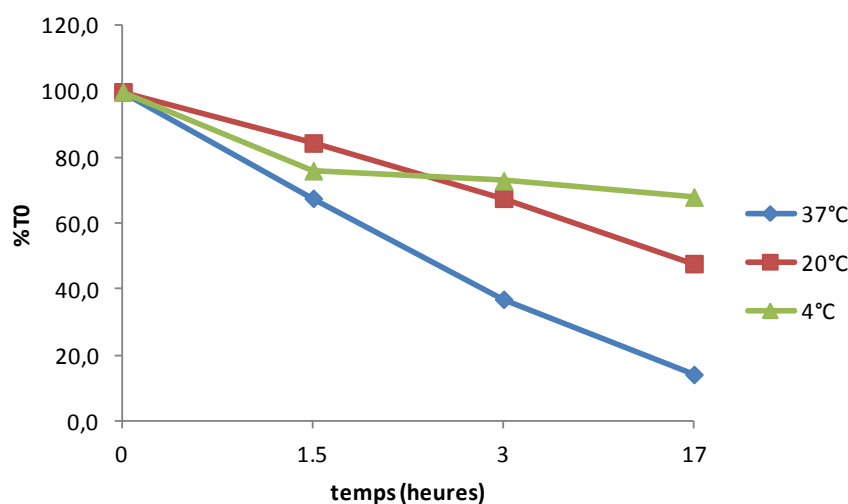


**Figure 49 : Dégradation d'une solution d'ester octadécyclique de la créatine dans le tampon de transfert contenant 1% d'ACN et 0.02% d'acide formique (v/v)**

*Abscisse : temps (h) ; ordonnée : %T0 = (AUC<sub>ester</sub>/AUC<sub>étalon interne</sub>)/(AUC<sub>ester, T0</sub>/AUC<sub>étalon interne, T0</sub>) \* 100*

En augmentant la proportion de solvant organique et d'acide dans le tampon de transfert d'un facteur 10 (10% d'ACN et 0.2% d'acide formique), nous avons constaté (Figure 50) une dégradation à 37°C, quoique moins rapide que dans le cas précédent : en effet, la dégradation atteint 80% du signal

initial en 17h seulement. Dans ces conditions, le maintien à température ambiante (20°C) diminue également le signal sans toutefois dépasser une perte de 33% du signal initial en 17h. Enfin, le stockage à +4°C limite très nettement cette dégradation, comme indiqué par la courbe verte qui démontre une diminution du signal de 20% en 1h30 puis une stabilisation du signal jusqu'à 17h, ce qui permet la réalisation des dosages analytiques. Ceci a par ailleurs été confirmé lors de la validation des méthodes analytiques (cf Méthodes analytiques §3.2).



**Figure 50 : Dégradation d'une solution d'ester octadécylrique de créatine dans le tampon de transfert contenant 10% ACN et 0.2% acide formique (v/v)**

Abcisse : temps (h) ; ordonnée : %TO =  $(AUC_{ester}/AUC_{étalon interne})/(AUC_{ester, TO}/AUC_{étalon interne, TO}) * 100$

Ces expériences démontrent qu'il est indispensable d'augmenter la proportion de solvant organique acidifié pour permettre le maintien de la stabilité des échantillons au cours du run. Nous avons donc choisi de diluer les échantillons au 1/5<sup>ème</sup> dans un mélange d'acétonitrile acide (95% d'acétonitrile et 5% d'acide formique) afin de limiter la dégradation.

#### 4.4.3.2 Conservation à +4°C sur le long terme

Les dosages en HPLC-MS/MS montrent une disparition du signal de l'ester dodécylrique en 2 mois s'il est stocké en solution à +4°C. La RMN (Figures 51 et 52) montre une disparition du triplet spécifique du méthylène en  $\alpha$  de la fonction ester (pic à 4.2 ppm), ce qui confirme la dégradation de l'ester dilué dans un solvant 100% organique (acétonitrile) en 2 mois à +4°C.

#### 4.4.3.3 Conservation à -20° C

La Figure 53 présente les résultats de la stabilité de l'ester octadécyclique après un stockage à -20°C dans le tampon de transfert contenant 1% d'acétonitrile et 0.02% d'acide formique ou 10% d'acétonitrile et 0.2% d'acide formique. Dans les conditions diluées, nous observons une perte de signal de plus de 80% alors qu'elle n'est que de 23% dans les conditions initiales. L'augmentation de la proportion de solvant organique acide dans l'échantillon limite donc la dégradation du produit lors de sa conservation à -20°C pendant 17h.

Lors des dosages d'échantillons, nous avons confirmé qu'aucune dégradation des esters n'était détectée après dilution au 1/5<sup>ème</sup> des échantillons dans un mélange 95% d'acétonitrile et 5% d'acide formique quelle que soit la durée du stockage à -20°C (jusqu'à 3 mois évalués expérimentalement).

Il est important de garder à l'esprit qu'une telle dilution ne congèle pas à la température de -20°C. Toutefois, la diminution de la température limite l'agitation moléculaire et la présence de l'acide limite l'hydrolyse de la liaison ester par protonation de la fonction guanidine.

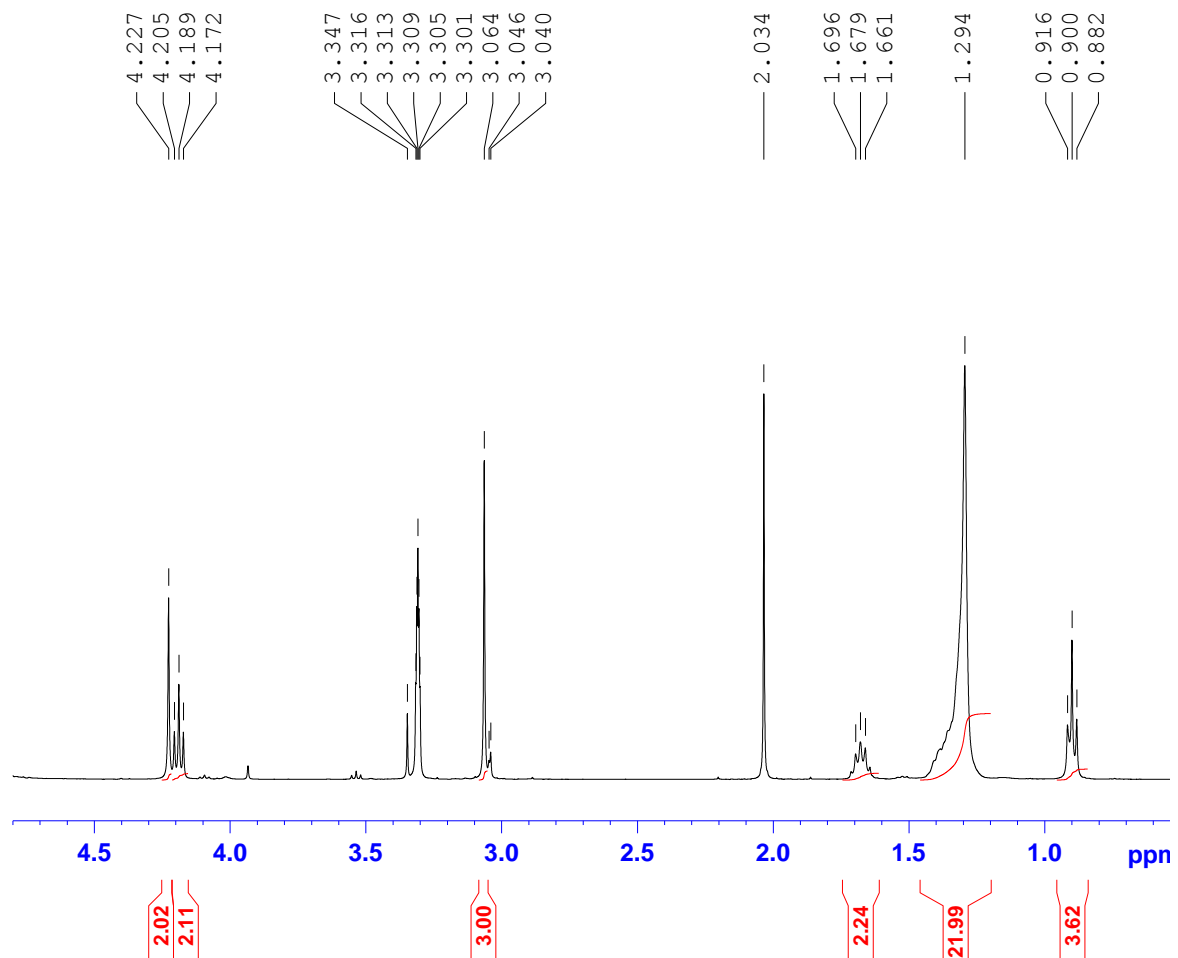


Figure 51 : Spectre  $^1\text{H}$  RMN de l'ester dodécylique (contrôle en fin de synthèse)

Un des signaux caractéristiques est le triplet à 4.2 ppm qui correspond au méthylène en  $\alpha$  de la liaison ester.

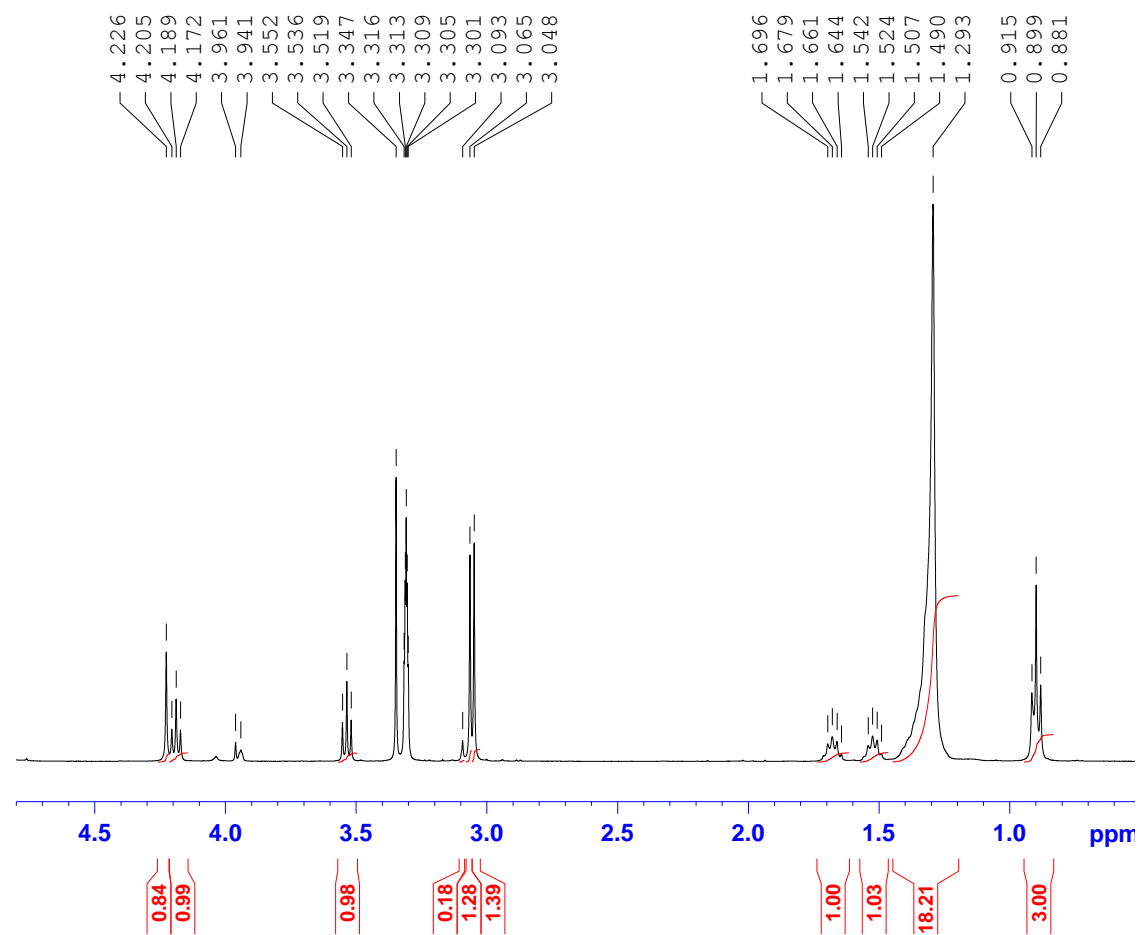
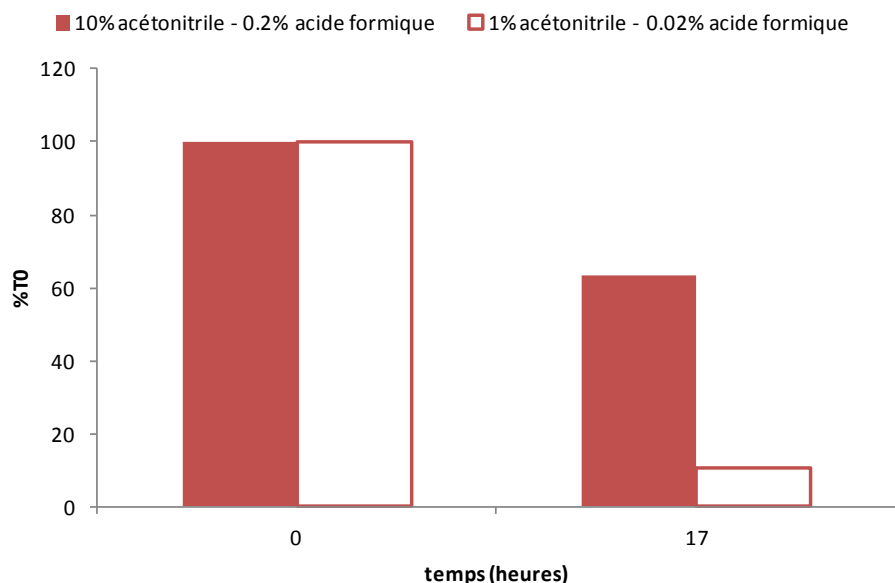


Figure 52 : Spectre  $^1\text{H}$  RMN de l'ester dodécylique après une conservation de 2 mois dans l'acétonitrile à  $+4^\circ\text{C}$

Nous notons la diminution du signal caractéristique (triplet à 4.2 ppm), signe que l'ester s'est dégradé. Nous observons l'apparition d'un triplet à 3.5 ppm correspondant au  $\text{CH}_3$  de l'alcool dodécylique libre



**Figure 53 : Dégradation de l'ester octadécyle de créatine après 17 h de stockage à -20°C dans le tampon de transfert contenant 1% d'acétonitrile et 0.02% d'acide formique comparée au tampon de transfert contenant 10% d'acétonitrile et 0.2% d'acide formique**

*Abscisse : temps (h) ; ordonnée : %T0 = (AUC<sub>ester</sub>/AUC<sub>étalon interne</sub>)/(AUC<sub>ester</sub>T0/AUC<sub>étalon interne</sub> T0) \*100*

En conclusion, les esters de créatine sont des composés hautement sensibles aux conditions expérimentales. Ils sont insolubles dans les phases aqueuses, ce qui impose la préparation de solutions mères en solvant organique suivie par des dilutions successives dans le véhicule aqueux. Ils sont très sensibles à l'hydrolyse à 37°C et pH physiologique, ce à quoi nous ne pouvons malheureusement pas nous soustraire au vu des limites des modèles expérimentaux cellulaires.

En revanche, la limitation du temps expérimental (1 heure) et la dilution immédiate des échantillons à la fin de l'expérimentation dans un mélange constitué à 95% acétonitrile et 5% d'acide formique, qui limite la dégradation après l'arrêt du test biologique en « figeant » la solution, permettent une détection et une quantification des esters dans les milieux biologiques. En effet, l'acide stabilise la fonction guanidine par protonation, ce qui anihile la nucléophilie de l'azote et limite son attaque sur le carbonyle de l'ester.

## 4.5 Propriétés pharmacologiques des esters de créatine

Les propriétés pharmacologiques des esters de créatine ont été évaluées grâce à trois modèles cellulaires *in vitro*. Le modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique de rat nous a tout d'abord permis de définir la capacité des esters de créatine à être **internalisés par les cellules endothéliales** de la micro-vasculature cérébrale ainsi que d'être **transloqués vers le parenchyme cérébral**. Dans un second temps, nous avons validé l'**internalisation** des différentes structures chimiques de notre librairie de molécules dans les **cellules cibles neuronales** grâce à un modèle de culture primaire de neurones corticaux de rat. Enfin, il restait à valider le passage intracellulaire des esters de créatine en **l'absence du transporteur fonctionnel** ainsi que la **bioconversion en créatine** dans un modèle pathologique. Ceci a été réalisé grâce à des fibroblastes humains issus de patients enfants atteints du déficit en transporteur de la créatine.

Nous avons au préalable caractérisé les modèles d'étude en termes d'expression génique du transporteur de la créatine et des enzymes de biosynthèse, de fonctionnalité du transporteur dans les cellules endothéliales et neuronales, de quantité de créatine endogène détectable dans nos conditions expérimentales ainsi que d'activité estérasique dans les quatre types cellulaires (cellules endothéliales, gliales, neuronales et fibroblastiques).

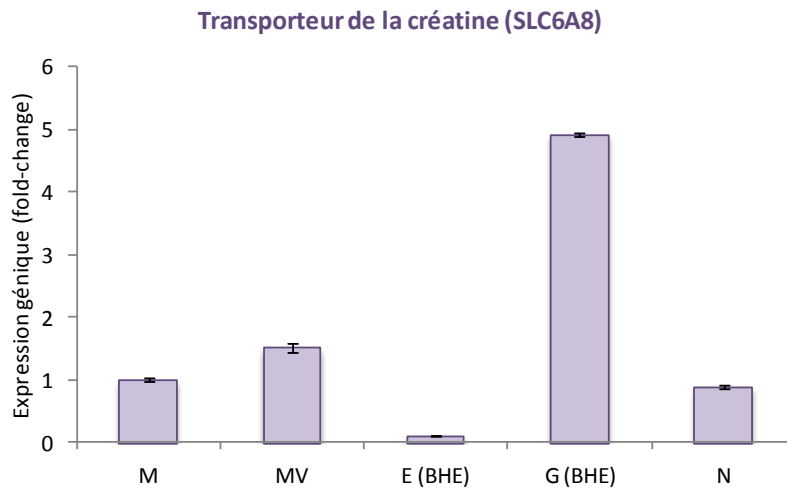
### 4.5.1 Caractérisation des modèles d'étude cellulaire

#### 4.5.1.1 Expression du transporteur et des enzymes de synthèse de la créatine dans les modèles cellulaires étudiés

Nous avons en premier lieu caractérisé l'expression du transporteur de la créatine et des enzymes de biosynthèse dans les types cellulaires étudiés (les cellules endothéliales et gliales de la BHE, les cellules neuronales et les fibroblastes) par RT-PCR semi-quantitative (cf Méthodes expérimentales §3.5). Nous avons également réalisé un contrôle positif de l'expression de ces gènes dans le muscle squelettique de rat (M).

Nous montrons dans la Figure 54 que le transporteur de la créatine est exprimé dans les types cellulaires étudiés. Il est plus exprimé dans les cellules gliales (G BHE) que dans les neurones (N) et

dans les cellules endothéliales (E BHE). En comparant le niveau d'expression du SLC6A8 dans les cellules endothéliales et les microvaisseaux (MV), nous avons constaté une diminution de son expression, signant probablement une régulation négative avec la mise en culture.



**Figure 54 : Expression génique du transporteur de la créatine (SLC6A8)**

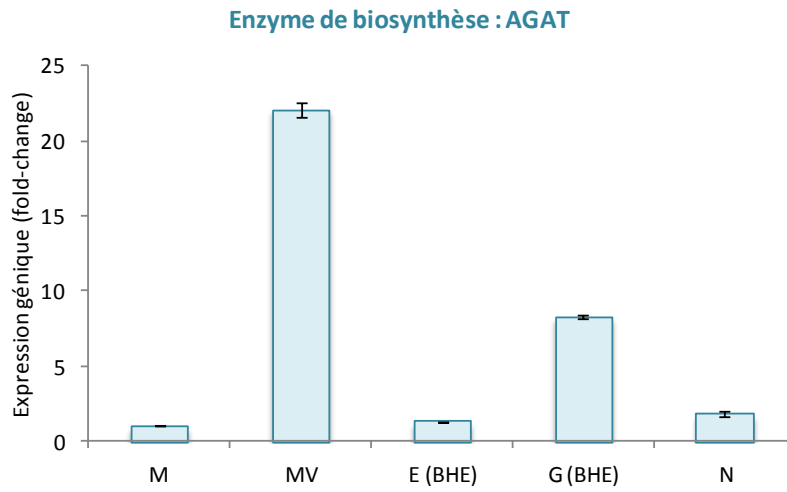
*Expression génique (en fold-change, facteur de variation) du transporteur de la créatine dans les différents types cellulaires : cellules endothéliales (E BHE) ; cellules gliales (G BHE) ; neurones (N) ; comparés au muscle (M) et aux micro-vaisseaux (MV).*

L'étude des niveaux d'expression des enzymes responsables de la biosynthèse de la créatine a révélé que les enzymes AGAT et GAMT sont bien exprimés dans ces modèles cellulaires (Figures 55 A et B). L'enzyme AGAT est globalement plus exprimée que l'enzyme GAMT. L'AGAT est en charge de la première étape de biosynthèse de créatine (cf Introduction §1.1). L'AGAT semble être plus exprimée dans les cellules gliales et les neurones par rapport aux cellules endothéliales (BHE). De la même façon que pour le transporteur de la créatine, on note que dans les cultures de ces cellules, la GAMT est très faiblement exprimée dans les cellules endothéliales et dans les neurones par rapport aux cellules gliales. Les cellules gliales présentent un niveau d'expression de la GAMT comparable à celui des microvaisseaux.

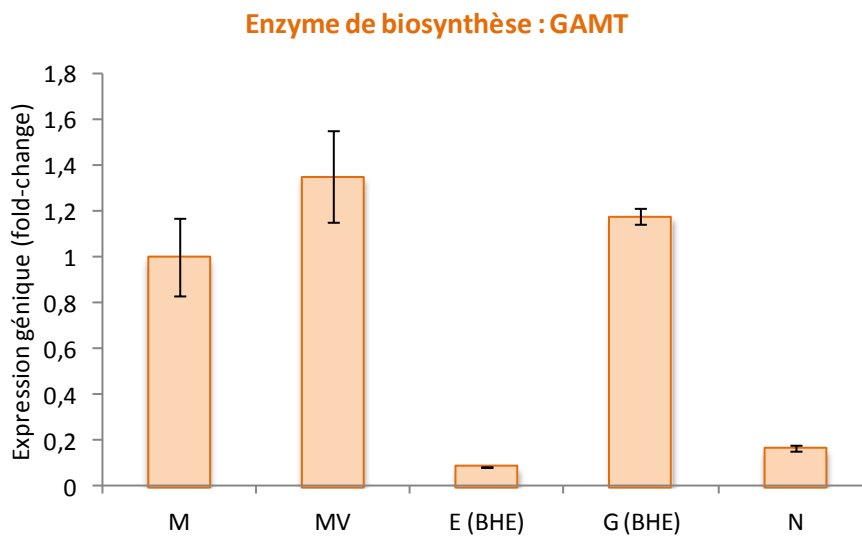
Puisque le transporteur de la créatine ainsi que les enzymes de biosynthèse (AGAT et GAMT) sont exprimés dans les cellules du modèle de BHE (endothéliales et gliales) ainsi que dans le modèle de neurones corticaux, cela signifie que ces types cellulaires sont capables non seulement de transporter la créatine mais aussi de la biosynthétiser à partir des acides aminés.



A :



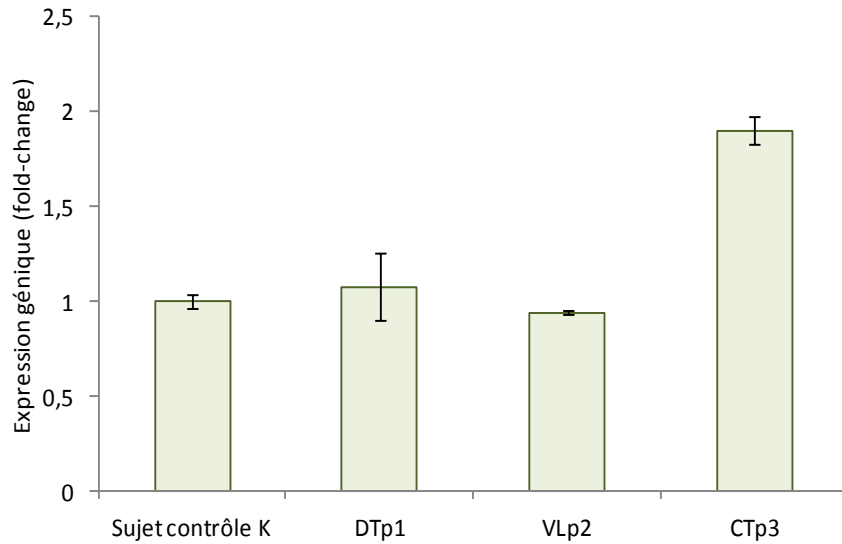
B :



**Figure 55 : Expression de l'enzyme de biosynthèse GAMT**

*Expression génique (en fold-change, facteur de variation) des enzymes de biosynthèse AGAT (A) et GAMT (B) dans les différents types cellulaires : cellules endothéliales (E BHE) ; cellules gliales (G BHE) ; neurones (N) ; comparés au muscle (M) et aux micro-vaisseaux (MV).*

Enfin, nous montrons que le transporteur de la créatine SLC6A8 est bien exprimé dans les fibroblastes issus d'un sujet sain (Contrôle K) ainsi que dans les fibroblastes des patients atteints du déficit en transporteur de la créatine (DTp1, VLp2, CTp3), Figure 56.



**Figure 56 : Expression génique du transporteur de la créatine (SLC6A8) dans les fibroblastes**

*Expression génique (en fold-change, facteur de variation) du transporteur de la créatine dans les fibroblastes de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine (DTp1, VLp2 et CTp3) par rapport aux fibroblastes issus d'un sujet sain (Contrôle K)*

#### **4.5.1.2 Fonctionnalité du transporteur de la créatine dans les cellules endothéliales du modèle de BHE**

Nous avons évalué la fonctionnalité du transporteur de la créatine grâce au passage de créatine chargée avec une quantité radio-traçante de créatine radiomarquée ( $^{14}\text{C}$ -créatine) à travers la monocouche endothéliale depuis le compartiment apical vers le compartiment basolatéral et *vice versa* (cf Méthodes expérimentales §3.4.2.1).

Nous n'observons pas de différence entre les constantes de perméabilité ( $P_{\text{app}}$ ) AB et BA pour les faibles concentrations en créatine comprises entre 0.5 et 40  $\mu\text{M}$  (Figure 57). En revanche, aux concentrations plus élevées (au-delà de 100  $\mu\text{M}$ ), nous notons une tendance à l'augmentation des  $P_{\text{app}}$  BA par rapport aux  $P_{\text{app}}$  AB, bien que non significative.

Le calcul des ratios d'efflux, c'est-à-dire le rapport  $P_{\text{app}} \text{ BA} / P_{\text{app}} \text{ AB}$  indique une tendance à l'augmentation du ratio d'efflux au-delà de 1.5 pour les concentrations élevées en créatine contrairement aux concentrations plus faibles pour lesquelles le ratio d'efflux est compris entre 1.0 et 1.5. Un ratio d'efflux égal à 1.0 signifie que les  $P_{\text{app}}$  AB et BA sont égales et que la molécule traverse la monocouche cellulaire par diffusion passive. En revanche, un ratio d'efflux inférieur à 0.5 ou supérieur à 2.0 indique des transports actifs prédominants, influx ou efflux, respectivement. Nous montrons que, dans notre système expérimental, les concentrations en créatine supérieures à 100  $\mu\text{M}$  semblent faire l'objet d'un efflux, alors qu'entre 0.5 et 50  $\mu\text{M}$  la créatine ne soit pas prise en charge par un système de transport.

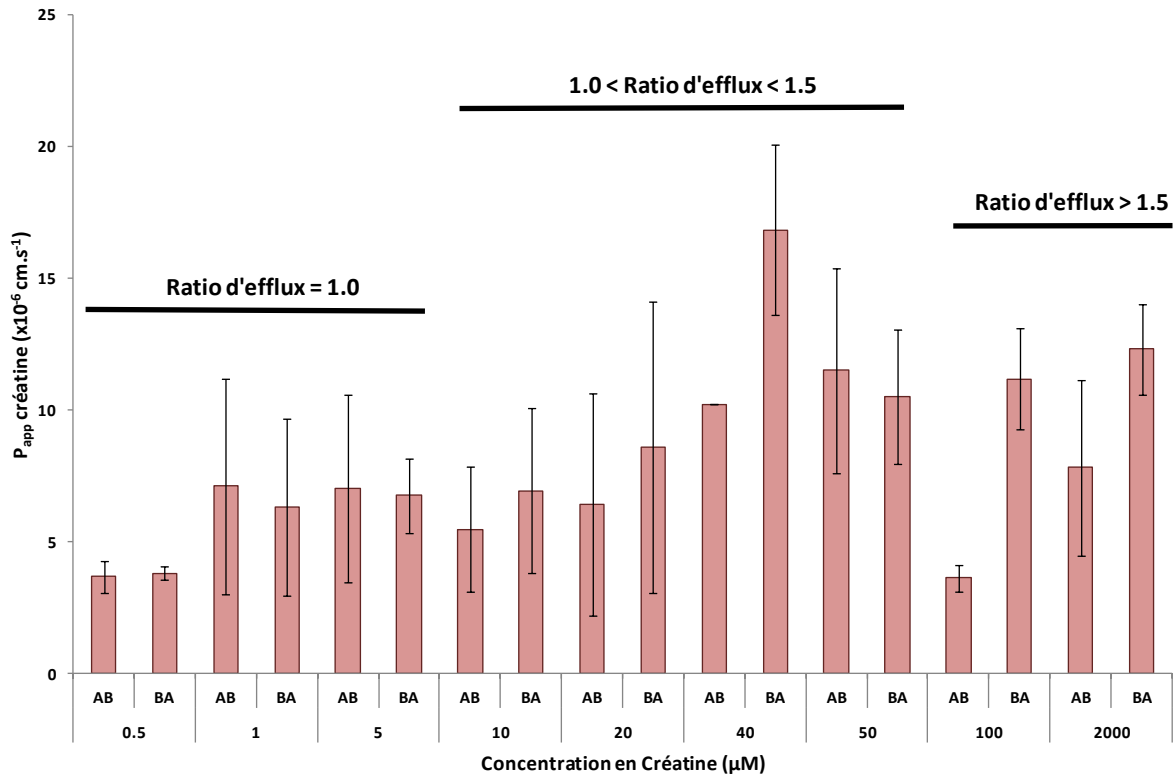


Figure 57 : Constantes de perméabilité ( $P_{app}$  créatine,  $\times 10^{-6}$   $\text{cm.s}^{-1}$ ) en fonction des concentrations de créatine ( $\mu\text{M}$ ) incubées pendant 120 minutes dans le compartiment d'origine apical (AB) ou basolatéral (BA) en présence de quantité radio-traceuse de  $^{14}\text{C}$ -créatine ( $0.5 \mu\text{M}$ ).

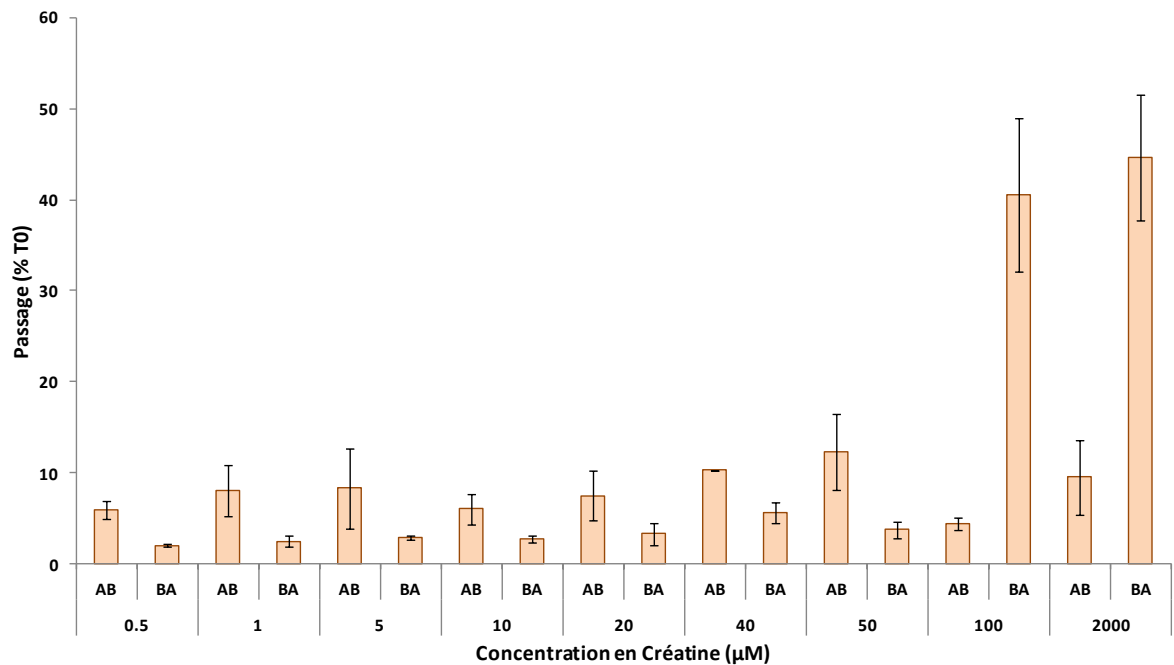


Figure 58 : Quantités détectées (en % de la quantité initiale) dans le compartiment receveur (B ou A) en fonction des concentrations de créatine (en  $\mu\text{M}$ ) incubées pendant 120 minutes dans le compartiment d'origine apical (AB) ou basolatéral (BA)

La Figure 58 présente les quantités de créatine qui sont détectées dans le compartiment receveur, c'est-à-dire basolatéral si le passage se fait de A vers B ou apical si le passage se fait de B vers A, exprimées en % de la quantité initialement incubée. Si on observe les résultats du passage A vers B (AB), on ne note aucune variation quelle que soit la concentration utilisée. En revanche, à forte concentration (100  $\mu\text{M}$  et 2 mM), le passage de BA augmente considérablement par rapport aux faibles concentrations, de plus d'un facteur 10.

Nous avons également étudié si la présence d'un inhibiteur compétitif du transporteur de la créatine (le SLC6A8), l'acide 3-guanidinopropionique (GPA), ou d'un inhibiteur de pompes d'efflux, la cyclosporine (Ci), pouvait moduler les constantes de perméabilité de la créatine. Pour cela, nous avons sélectionné 3 concentrations : 5  $\mu\text{M}$  où il semble qu'il y ait un passage passif, 100 et 2000  $\mu\text{M}$  où il semble qu'il y ait un efflux. La Figure 59 illustre le calcul des ratios d'efflux en fonction des conditions d'inhibition pour chaque concentration de créatine. Nous observons que, pour la concentration de 5  $\mu\text{M}$ , la présence des conditions inhibitrices n'influe pas sur le ratio d'efflux, ce qui confirme un mécanisme de diffusion passive. Concernant la concentration 100  $\mu\text{M}$ , la présence du GPA, inhibiteur spécifique du SLC6A8, diminue le ratio d'efflux contrairement à la cyclosporine, inhibiteur des pompes d'efflux, qui, elle, ne modifie pas le ratio. Enfin, les inhibiteurs semblent ne pas jouer sur le ratio d'efflux à la concentration 2000  $\mu\text{M}$ . Toutefois, lorsque l'on étudie l'impact des conditions inhibitrices sur les constantes de perméabilité elles-mêmes, nous constatons que le GPA n'influe que sur les  $P_{\text{app}}$  B vers A pour la concentration 100  $\mu\text{M}$  et non sur les  $P_{\text{app}}$  A vers B (Figure 60 A, B), ce qui explique la diminution de l'efflux précédemment observée. De plus, ceci indiquerait la présence du transporteur spécifique à la face basolatérale des cellules endothéliales. Il est intéressant de remarquer que le GPA entraîne une diminution des  $P_{\text{app}}$  A vers B et B vers A pour la concentration de 2000  $\mu\text{M}$  (Figures 61 A, B). Ceci tend à montrer que le transporteur est présent sur les deux faces apicale et basolatérale de la cellule endothéliale et qu'il n'est sensible qu'à la présence de fortes concentrations en créatine.

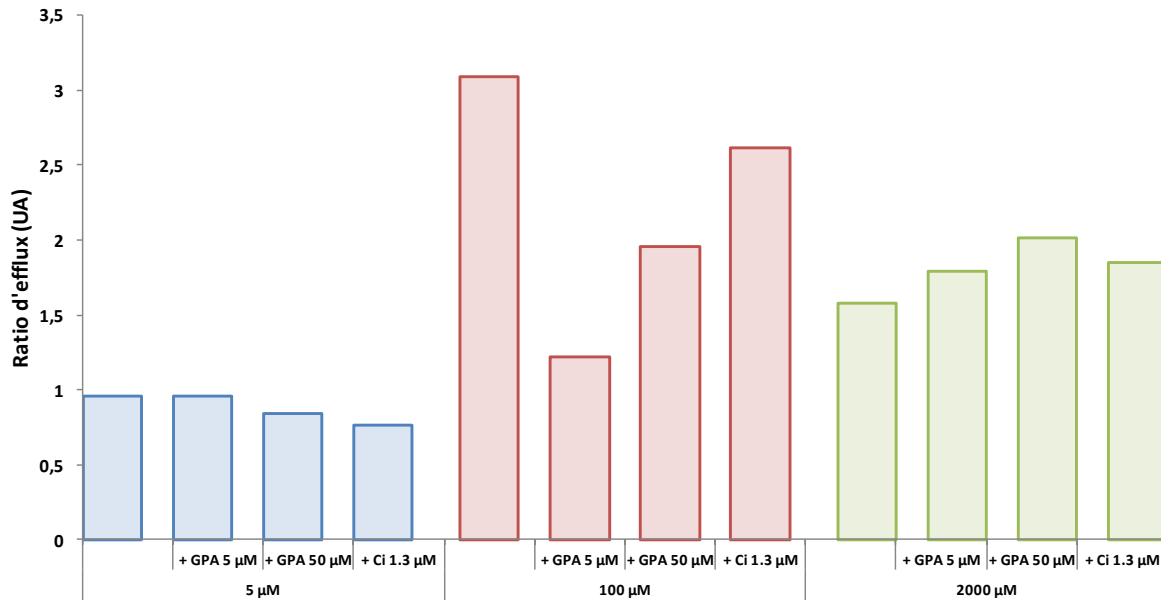


Figure 59 : Influence des conditions inhibitrices de l'acide guanidinopropionique (GPA) et de la cyclosporine (Ci) sur les ratios d'efflux de 3 concentrations de créatine (5, 100 et 2000 μM) dans le modèle de BHE

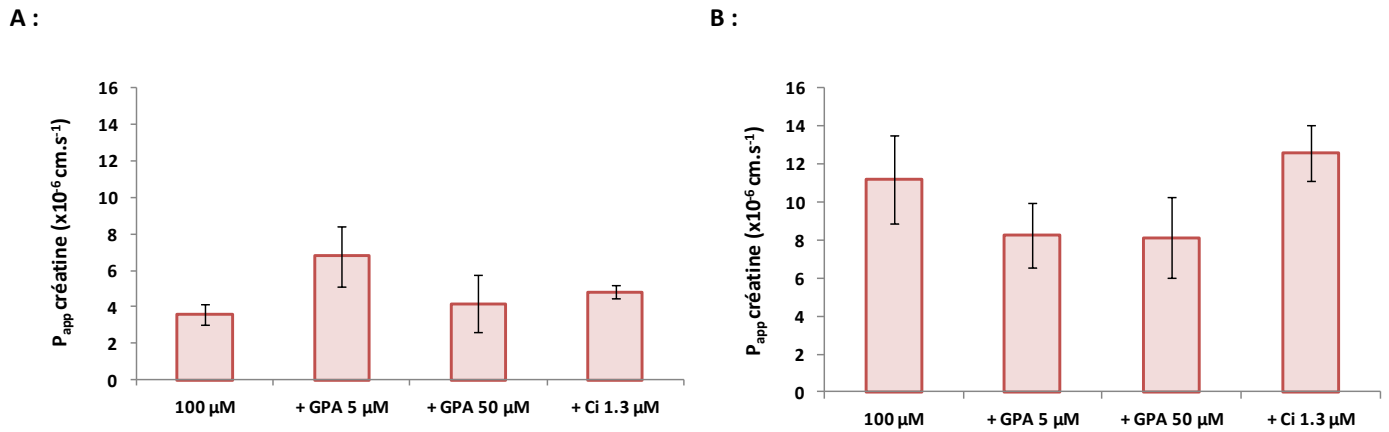
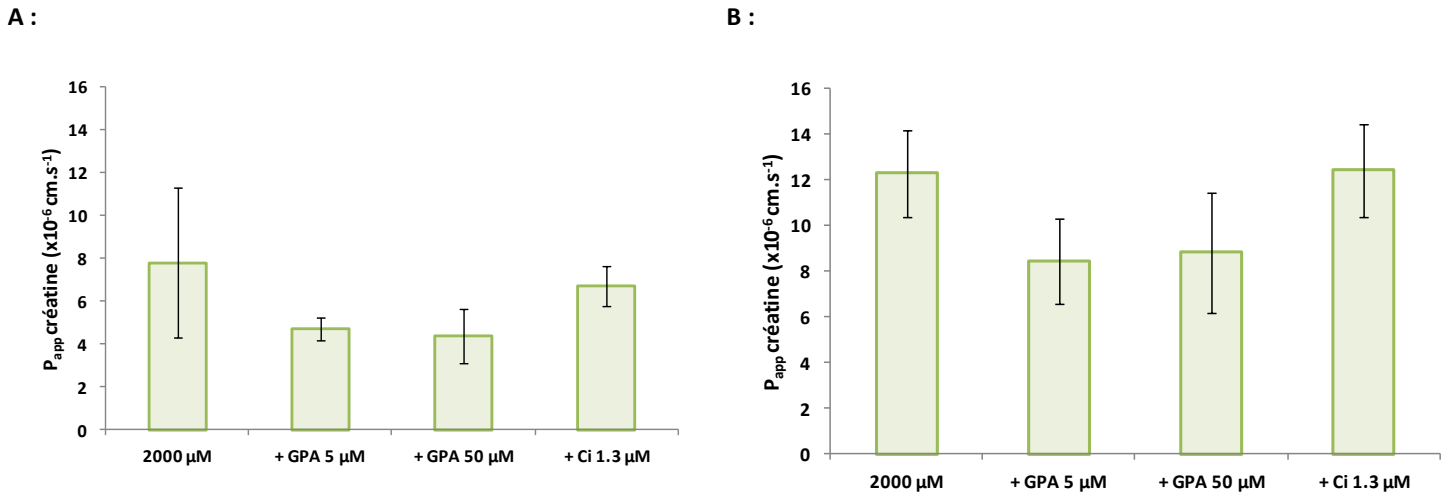


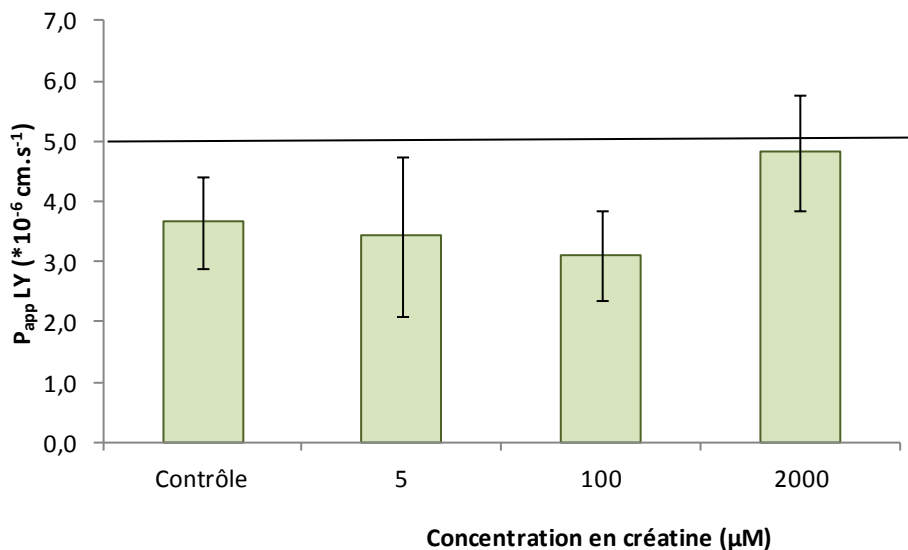
Figure 60 : Influence des conditions inhibitrices de l'acide guanidinopropionique (GPA) et de la cyclosporine (Ci) sur les constantes de perméabilité apical vers basal (A) et basolatéral vers apical (B) de 100 μM de créatine dans le modèle de BHE



**Figure 61 : Influence des conditions inhibitrices de l'acide guanidinopropionique (GPA) et de la cyclosporine (Ci) sur les constantes de perméabilité apical vers basal (A) et basolatéral vers apical (B) de 2000  $\mu$ M de créatine dans le modèle de BHE**

En conclusion, il semble donc que, dans nos conditions expérimentales, les cellules endothéliales du modèle *in vitro* de la BHE expriment faiblement le transporteur SLC6A8 spécifique de la créatine. Le passage de la créatine relève d'une diffusion passive à travers les membranes pour les concentrations faibles de créatine et probablement d'un efflux actif pour les concentrations fortes puisque l'ajout du GPA induit une diminution spécifique du transport de B vers A.

Nous avons par ailleurs montré qu'aucune des conditions testées n'altéreraient l'intégrité, comme cela est présenté en exemple dans la Figure 62 pour trois concentrations de créatine : 5, 100 et 2000  $\mu$ M.



**Figure 62 : Absence de toxicité de la créatine sur l'intégrité de la BHE entre 5 et 2000  $\mu$ M**

#### 4.5.1.3 Fonctionnalité du transporteur de la créatine dans les cellules neuronales

Nous montrons Figure 63 que les cellules neuronales internalisent la créatine, même à de faibles concentrations (1 et 5  $\mu\text{M}$ ), avec une augmentation marquée au cours du temps. De plus, l'internalisation est significativement augmentée avec l'augmentation de la concentration en créatine. Ceci indique que le transporteur de la créatine est bien fonctionnel dans ces cellules.

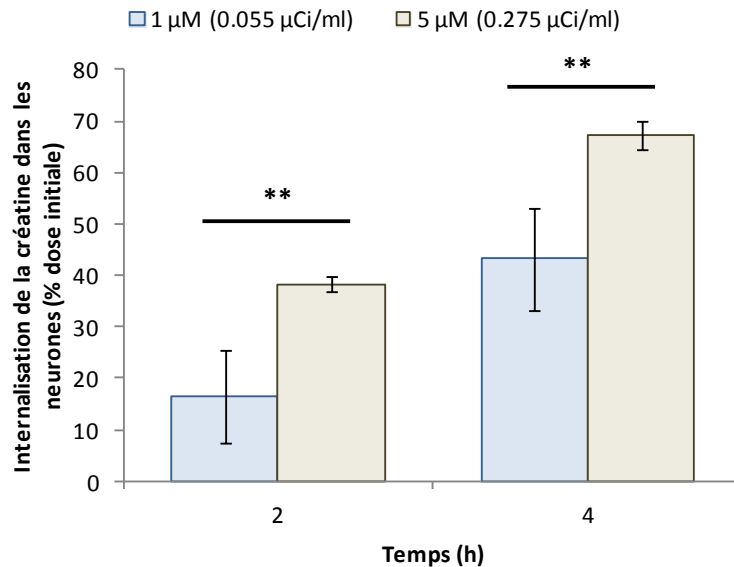


Figure 63 : Internalisation de la  $^{14}\text{C}$ -Créatine (en % de la dose initiale) dans les cellules neuronales en fonction du temps

\*\* :  $p < 0.01$  (ANOVA + Bonferroni)

#### 4.5.1.4 Quantité de créatine endogène dans les milieux de cultures et les lysats cellulaires

Afin d'évaluer le risque de biais induit par la concentration endogène de créatine, nous avons évalué sa présence dans les différents milieux de culture ainsi que dans les cellules.

Trois des milieux de culture utilisés sur quatre présentent une concentration en créatine entre 14  $\mu\text{M}$  à 17  $\mu\text{M}$  (Tableau 14). Par contre il n'y en a pas dans le milieu de culture neuronal, du fait qu'il n'est pas supplémenté en Sérum de Veau Fœtal.

Les concentrations détectées dans les surnageants de culture (Tableau 15) incluent la créatine présente dans le milieu de culture ainsi que la créatine éventuellement excrétée des cellules endothéliales, gliales et fibroblastiques. On retrouve d'ailleurs la même concentration dans les surnageants (entre 16 et 22  $\mu\text{M}$ ) que dans les milieux de culture. Par contre, le surnageant neuronal



est chargé en créatine alors que le milieu de culture n'en contient pas. Cette créatine résulte donc de la biosynthèse neuronale à partir de l'arginine et la glycine qui est ensuite excrétée dans le surnageant.

Enfin, les concentrations en créatine dans les lysats cellulaires sont supérieures à celles détectées dans les surnageants de culture sauf pour les cellules endothéliales pour lesquelles les valeurs sont comparables. Ceci signifie qu'il existe également une biosynthèse cellulaire.

	concentration en créatine ( $\mu\text{M}$ )
culture des cellules endothéliales BHE	14.1
culture des cellules gliales BHE	17.0
culture des neurones	non détectable
culture des fibroblastes	15.3

**Tableau 14 : Concentration en créatine dans les milieux de culture**

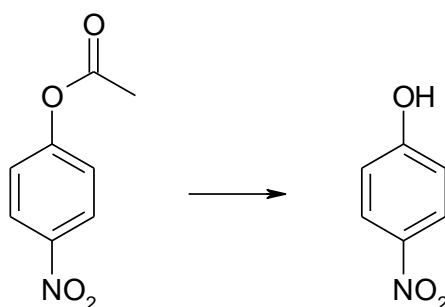
concentration en créatine ( $\mu\text{M}$ )	surnageant de culture	lysate cellulaire
Cellules endothéliales BHE à J13 de co-culture	$16.4 \pm 2.35$	$11.1 \pm 5.38$
Cellules gliales BHE à J14 de co-culture	$17.2 \pm 1.83$	$34.7 \pm 7.76$
Neurones à DIV10	$6.48 \pm 0.12$	$13.2 \pm 0.56$
Fibroblastes à J6 de culture	$22.1 \pm 1.26$	$33.6 \pm 1.24$

**Tableau 15 : Concentration en créatine dans les surnageants de culture et les lysats cellulaires**

*Les fibroblastes ayant été inclus dans cette étude sont des fibroblastes non pathologiques.*

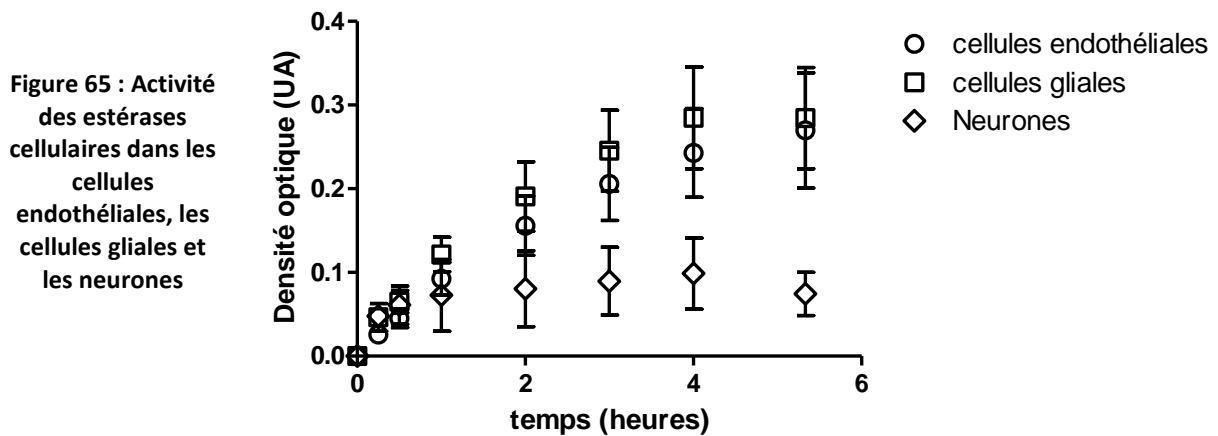
#### 4.5.1.5 Activité des estérases cellulaires dans les modèles cellulaires étudiés

L'activité des estérases cellulaires a été évaluée par la conversion de l'acétate de 4-nitrophényle en para-nitrophénol, dont l'apparition dans le mélange réactionnel est suivie par absorbance en spectroscopie UV. Une augmentation de la densité optique traduit dans les graphes la catalyse de la fonction ester de l'acétate de 4-nitrophényle en la fonction hydroxyle du p-nitrophénol (Figure 64).



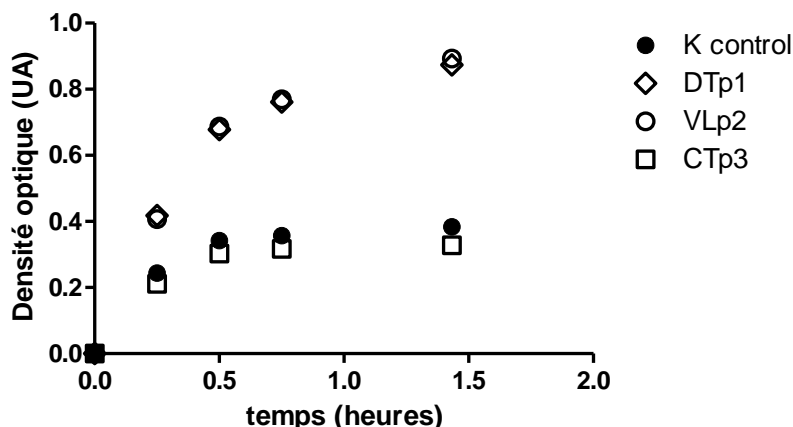
**Figure 64 : Conversion de l'acétate de 4-nitrophényle en p-nitrophénol par les estérases cellulaires**

Nous observons une activité estérasique comparable entre les cellules endothéliales et gliales du modèle de barrière hémato-encéphalique (Figure 65) et elle atteint un maximum (plateau sur les courbes) à partir de 4h d'incubation. Les neurones, en revanche, semblent présenter une activité enzymatique plus faible : la valeur de DO maximale obtenue est plus basse que celle qui est obtenue pour les cellules endothéliales et gliales avec un plateau atteint dès 60 min d'incubation.



*L'activité enzymatique des estérases cellulaires dans les cellules endothéliales (ronds), gliales (carrés) et neuronales (losanges) est mesurée par le test de biotransformation de l'acétate de 4-nitrophényle en p-nitrophénol dont on suit l'apparition par absorbance spectroscopique UV-visible au cours du temps. Elle a été évaluée sur des échantillons dosés à 20 µg/ml de protéines totales.*

Dans les fibroblastes issus de patients (Figure 66), nous observons une activité estérasique efficace au cours du temps avec deux profils distincts. Le sujet contrôle et le patient CTp3 présentent une activité plus faible se traduisant par des densités optiques plus faibles ainsi qu'un maximum d'activité dès 30 minutes d'incubation. Les patients DTp1 et VLp2 semble présenter une activité estérasique plus élevée, dont la saturation apparaît plus tard (à 60 minutes).



**Figure 66 : Activité des estérases cellulaires dans les fibroblastes humains**

*L'activité enzymatique des estérases cellulaires dans les fibroblastes issus d'un sujet contrôle (K control) et de 3 patients pathologiques (DTp1, VLp2 et CTp3) est mesurée par le test de biotransformation de l'acétate de 4-nitrophényle en p-nitrophénol dont on suit l'apparition par absorbance spectroscopique UV-visible au cours du temps. Elle a été évaluée sur des échantillons dosés à 20 µg/ml de protéines totales. Extrait de Trotier-Faurion et al., soumis au J. Med. Chem, 2013*

Nous validons bien ainsi la présence des enzymes nécessaires au clivage enzymatique des esters de créatine en créatine dans les types cellulaires étudiés.

#### **4.5.2 Passage de la BHE par les esters de créatine : internalisation dans les cellules endothéliales et translocation dans le parenchyme cérébral**

Une première étude de relation structure activité a été réalisée afin d'évaluer le passage de la BHE par les esters de créatine ainsi que leur translocation dans le parenchyme cérébral. Pour ce faire, nous avons exploité le modèle de BHE en co-culture et étudié l'internalisation de chaque ester de créatine dans les cellules endothéliales par sa quantification dans le lysat cellulaire (cf Méthodes expérimentales §3.4.2.2). Nous avons également quantifié ces mêmes esters dans les cellules gliales du modèle de BHE. Ceci représentait la capacité des molécules à traverser la monocouche endothéliale et diffuser dans le compartiment représentant le parenchyme cérébral avant d'être captée dans les cellules gliales.

Le Tableau 16 décrit les quantités d'esters de créatine quantifiées dans les lysats cellulaires. Nous constatons en premier lieu que les esters à courte chaîne carbonée (éthyle – C2, butyle – C4) ne sont pas détectables dans les lysats cellulaires endothélial et glial. Ces esters ne semblent donc pas

capables de franchir les membranes cellulaires, ni par un processus de diffusion passive (le logP est proche de 0, les molécules sont trop hydrophiles), ni par un processus actif via le transporteur de la créatine (la présence de la fonction acide carboxylique libre de la créatine semble nécessaire à la reconnaissance du substrat).

Les esters à chaîne moyenne ou longue (octyle – C8, nonyle – C9, dodécyle – C12 et octadécyle C18) sont quantifiables dans les lysats des cellules endothéliales selon une relation de structure-activité : dans l'ordre croissant d'internalisation, nous trouvons l'ester octylique, octadécylique, nonylique et dodécylique. Il semble que la chaîne à 12 carbones favorise l'internalisation dans les cellules endothéliales. Lorsque nous étudions la translocation dans le parenchyme cérébral, nous retrouvons le même profil dans le lysat des cellules gliales. Il est intéressant de remarquer que si l'ester octadécylique pénètre bien dans les cellules endothéliales, nous n'en dosons que des traces dans les cellules gliales : nous avons donc supposé que l'ester restait piégé dans la bicouche lipidique des cellules endothéliales.

Aucune des conditions testées n'induit de toxicité en termes de viabilité cellulaire (endothéliale et gliale) ni en termes de rupture d'intégrité de la BHE (Tableau 17). Ceci a été validé par l'absence de diminution de la fonction mitochondriale lors d'un test de viabilité cellulaire (MTT, cf Méthodes expérimentales §3.4.8.1) ainsi que par l'absence de passage paracellulaire conjoint d'un marqueur d'intégrité, le jaune de Lucifer (cf Méthodes expérimentales §3.4.1.5).

Nous montrons également que seuls les esters nonylique et dodécylique induisent une augmentation de la quantité de créatine intracellulaire contrairement aux esters octylique et octadécylique et que seul l'ester nonylique augmente la concentration en créatine dans les cellules gliales après translocation (Figure 67 A et B). La faible perméabilité de l'ester octylique conduit probablement à un clivage également mais l'augmentation de créatine ne serait pas détectable dans nos conditions expérimentales de dosage. De plus, les résultats obtenus pour l'ester octadécylique sont en accord avec l'hypothèse qu'il serait pris au piège dans la bicouche lipidique endothéliale et non accessible aux estérases. D'autre part, nous observons qu'il existe un efflux de la créatine dans les surnageants puisque nous notons une apparition de créatine dans les compartiments apicaux et basolatéraux (Figure 67) qui semble consécutive à l'incubation des esters de créatine. Cela indiquerait que le clivage de l'ester en créatine conduirait à un relargage de celle-ci. Ce phénomène n'est cependant pas dépendant de la quantité de créatine libérée par l'ester puisque cette augmentation ne varie pas avec l'ester utilisé.

Ester de créatine	MW	logP	concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cellules endothéliales (BHE)		Cellules gliales (BHE)	
				Lysat cellulaire (nmoles/mg)	% T0	Lysat cellulaire (nmoles/mg)	% T0
Ethylique/C2	159.2	-0.72	1	nd	nd	nd	nd
			10	nd	nd ***	nd	nd ***
Butylique/C4	187.2	0.25	1	nd	nd	nd	nd
			10	nd	nd ***	nd	nd ***
Octylique/C8	243.4	2.03	1	-	-	-	-
			10	$0.33 \pm 0.10$	$0.18 \pm 0.06$ ***	$0.24 \pm 0.04$	$0.22 \pm 0.03$ ***
Nonylique/C9	257.4	2.47	1	$1.59 \pm 0.48$	$5.24 \pm 1.55$	$1.44 \pm 0.42$	$5.82 \pm 1.66$
			10	$8.14 \pm 3.95$	$4.21 \pm 1.23$ ***	$13.3 \pm 4.50$	$7.83 \pm 4.00$ ***
Dodécylique/C12	299.5	3.81	1	-	-	-	-
			10	$70.6 \pm 7.80$	$15.4 \pm 1.70$	$31.6 \pm 13.2$	$11.5 \pm 4.77$
Octadécylique/C18	383.6	5.59	1	-	-	-	-
			10	$6.46 \pm 1.42$	$2.03 \pm 0.45$ ***	$0.12 \pm 0.07$	$0.06 \pm 0.03$ ***

**Tableau 16 : Etude de relation structure-activité des esters de créatine : passage de la BHE et translocation dans le parenchyme cérébral après 60 minutes d'incubation avec les esters de créatine**

\*\*\* :  $p < 0.0001$  (ANOVA + Bonferroni) par rapport au Dodécylique/C12

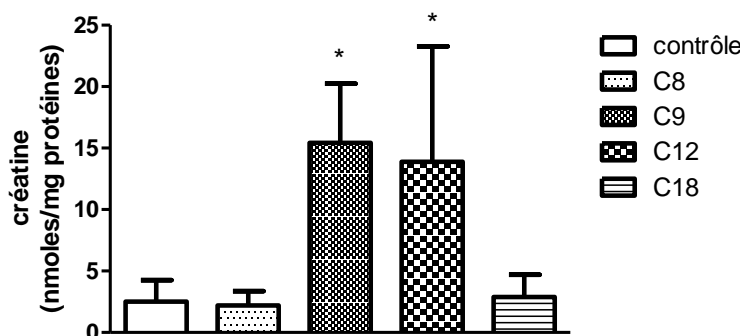
Ester de créatine	concentration ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	LY $P_{app}$ (* $10^{-6}$ cm/s)	MTT cellules endothéliales (% par rapport au contrôle)	MTT cellules gliales (% par rapport au contrôle)
Ethylique/C2	1	$1.54 \pm 0.28$	-	-
	10	$1.13 \pm 0.47$	-	$76.9 \pm 21.5$
Butylique/C4	1	$1.23 \pm 0.55$	-	-
	10	$1.81 \pm 0.69$	-	$90.6 \pm 9.48$
Octylique/C8	1	$0.93 \pm 0.33$	-	-
	10	$2.42 \pm 1.26$	$84.6 \pm 13.0$	$122 \pm 20.4$
Nonylique/C9	1	$1.49 \pm 0.33$	-	-
	10	$1.18 \pm 0.25$	-	$143 \pm 33.2$
Dodécylique/C12	1	$0.70 \pm 0.05$	-	-
	5/10	$1.70 \pm 0.49$	$87.8 \pm 13.0$	$145 \pm 19.9$
Octadécylique/C18	1	-	-	-
	10	-	$95.3 \pm 6.21$	$88.3 \pm 8.81$

**Tableau 17 : Absence de toxicité cellulaire après 60 minutes d'incubation avec les esters de créatine**

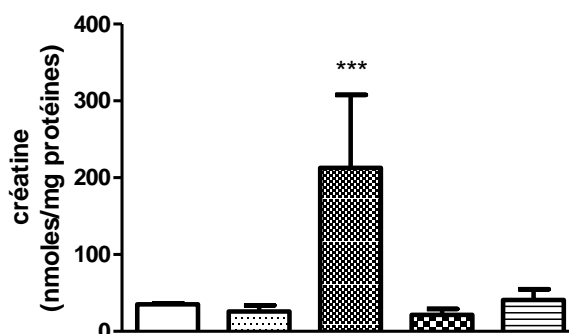
LY  $P_{app}$  : constante de perméabilité du marqueur d'intégrité de la monocouche endothéliale, les valeurs inférieures à  $5.0 \times 10^{-6}$   $\text{cm.s}^{-1}$  indiquent que les esters de créatine n'ont pas altéré les jonctions cellulaires dans nos conditions expérimentales.

MTT : Test de viabilité cellulaire reflétant la fonctionnalité mitochondriale, les valeurs supérieures à 80% du contrôle indiquent que les esters n'exercent pas de toxicité cellulaire dans nos conditions expérimentales

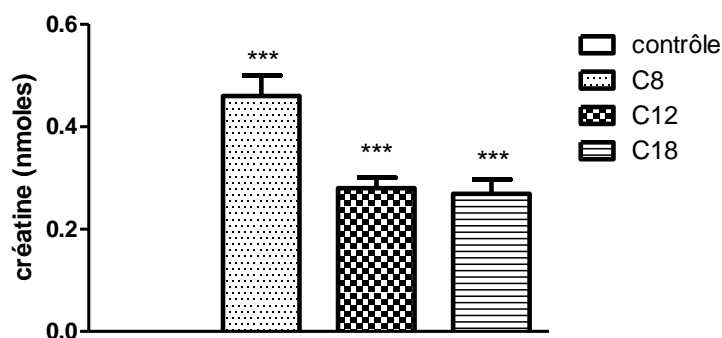
A : lysat endothélial



B : lysat glial



C : compartiment apical



D : compartiment basolatéral

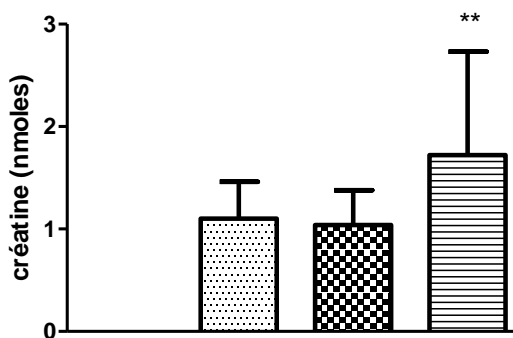


Figure 67 : Quantification de la créatine dans les quatre compartiments du modèle de BHE : lysat endothélial (A) et lysat glial (B), compartiment apical (C) et basolatéral (D)

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.0001$  (ANOVA + Bonferroni) par rapport à la condition contrôle

### 4.5.3 Internalisation des esters de créatine dans les cellules neuronales

L'étude de l'internalisation des esters de créatine dans un modèle *in vitro* de culture primaire de neurones corticaux nous a montré que les esters de créatine à moyenne et longue chaîne carbonée sont détectables dans les lysats cellulaires (Tableau 18). L'ester octadécylique et l'ester dodécylique présentent les meilleures caractéristiques physico-chimiques pour être internalisés puisque nos mesures montrent qu'on les détecte en plus grande quantité dans les lysats cellulaires que dans le surnageant. Au contraire, l'ester éthylique à courte chaîne ne pénètre pas dans les cellules puisqu'on retrouve 100% de la quantité incubée dans le surnageant.

De façon surprenante, nous démontrons que l'internalisation des esters conduit à une déplétion en créatine dans les lysats cellulaires neuronaux.

Nous avons également vérifié que les incubations des esters n'induisaient pas de toxicité sur les cellules neuronales par le test de viabilité cellulaire du LDH (cf Méthodes expérimentales §3.4.8.2) qui traduit la fonction mitochondriale (Tableau 19). Quelque soit la condition expérimentale, nous n'avons pas détecté de neurotoxicité.

Ester de créatine	MW	logP	concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Neurones			
				Surnageant (nmoles)	% T0	Lysat cellulaire (nmoles/mg)	% T0
Ethylique/C2	159.2	-0.72	1	4.78 $\pm$ 0.17	108 $\pm$ 3.75 ***	0.21 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.05 ***
			10	44.4 $\pm$ 0.88	96.0 $\pm$ 1.88 ***	1.47 $\pm$ 0.34	0.16 $\pm$ 0.01 ***
Butylique/C4	187.2	0.25	1	-	-	-	-
			10	-	-	-	-
Octylique/C8	243.4	2.03	1	2.21 $\pm$ 0.36	98.4 $\pm$ 16.0 ***	5.88 $\pm$ 0.44	12.6 $\pm$ 0.29 ***
			10	21.3 $\pm$ 0.62	104 $\pm$ 3.06 ***	5.88 $\pm$ 0.44	11.4 $\pm$ 0.43 ***
Nonylique/C9	257.4	2.47	1	-	-	-	-
			10	-	-	-	-
Dodécylique/C12	299.5	3.81	1	0.18 $\pm$ 0.03	5.87 $\pm$ 1.62	18.6 $\pm$ 3.58	55.3 $\pm$ 28.7
			10	1.85 $\pm$ 0.24	10.5 $\pm$ 2.52	257 $\pm$ 76.8	58.2 $\pm$ 11.3
Octadécylique/C18	383.6	5.59	1	0.27 $\pm$ 0.06	43.1 $\pm$ 9.93 *	12.5 $\pm$ 1.54	75.5 $\pm$ 8.15 ***
			10	6.85 $\pm$ 1.39	80.0 $\pm$ 16.3 ***	53.9 $\pm$ 10.7	32.2 $\pm$ 1.45 ***

**Tableau 18 : Internalisation des esters de créatine dans les cellules neuronales après 60 minutes d'incubation**

\* :  $p < 0.05$  ; \*\*\* :  $p < 0.0001$  (ANOVA + Bonferroni) par rapport au Dodécylique/C12

Ester de créatine	concentration ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	LDH Neurones (ratio comparé au contrôle)
Ethylique/C2	1	0,53
	10	0,53
Butylique/C4	1	0,54
	10	0,58
Octylique/C8	1	0,65
	10	0,64
Nonylique/C9	1	0,52
	10	0,45
Dodécylique/C12	1	0,67
	5/10	0,69
Octadécylique/C18	1	0,65
	10	0,69

**Tableau 19 : Absence de toxicité sur la fonction mitochondriale neuronale après 60 minutes d'incubation des esters de créatine**

LDH : test de viabilité cellulaire reflétant la fonction mitochondriale, les valeurs de ratio par rapport au contrôle inférieures à 1 indiquent que les esters de créatine n'exercent pas de neurotoxicité dans nos conditions expérimentales



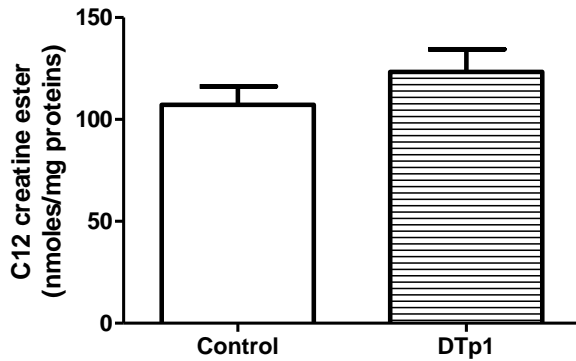
#### **4.5.4 Intérêt thérapeutique de l'ester dodécylrique de créatine dans le traitement du déficit en transporteur de la créatine**

Les études du passage de la BHE et de l'internalisation neuronale semblent indiquer que l'ester dodécylrique de créatine est un composé présentant des propriétés intéressantes de passage des membranes cellulaires. Nous avons validé ce composé dans un modèle *in vitro* pathologique humain, des fibroblastes de patients.

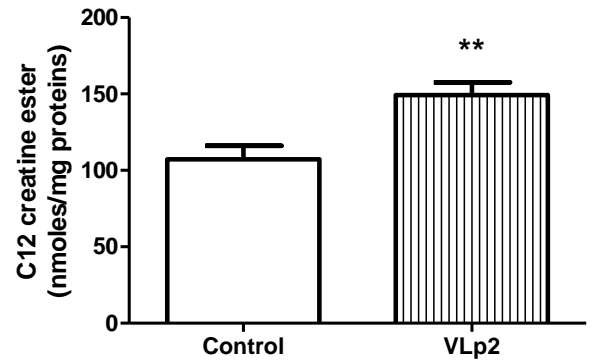
La Figure 68 montre que l'ester dodécylrique de créatine est internalisé dans les cellules même en l'absence d'un transporteur SLC6A8 fonctionnel. En effet, nous quantifions la même quantité d'ester (environ 20% de la dose initiale) dans les cellules contrôles et dans les cellules pathologiques. Ceci indique que l'ester dodécylrique est bien capable de franchir les membranes cellulaires sans être reconnu par le SLC6A8, probablement par diffusion passive.

Nous étudions alors la conversion de cet ester en créatine par dosage HPLC-MS/MS de la créatine dans les lysats cellulaires, puisque c'est le substrat énergétique que nous souhaitons apporter dans les cellules. Les expériences réalisées au §1.3.1.1 indiquent que les estérases sont fonctionnelles dans les cellules fibroblastiques testées. La Figure 69 montre que lors de l'incubation de 10 µg/ml d'ester dodécylrique pendant 60 minutes, la quantité de créatine intracellulaire augmente chez le sujet contrôle mais également chez les 3 patients où l'on voit apparaître un signal de créatine. Ceci indique que l'ester dodécylrique de créatine qui a pénétré dans les cellules a subi une hydrolyse par les enzymes cellulaires, ce qui a permis d'augmenter la quantité de créatine dans les cellules.

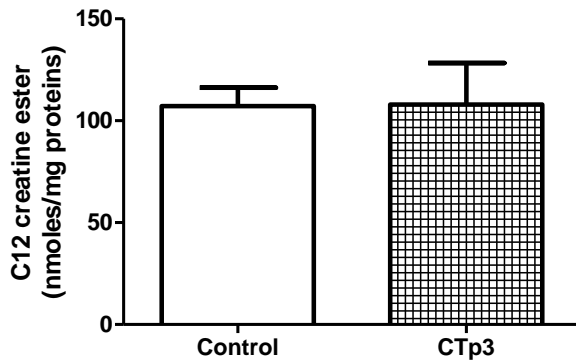
A :



B :



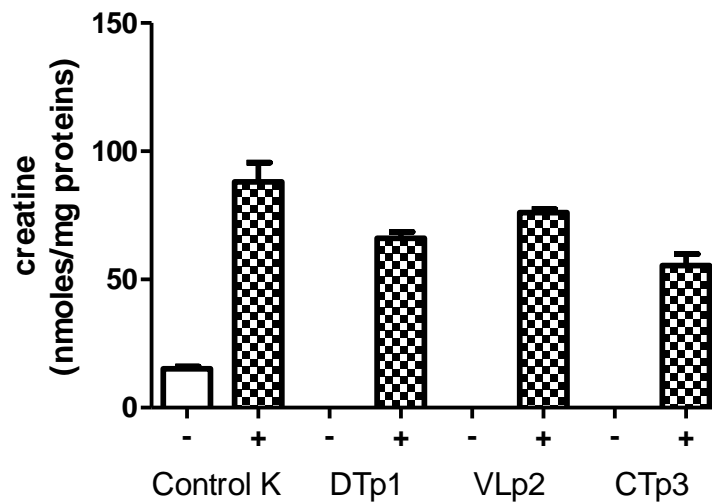
C :



**Figure 68 : Internalisation de l'ester dodécylique de créatine (quantifié en nmoles d'ester rapporté à la quantité protéique) dans les fibroblastes humains pédiatriques.**

*Control : sujet non pathologique ; DTp1, VLp2, CTp3 : patients atteints du déficit en transporteur de la créatine.*

*\*\* :  $p < 0.01$  (unpaired t-test Student). Extrait de Trotier-Faurion et al., soumis au J Med Chem, 2013*



**Figure 69 : Conversion de l'ester dodécylique de créatine en créatine dans les cellules fibroblastiques du sujet contrôle (Control K) et des 3 patients atteints du déficit en transporteur de la créatine (DTp1, VLp2 et CTp3)**

*La quantité de créatine est exprimée en nmoles par mg de protéines. - : pas d'incubation de l'ester dodécylique de créatine ; + : incubation de l'ester dodécylique de créatine pendant 60 minutes. Extrait de Trotier-Faurion et al., 2013*



***BREVET***

***(ACCEPTÉ LE 30 JUILLET 2012)***





**Erfindernennung**  
**Designation of inventor**  
**Désignation de l'inventeur**

(falls Anmelder nicht oder nicht allein der Erfinder ist) /  
 (where the applicant is not the inventor or is not the sole inventor) /  
 (si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Zeichen des Anmelders / Applicant's reference /  
 Référence du demandeur  
 (max. 15 Positionen / max. 15 spaces / 15 caractères au maximum)

SP52730EP/SG

Anmeldenummer oder, falls noch nicht bekannt, Bezeichnung der Erfindung: /  
 Application No. or, if not yet known, title of the invention: /  
 N° de la demande ou, s'il n'est pas encore connu, titre de l'invention :

METHOD FOR PREPARING CREATINE  
 FATTY ESTERS,  
 CREATINE FATTY ESTERS THUS  
 PREPARED AND USES THEREOF

In Sachen der oben bezeichneten europäischen Patentanmeldung nennt (nennen) der (die) Unterzeichnete(n)<sup>1</sup> / In respect of the above European patent application  
 I (we), the undersigned<sup>1</sup> / En ce qui concerne la demande de brevet européen susmentionnée, le(s) soussigné(s)<sup>1</sup>

Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives

als Erfinder<sup>2</sup>: / do hereby designate as inventor(s)<sup>2</sup>: / désigne(nt) en tant qu'inventeur(s)<sup>2</sup>:

1/ DEZARD Sophie 7 rue de Vaux 91470 Forges Les Bains FRANCE	2/ TARAN Frédéric 116 allée des Fours Blancs 91190 Gif sur Yvette FRANCE	3/ TROTIER-FAURION Alexandra 107 Av. du Général Leclerc 92340 Bourg La Reine FRANCE
---	---	--

Weitere Erfinder sind auf einem gesonderten Blatt angegeben. / Additional inventors are indicated on a supplementary sheet. /  
 D'autres inventeurs sont mentionnés sur une feuille supplémentaire.

Der (Die) Anmelder hat (haben) das Recht auf das europäische Patent erlangt<sup>2</sup> / The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent<sup>2</sup> /  
 Le(s) demandeur(s) a (ont) acquis le droit au brevet européen<sup>2</sup>

gemäß Vertrag vom /  
 by an agreement dated /  
 en vertu du contrat passé le

als Arbeitgeber /  
 as employer(s) /  
 en qualité d'employeur(s)

durch Erbfolge /  
 as successor(s) in title /  
 par succession

Ort / Place / Lieu

Toulouse

Datum / Date

July 30, 2012

Unterschrift(en) des (der) Anmelder(s) oder Vertreter(s): /  
 Signature(s) of applicant(s) or representative(s): /  
 Signature(s) du (des) demandeur(s) ou du (des) mandataire(s) :

Stéphanie GADAL  
 European Patent Attorney  
 No. 09 221550

Name des (der) Unterzeichneten bitte in Druckschrift wiederholen. Bei juristischen Personen bitte die Stellung des (der) Unterzeichneten innerhalb der  
 Gesellschaft in Druckschrift angeben. / Please print name(s) under signature(s). In the case of legal persons, the position of the signatory within the company  
 should also be printed. / Le ou les noms des signataires doivent être indiqués en caractères d'imprimerie. S'il s'agit d'une personne morale, la position occupée  
 au sein de celle-ci par le ou les signataires doit également être indiquée en caractères d'imprimerie.

bitte wenden / P.T.O. / T.S.V.P.



12352002.5 / EP12352002

**Erfindernennung**  
**Designation of inventor**  
**Désignation de l'inventeur**

(falls Anmelder nicht oder nicht allein der Erfinder ist) /  
 (where the applicant is not the inventor or is not the sole inventor) /  
 (si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Zeichen des Anmelders / Applicant's reference /  
 Référence du demandeur  
 (max. 15 Positionen / max. 15 spaces / 15 caractères au maximum)

SP52730EP/SG

Anmeldenummer oder, falls noch nicht bekannt, Bezeichnung der Erfindung: /  
 Application No. or, if not yet known, title of the invention: /  
 N° de la demande ou, s'il n'est pas encore connu, titre de l'invention :

METHOD FOR PREPARING CREATINE  
 FATTY ESTERS,  
 CREATINE FATTY ESTERS THUS  
 PREPARED AND USES THEREOF

In Sachen der oben bezeichneten europäischen Patentanmeldung nennt (nennen) der (die) Unterzeichnete(n)! / In respect of the above European patent application  
 I (we), the undersigned! / En ce qui concerne la demande de brevet européen susmentionnée, le(s) soussigné(s)!

Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives

als Erfinder<sup>2</sup>: / do hereby designate as inventor(s)<sup>2</sup>: / désigne(nt) en tant qu'inventeur(s)<sup>2</sup>:

4/ MABONDZO Aloïse  
 93 Boulevard Port Royal  
 75013 PARIS  
 FRANCE

Weitere Erfinder sind auf einem gesonderten Blatt angegeben. / Additional inventors are indicated on a supplementary sheet. /  
 D'autres inventeurs sont mentionnés sur une feuille supplémentaire.

Der (Die) Anmelder hat (haben) das Recht auf das europäische Patent erlangt<sup>3</sup> / The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent<sup>3</sup> /  
 Le(s) demandeur(s) a (ont) acquis le droit au brevet européen<sup>3</sup>

gemäß Vertrag vom /  
 by an agreement dated /  
 en vertu du contrat passé le

als Arbeitgeber /  
 as employer(s) /  
 en qualité d'employeur(s)

durch Erbfolge /  
 as successor(s) in title /  
 par succession

Ort / Place / Lieu


Toulouse

Datum / Date

July 30, 2012

Unterschrift(en) des (der) Anmelders(s) oder Vertreter(s): /  
 Signature(s) of applicant(s) or representative(s): /  
 Signature(s) du (des) demandeur(s) ou du (des) mandataire(s) :

Stéphanie GADAL  
 European Patent Attorney  
 No. 09 221550



Name des (der) Unterzeichneten bitte in Druckschrift wiederholen. Bei juristischen Personen bitte die Stellung des (der) Unterzeichneten innerhalb der Gesellschaft in Druckschrift angeben. / Please print name(s) under signature(s). In the case of legal persons, the position of the signatory within the company should also be printed. / Le ou les noms des signataires doivent être indiqués en caractères d'imprimerie. S'il s'agit d'une personne morale, la position occupée au sein de celle-ci par le ou les signataires doit également être indiquée en caractères d'imprimerie.

bitte wenden / P.T.O. / T.S.V.P.

**METHOD FOR PREPARING CREATINE FATTY ESTERS,  
CREATINE FATTY ESTERS THUS PREPARED AND USES THEREOF**

**□ DESCRIPTION**

**□ TECHNICAL FIELD**

The present invention belongs to the domain of creatine derivatives and notably to creatine fatty esters.

More particularly, the present invention relates to a method for preparing (or producing) creatine fatty esters by carrying out a ring opening step on diprotected creatinine using a molecule bearing an alcohol functional group.

The present invention also concerns particular creatine fatty esters thus prepared and the different uses of these new creatine fatty esters in research, therapy, imaging or diagnosis.

**□ STATE OF THE PRIOR ART**

Creatine is an endogenous nutrient produced naturally by the liver and kidneys in most vertebrates. The uses of creatine are many, including use as supplement to increase muscle mass and enhance muscle performance as well as in emerging applications in the treatment of various disorders such as, without limitation, Parkinson's disease, Huntington's disease, various neuromuscular disorders, hypoxia and ischemic brain diseases such as stroke, heart disease, various muscular dystrophies [1] and various skin disorders [2]. Creatine may also be used as anti-inflammatory agent [3]. Notably, local administration of creatine can be achieved by absorption through the skin [4].

Typically, creatine is taken up into muscle cells by specific receptors and converted to phosphocreatine by creatine kinase. Muscle cells, including skeletal muscle and the heart muscle, function by utilizing cellular energy released from the conversion of adenosine triphosphate (ATP)



to adenosine diphosphate (ADP). The amount of phosphocreatine in the muscle cell determines the amount of time it will take for the muscle to recover from activity and regenerate ATP. Phosphocreatine is a rapidly accessible source of phosphate required for regeneration of ATP and sustained use of the muscle. For example, energy used to expand and contract muscles is supplied by ATP. ATP is metabolized in the muscle by cleaving a phosphate radical to release energy needed to contract the muscle. Adenosine diphosphate (ADP) is formed as a byproduct of this metabolism.

The most common sources of ATP are from glycogen and creatine phosphate. Creatine phosphate is favored as a ready source of phosphate because it is able to resynthesize ATP at a greater rate than is typically achieved utilizing glycogen. Therefore, increasing the amount of creatine in the muscle increases the muscle stores of phosphocreatine and has been proven to increase muscle performance and increase muscle mass.

However, creatine itself is poorly soluble in an aqueous solution (about 10-15 mg/ml). Further creatine is not well absorbed from the gastrointestinal (GI) tract. Indeed, creatine has been estimated to have a 14% or less absorption rate from the GI tract. Creatine also has low oral bioavailability due, in part, to (i) low lipophilicity and therefore poor membrane permeability, and (ii) rapid conversion to creatinine in the acidic environment of the stomach [5]. Thus, current products require administration of large amounts, typically 5 grams or more, of creatine in order to be effective, which causes side effects as bloating, gastrointestinal (GI) distress, diarrhea, and the like.

The deficits of the metabolism of creatine, include enzymatic deficits of its biosynthesis (deficits in AGAT and GAMT of recessive autosomic transmission) and of its intracerebral transport (gene SLC6A8/CT1, related to X). The

incidence of the disease is approximately 2% of all X-linked mental retardation of unknown ethiology. These deficits result in severe backwardnesses with a prevalence on the language, an extrapyramidal syndrome, disorders of behavior and in certain cases epilepsy. The disease appears most of the time during childhood but adult cases were recently reported.

The response to a treatment by creatine seems to be favorable only in the case of a deficit in the synthesis of creatine but not in the case of a deficit of intra-cerebral transport of creatine. Indeed, in this case, the findings of the two years of treatment creatine by oral administration associated with its precursors L-Arginine and L-Glycine showed neither real improvement nor an increase in intra-cerebral creatine levels. Thus this is a clinical situation where the absence of functional transporters of creatine at the blood-brain barrier (BBB) prevents the entry of creatine in the brain affecting the cerebral functions. A better definition and an evaluation of new strategies for pharmacological optimization for this cerebral metabolic disease are thus today more than necessary.

These diseases and the above-described shortcomings and side effects can be avoided by the administration of creatine esters, which are converted into creatine by endogenous esterases found in a variety of cells and biological fluids [1]. Creatine esters are more lipophilic than creatine and therefore have a greater bioavailability. Additionally, the carboxylic acid functional group of creatine is masked through esterification in creatine esters, thereby preventing the formation of the undesired product creatinine.

All creatine fatty esters methods described in patents and patent applications involve Brönsted acids-catalyzed reaction of creatine with alcohols. Creatine esters can be formed by reaction of creatine with alcohols by gaseous hydrochloride catalysis [6]. Creatine fatty esters can also be

formed from direct synthesis by *in situ* acid production of an acid catalyst [7-8]. The patent application [7] discloses several creatine esters obtainable by this synthesis (paragraph [0022]). In these creatine esters, the hydrocarbyl group substituting the oxygen atom of the ester function can comprise from 1 to 25 carbon atom(s).

Other creatine derivatives are disclosed in the prior art. Creatine fatty acid anhydrides are prepared by direct reaction of creatine with fatty acyl halide [9]. Creatinyl amides are produced by guanidinylation of sarcosine peptide to produce creatinyl aminoacids [10]. Amide linkage between the guanidyl group of creatinine and fatty acid is also described [11]. Nevertheless, in the inventors' hands, the preparation of fatty esters as fatty anhydrides according to these patents and patent applications gave very poor yields. These methods are well adapted to alcohols of low molecular weight such as EtOH, *n*PrOH and *n*BuOH but yields are dramatically reduced in case of fatty, long chain alcohols.

Clearly, a need exists for a process allowing efficient production of creatine fatty esters. Indeed, an efficient synthesis of creatine fatty esters would be a significant progress in the therapeutic and diagnostic fields.

#### **□ DISCUSSION OF THE INVENTION**

The present invention solves the above-listed technical problems and provides a solution to the aforementioned need. Indeed, the inventors describe the production of creatine fatty esters using fatty alcohols with an overall yield of 45%. The efficiency of this process is higher than those previously described in literature and allows obtaining creatine derivatives that are difficult to prepare by known techniques.

In addition, the synthesis according to the present invention is cheap and can be applied at the multi-gram scale for therapeutic needs.

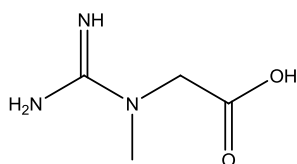
Then, the preparation method according to the present invention can be carried by any fatty alcohol, but also by any molecule bearing at least one alcohol functional group such as, for example, glucose.

More particularly, the present invention concerns a method for preparing a creatine fatty ester or derivative thereof comprising at least one step consisting in reacting a diprotected creatinine with a molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) :



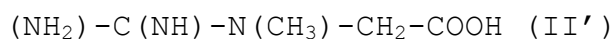
in which R' represents a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms.

In what precedes and what follows, creatine (2-1(methylguanidino) acetic acid) is represented by the following formula (II) :

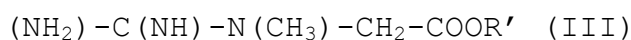


2-(1-methylguanidino)acetic acid (II)

Creatine can also be represented by the following formula (II') :



In the present invention, a creatine fatty ester is represented by the formula (III) :



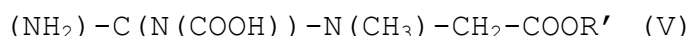
in which R' represents a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms.

In the present invention, a creatine fatty ester derivative is a creatine fatty ester in which at least one of the hydrogen atoms of the methylguanidinyll group is substituted by a carboxylic acid group (-COOH). Advantageously, the creatine derivative is represented by the following formula (IV) :



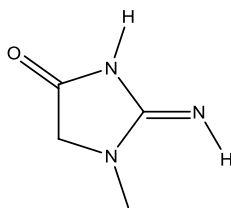
in which the radical R' represents a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms and the radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, identical or different, represent an hydrogen atom or a carboxylic acid group and at least one among the radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> is a carboxylic acid group.

Particularly, in the creatine derivative represented by the formula (IV), only one radical among R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> is a carboxylic acid group and the two other radicals are hydrogen atoms. More particularly, the radical R<sub>1</sub> is a carboxylic acid group and the radicals R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are hydrogen atoms. In this case, the creatine derivative is of the following formula (V) :



in which the radical R' represents a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms.

In what precedes and what follows, creatinine (2-imino-1-methylimidazolidin-4-one) is represented by the following formula (VI) :



2-imino-1-methylimidazolidin-4-one (VI)

In the present invention, diprotected creatinine is a creatinine in which the two hydrogen atoms substituting the two nitrogen atoms are replaced by two protecting groups, identical or different. It is clear that the protection is not borne by the methyl group substituting the 3<sup>rd</sup> nitrogen atom of the creatinine. In a diprotected creatinine, the two protecting groups are advantageously identical.

Any adapted protecting group known by one of ordinary skill in the art can be used in the context of the present invention.

Advantageously, the protecting group implemented in the present invention is represented by the formula (VII) :



in which the radical  $R_4$  represents a hydrocarbon group.

The hydrocarbon group  $R_4$  is a hydrocarbon group with 1 to 20 carbon atoms such as an alkyl radical with 1 to 20 carbon atoms, an alkenyl radical with 2 to 20 carbon atoms, an alkoxy radical with 1 to 20 carbon atoms, an aryl radical with 6 to 20 carbon atoms, and an aryloxy radical with 6 to 20 carbon atoms.

Within the scope of the present invention and unless indicated otherwise, by « alkyl group with 1 to 20 carbon atoms » is meant a linear, branched or cyclic (hetero)alkyl group, optionally substituted, with 1 to 20 carbon atoms, notably with 1 to 15 carbon atoms and in particular, with 1 to 10 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroalkyl group being N, O, P or S.

Within the scope of the present invention, by « alkenyl group with 2 to 20 carbon atoms » is meant a linear, branched or cyclic (hetero)alkenyl group, optionally substituted, with 2 to 20 carbon atoms, notably with 2 to 15 carbon atoms and in particular, with 2 to 10 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroalkenyl group being N, O, P or S.

Within the scope of the present invention, by « alkoxy group with 1 to 20 carbon atoms » is meant an oxygen atom substituted with an alkyl with 1 to 20 carbon atoms as defined earlier.

Within the scope of the present invention, by « aryl group with 6 to 20 carbon atoms », is meant a mono- or polycyclic (hetero)aromatic group, optionally substituted, having from 6 to 20 carbon atoms, notably from 6 to 14 carbon atoms, in particular, from 6 to 8 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroaromatic group being N, O, P or S.

Within the scope of the present invention, by « aryloxy group with 6 to 20 carbon atoms » is meant an oxygen atom substituted with an aryl with 6 to 20 carbon atoms as defined earlier.

Within the scope of the present invention, by « optionally substituted » is meant a radical which can be substituted with one or more groups selected from an alkyl group, an aryl group, an alkoxy group, a halogen, a hydroxy, a cyano, a trifluoromethyl or a nitro.

Within the scope of the present invention, by « halogen » is meant a fluorine, chlorine, bromine or iodine.

Particularly, the protecting group R<sub>4</sub> implemented in the present invention is chosen from the group consisting of an optionally substituted benzoyl group, a tert-butoxycarbonyl (BOC) group and a fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) group. More particularly, the protecting group implemented in the present invention is an optionally substituted benzoyl group and notably a benzoyl group.

The radical R' present in the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I), in the creatine fatty ester of formula (III) and in the creatine fatty ester derivative of formula (IV) or (V) is a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms. Advantageously, the radical R' is chosen in the group consisting of an alkyl

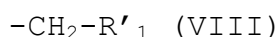
radical with 4 to 30 carbon atoms, an alkenyl radical with 4 to 30 carbon atoms, and an aryl radical with 6 to 30 carbon atoms.

Within the scope of the present invention and unless indicated otherwise, by « alkyl group with 4 to 30 carbon atoms » is meant a linear, branched or cyclic (hetero)alkyl group, optionally substituted, with 4 to 30 carbon atoms, notably with 4 to 25 carbon atoms and in particular, with 4 to 20 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroalkyl group being N, O, P or S.

Within the scope of the present invention, by « alkenyl group with 4 to 30 carbon atoms » is meant a linear, branched or cyclic (hetero)alkenyl group, optionally substituted, with 4 to 30 carbon atoms, notably with 4 to 25 carbon atoms and in particular, with 4 to 20 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroalkenyl group being N, O, P or S.

Within the scope of the present invention, by « aryl group with 6 to 30 carbon atoms », is meant a mono- or polycyclic (hetero)aromatic group, optionally substituted, having from 6 to 30 carbon atoms, notably from 6 to 25 carbon atoms, in particular, from 6 to 20 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroaromatic group being N, O, P or S.

In a 1<sup>st</sup> particular embodiment of the present invention, the radical R' present in the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I), in the creatine fatty ester of formula (III) and in the creatine fatty ester derivative of formula (IV) or (V) is represented by the following formula (VIII) :



in which R'<sub>1</sub> is a hydrocarbon radical containing at least 3 carbon atoms. Advantageously, the radical R'<sub>1</sub> is chosen in the group consisting of an alkyl radical with 3 to 30



carbon atoms, an alkenyl radical with 3 to 30 carbon atoms, and an aryl radical with 6 to 30 carbon atoms.

Within the scope of the present invention and unless indicated otherwise, by « alkyl group with 3 to 30 carbon atoms » is meant a linear, branched or cyclic (hetero)alkyl group, optionally substituted, with 3 to 30 carbon atoms, notably with 3 to 25 carbon atoms and in particular, with 3 to 20 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroalkyl group being N, O, P or S.

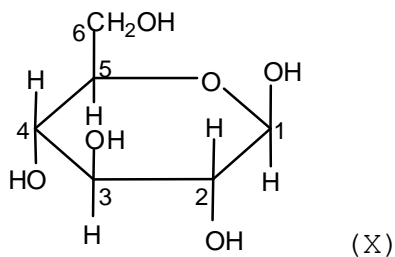
Within the scope of the present invention, by « alkenyl group with 3 to 30 carbon atoms » is meant a linear, branched or cyclic (hetero)alkenyl group, optionally substituted, with 3 to 30 carbon atoms, notably with 3 to 25 carbon atoms and in particular, with 3 to 20 carbon atoms, the heteroatom(s) of the heteroalkenyl group being N, O, P or S.

In a 2<sup>nd</sup> particular embodiment of the present invention, the radical R' present in the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I), in the creatine fatty ester of formula (III) and in the creatine fatty ester derivative of formula (IV) or (V) is a glucosyl radical optionally substituted.

In what follows, glucose can be represented by the following Fischer formula (IX) :



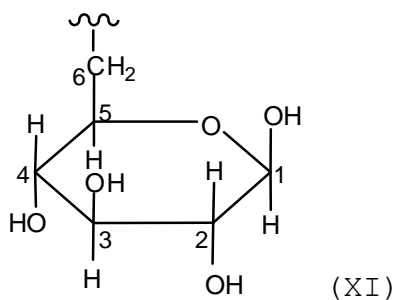
Alternatively, glucose can be represented by the formula (X) :



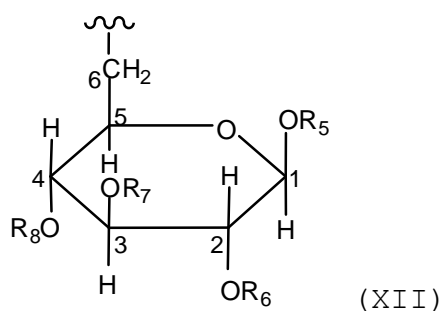
By « glucosyl radical », is meant a radical of formula  $C_6H_{11}O_5$  derived from glucose by elimination of one of the hydroxyl group thereof. The eliminated hydroxyl group can be borne by one of the 5 carbon atoms  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  or  $C_6$  (carbon nomenclature refers to formula (X)).

By « substituted glucosyl radical », is meant a glucosyl radical substituted with one or more substitution groups selected from an alkyl group, an aryl group, an alkoxy group, a halogen, a cyano, a trifluoromethyl or a nitro.

In a 1<sup>st</sup> embodiment, the eliminated hydroxyl group is the one of the carbon atom  $C_6$  and thus the glucosyl radical can be represented by the following formula (XI) :



In this 1<sup>st</sup> embodiment, a substituted glucosyl radical can be represented by the following formula (XII) :



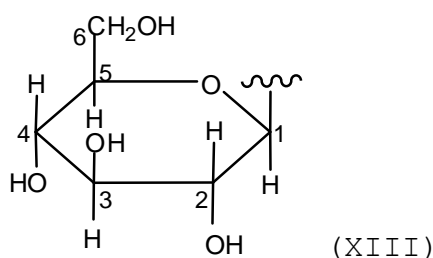
in which the radicals  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  and  $R_8$ , identical or different, represent a substitution group as previously defined.

Advantageously, the radicals  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  and  $R_8$  are identical groups and notably each represents a benzyl group.

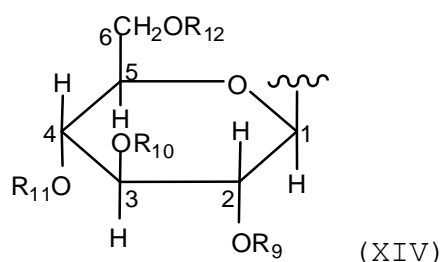
Alternatively, the radicals  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  and  $R_8$  represent each a group selected from an alkyl group such as a methyl group or an ethyl group and an aryl group such as a benzyl

group. In particular, the radical  $R_5$  is a methyl group and the radicals  $R_6$ ,  $R_7$  and  $R_8$  are benzyl groups.

In a 2<sup>nd</sup> embodiment, the eliminated hydroxyl group is the one of the carbon atom  $C_1$  and thus the glucosyl radical can be represented by the following formula (XIII) :



In this 2<sup>nd</sup> embodiment, a substituted glucosyl radical can be represented by the following formula (XIV) :



in which the radicals  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  and  $R_{12}$ , identical or different, represent a substitution group as previously defined.

Advantageously, the radicals  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  and  $R_{12}$  are identical groups and notably each represents a benzyl group.

Alternatively, the radicals  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  and  $R_{12}$  represent each a group selected from an alkyl group such as a methyl group or an ethyl group and an aryl group such as a benzyl group.

In the present invention, the compounds of formulae (I), (II), (II'), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII) and (XIV) can present one or more radioisotope(s), advantageously chosen from iodine-123, iodine-125, iodine-126, iodine-133, iodine-131, iodine-124,

indium-111, indium-113m, bromine-77, bromine-76, gallium-67, gallium-68, ruthenium-95, ruthenium-97, technetium-99m, fluorine-19, fluorine-18, carbon-13, carbon-11, nitrogen-15, nitrogen-13, oxygen-17, oxygen-15, oxygen-14, scandium-47, tellurium-122m, thulium-165, yttrium-199, copper-64, copper-62, gadolinium-68 and rubidium-82.

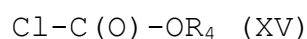
Advantageously, the preparation method of a creatine fatty ester or derivative thereof according to the present invention comprises the following successive steps consisting in :

- a) reacting creatinine with a protective agent to obtain a diprotected creatinine, as defined earlier ;
- b) reacting the diprotected creatinine obtained at step (a) with a molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) as defined earlier to obtain a diprotected creatine fatty ester ; and
- c) deprotecting the diprotected creatine fatty ester or derivative thereof obtained at step (b), in order to obtain said creatine fatty ester or derivative thereof as defined earlier.

Step (a) of the preparation method according to the present invention consists in protecting the guanidine group of creatinine.

This protection can be carried out by any protection method known by one of ordinary skill in the art. The latter will know, as a function of the protecting groups to be introduced in creatinine, how to choose the most appropriate protective agent and experimental conditions.

As already explained, the groups protecting the guanidine group of creatinine are advantageously of formula (VI). In these conditions, step (a) consists in putting into contact the creatinine with a protective agent capable of producing a protecting group as previously defined, to obtain a diprotected creatinine. Advantageously, such protective agent is of formula (XV) :



in which the radical  $R_4$  represents a hydrocarbon group, as previously defined.

Step (a) can be carried out by any protection method known by one of ordinary skill in the art. The latter will know, as a function of the protective agent that is employed, how to choose the most appropriate method of protection.

For example, when such protective agent is of formula (XV), the solvent in the solution containing creatinine and this protective agent is typically dichloromethane (DCM) and notably anhydrous DCM. This solution can also contain any chemical compound which might facilitate the formation of diprotected creatinine. For example, such facilitating chemical compound can be the Hünig's base or *N,N*-diisopropyl ethylamine (DIEPA). For one equivalent of creatinine, the solution implemented can contain between 1,5 and 7 equivalents and notably between 2 and 4 equivalents of protective agent. Similarly, for one equivalent of creatinine, the solution implemented can contain between 1,5 and 7 equivalents and notably between 2 and 4 equivalents of DIEPA. Advantageously, the amount of protective agent and of DIEPA expressed in equivalents is identical in the implemented solution.

Step (a) can be performed under inert atmosphere and, for example, under nitrogen.

The solution implemented during the step (a) of the method according to the present invention can be subject to stirring for creatinine and protective agent to react together. Any mechanical technique allowing stirring may be used for this purpose. As examples of such techniques, manual stirring, treatment with ultrasounds, mechanical stirring or a combination of such techniques may be mentioned. These techniques may require the use of a magnetic stirrer and of a magnetized bar or an ultrasonic bath or of a mechanical stirrer with rods, vanes, propellers, etc. This stirring may

last for 1 min to 1 h, notably from 15 to 45 min at a temperature comprised between 0 and 10°C, notably between 2 and 6°C and continue between 6 and 18 h, notably between 10 and 15 h at a temperature comprised between 8 and 40°C, notably 12 and 30°C and, particularly, at room temperature (RT) (i.e. 20°C ± 4°C).

The diprotected creatinine obtained after step (a) is easily purified. Indeed, once the step (a) of the method according to the present invention achieved, the diprotected creatinine thus obtained can be purified prior to step (b) by any purification technique known by one having ordinary skill in the art. By way of non-limiting examples, mention may be made of chromatography, flash chromatography, flash chromatography on silica gel and notably on silica gel with Heptane/Ethyl Acetate gradient, a semi-preparative HPLC, etc.

In the method of the present invention, step (b) consists in producing a diprotected creatine fatty ester, which is performed by reacting the diprotected creatinine with the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) as defined earlier. The reaction consists in a nucleophilic addition of the molecule of formula (I) on the diprotected creatinine.

In a particular embodiment, the solvent solution implemented during step (b) is the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I). One can say that the step (b) is performed without solvent, which means without any other solvent than the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I).

Alternatively, an additional solvent can be added to the solution containing the diprotected creatinine and the molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I). As for example of additional solvent usable, one can cite toluene.

In the solution implemented at step (b), for one equivalent of diprotected creatinine, the amount of molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) expressed in equivalent is comprised between 1 and 15, notably between 1 and 10. The table 5 hereinafter presents different molecules bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) and the amount thereof used at step (b) of the present invention.

The step (b) is carried out during 1 to 20 h, notably during 2 to 16 h, and particularly, during 2 to 10 h. Typically, it can be carried out during about 3 h (i.e.  $3 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$ ), about 4 h (i.e.  $4 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$ ), about 5 h (i.e.  $5 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$ ) or about 6 h (i.e.  $6 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ ). This step (b) is carried out under atmospheric pressure and at a temperature comprised between 60 and 100°C, notably 70 and 90°C and, particularly, at around 80°C (i.e.  $80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ ).

Once the step (b) of the method according to the present invention achieved, the diprotected creatine ester thus obtained can be purified prior to step (b) by any purification technique known by one having ordinary skill in the art. By way of non-limiting examples, mention may be made of chromatography, flash chromatography, flash chromatography on silica gel and notably on silica gel with Heptane/Ethyl Acetate gradient, a semi-preparative HPLC, etc.

The structure and purity of diprotected creatine fatty ester is determined after purification on silica gel by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS), Thin Layer Chromatography (TLC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and, in particular,  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR, InfraRed spectroscopy (IR spectroscopy) and/or melting point determination.

The deprotection step (c) is carried out for passing from the diprotected creatine fatty ester obtained in step (b)

to the creatine fatty ester of formula (III) or to the creatine fatty ester derivative of formula (IV) or (V).

The elimination of the protecting groups of the amine functions of the diprotected creatine fatty ester, i.e. the deprotection, can be carried out by any deprotection method known by one of ordinary skill in the art. The latter will know, as a function of the protecting groups that are employed, how to choose the most appropriate method of deprotection.

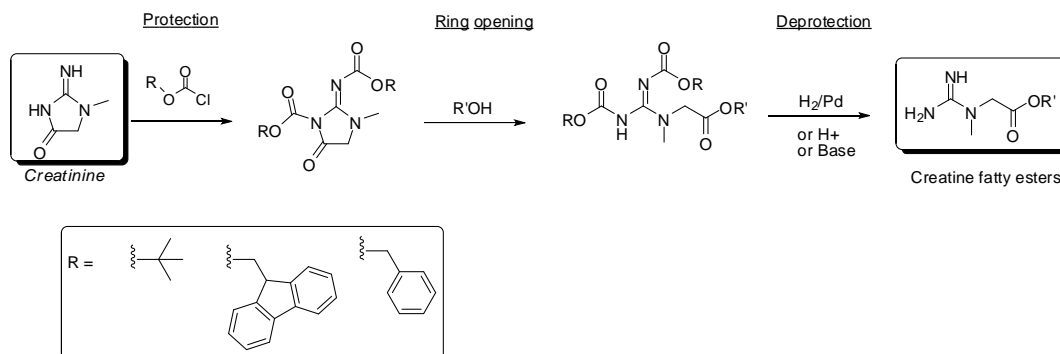
Advantageously, when the protecting group is a compound of formula (VII), step (c) is achieved by hydrogen in the presence of supported palladium over alumina or charcoal. This reaction is carried out in a solvent advantageously selected from dichloroethane (DCE), dichloromethane (DCM), acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) or a mixture of DCM and a lower alcohol. By "lower alcohol" is meant in the context of the present invention an aliphatic alcohol having 1 to 3 carbon atoms, such as methanol, ethanol and propanol. More particularly, the mixture of DCM/lower alcohol used as solvent in deprotection step (c) is a DCM/methanol mixture.

This deprotection step (c) is carried out during 1 to 6 h, notably during 2 to 4 h and, particularly, during about 3 h (i.e.  $3 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$ ). This deprotection step (c) is also carried out under atmospheric pressure and at a temperature comprised between 8 and  $40^\circ\text{C}$ , notably 12 and  $30^\circ\text{C}$  and, particularly, at room temperature (RT) (i.e.  $20^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$ ).

In a particular embodiment, the deprotection step (c) can be repeated at least once, in conditions identical to or different from the 1<sup>st</sup> deprotection step. Such a repetition can be necessary if a monoprotected creatine fatty ester is obtained after implementing the 1<sup>st</sup> step (c).

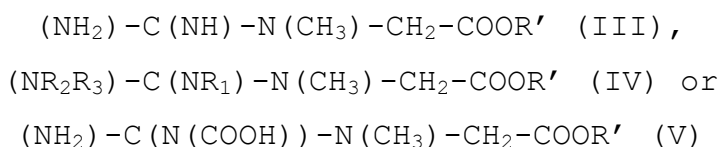


The chemical reactions carried out to prepare creatine esters in accordance with particular embodiments of the present invention are depicted in scheme 1.



The present invention also concerns compounds that can be prepared by a method according to the present invention and, more particularly, by a method into which the alcohol of formula R'-OH is glucose or substituted glucose.

In other words, the compound according to the present invention is a compound of formula (III), (IV) or (V):



in which :

- the radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, identical or different, represent an hydrogen atom or a carboxylic acid group and at least one among the radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> is a carboxylic acid group.
- the radical R' is a glucosyl radical optionally substituted, or a salt thereof.

All the different embodiments disclosed for radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R' apply to the compound according to the present invention.

In the context of the invention, "salt" refers to acid addition salts and base addition salts. Such salts can be formed by conventional means, for example by reaction of a

form of free acid or a form of free base of a compound of the invention with one or several equivalents of an appropriate acid or base, optionally in a solvent, or in a medium in which the salt is insoluble, then by extracting said solvent, or said medium, by using conventional techniques (for example in vacuum or by freeze drying). The salts can also be prepared by replacing a counter-ion of a compound of the invention in the form of a salt with another counter-ion, for example by using an appropriate ion-exchange resin.

Especially in the purpose of being administered to a human or animal body, the salts of compounds according to the invention are advantageously pharmaceutically acceptable salts.

In particular, when the compounds according to the invention are in the form of a salt, the latter being a salt of an alkali metal, in particular sodium or potassium salt, or salt of alkaline earth metal, in particular magnesium or calcium, or even a salt with an organic amide, more particularly with an amino acid such as arginine or lysine.

When the compounds according to the invention which have an amine function are in the form of a salt of this amine, the salt is a salt of inorganic acid such as, for example, hydrochloric acid, sulfuric acid, or hydrobromic acid, or in the form of an organic salt, such as, for example, acetic acid, formic acid, triflic acid, tartatic acid, oxalic acid, citric acid, trifluoroacetic acid, or methanesulfonic acid.

Moreover, the present invention concerns a composition comprising at least one compound according to the invention such as previously disclosed, in an acceptable vehicle. The vehicle will depend on the composition use and the one skilled in the art will be able the most appropriate vehicle without inventive effort.

As already explained, creatine can be used as supplement to enforce organism, increase muscle mass and enhance muscle performance. Indeed, creatine supplementation can result in positive physiological effect on muscles such as, for example, skeletal or cardiac muscles. As a consequence, the composition according to the present invention can be a food additive or a nutritional supplement. The composition according to the present invention can be useful for animals or for humans such as, for example, sports(wo)men, aged people, children, teenagers or vegetarian people.

Additional information on such use can be found in **[10-11]**.

The present invention additionally relates to a pharmaceutical, diagnostic or imaging composition comprising at least one compound according to the invention such as previously disclosed, in an acceptable pharmaceutical vehicle.

In the context of the present invention, "acceptable pharmaceutical vehicle" refers to one or several conventional pharmaceutical additives, excipients, buffers, thinners, and/or auxiliary agents known by one having ordinary skill in the art.

The creatine fatty esters and derivatives thereof according to the present invention provide a new remediation for brain creatine deficiency transporter disease treatment. Moreover, some other pathologies can be explored under the light of these promising preliminary results.

Also disclosed is the use of such derivatives able to cross the BBB *in vitro* and *in vivo* without the involvement of Solute Large Carrier Transporter (SLC6A8). So that creatine normally excluded by the BBB in patients with creatine deficiency transporter may be produced after clivage of creatine fatty esters within the brain endothelial cells and

released in the brain parenchyma. Also is disclosed the potential vectorization of the creatine fatty esters which are potentially usable *in vivo*.

Thus, the compounds and compositions according to the present invention can be used in medicine and notably in therapeutical medicine, in medical diagnosis and in medical imaging such as by Positron Emission Tomography (PET). Indeed, the fact that the creatine part and/or the fatty ester part of the creatine fatty ester or of the derivative thereof can present radioisotope(s) as previously disclosed can be useful in diagnosis and in imaging. For example, the glucosyl radical present in the compound according to the present invention can be substituted by at least one radioisotope such  $^{18}\text{F}$  for use in medical imaging and more particularly in PET.

The compounds and medical compositions according to the present invention can be used for the treatment or the prevention of at least one disease, disorder or condition selected in the group consisting of Parkinson's disease, Huntington's disease, a neuromuscular disorder, hypoxia, an ischemic brain disease such as stroke, an heart disease, a muscular dystrophy, a skin disorders and inflammation.

The compounds and medical compositions according to the present invention can be used for the treatment of the brain creatine deficiency transporter disease.

In other words, the present invention concerns a method for treating or preventing at least one disease, disorder or condition selected in the group consisting of Parkinson's disease, Huntington's disease, a neuromuscular disorder, hypoxia, an ischemic brain disease such as stroke, an heart disease, a muscular dystrophy, a skin disorders and inflammation, consisting in administering to a subject in need, a therapeutical amount of a compound according to the invention or of a composition according to the invention.

The present invention also concerns a method for treating the brain creatine deficiency transporter disease, consisting in administering to a subject in need, a therapeutical amount of a compound according to the invention or of a composition according to the invention.

Additional information on such treatment methods can be found in [1-4].

Other characteristics and advantages of the present invention will additionally be apparent to the one skilled in the art on reading the examples below, which are given as an illustration and not a limitation, with reference to the attached figures.

#### **□ SHORT DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 presents the translocation of creatine fatty ester C18 through the BBB.

Figure 2 presents the conversion of C18 into creatine.

Figure 3 presents the translocation of creatine fatty ester C2 through the BBB.

#### **□ DETAILED DISCUSSION OF PARTICULAR EMBODIMENTS**

All the reagents are purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). TLC was performed on Merck F 254 plates using specified solvent system. Analytical and preparative LC/MS were performed on Waters Autopurify System (SCBM). Biological evaluation of targets was performed on yyy (SPI). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 400 MHz on a Bruker spectrometer.

### **I. Comparative preliminary results.**

#### **I.1. Direct synthesis of esters from creatine.**

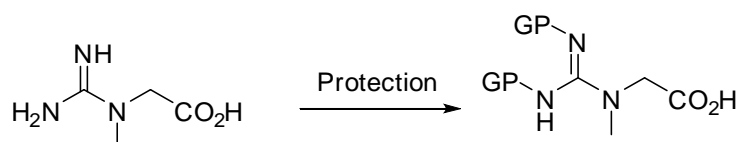
The inventors tried to prepare creatine stearyl ester using the proceedings disclosed in [7-8]. The results are presented in Table 1 :

Substrate (1 mM)	Reagents	Conditions	Yield
Creatine, hydrate	Stearyl alcohol 10eq SOCl <sub>2</sub> 3eq	40°C, overnight	0%
Creatine, hydrate	KOH Stearyl alcohol 10eq SOCl <sub>2</sub> 3eq	"in situ" acyl chloride production Potassium salt of creatine Reflux 1h	0%
Creatine anhydrous	Stearyl alcohol 10eq SOCl <sub>2</sub> 3eq	Sealed tube 80°C, 6h	0.1% Purified by LC/MS
Creatine anhydrous	Stearyl alcohol 10eq SOCl <sub>2</sub> 3eq	Microwave 160°C 20 min	0% Production of creatine acyl chloride
Creatine anhydrous	Stearyl alcohol 10eq CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H 3eq	130°C 2h30	0%
Creatine anhydrous	Ethanol, SOCl <sub>2</sub>	Reflux 60°C 1h RT 72h	50% crystallized

Table 1

### I.2. Protection of creatine.

The inventors tried to prepare creatine fatty esters by using protected creatine. Two protective groups (PG) were developed on creatine (see Table 2) according to [12-13] (see scheme 2).



*Creatine*

Scheme 2 : protection of creatine

Protective Reagent	Stoech.	Conditions (RT)	Base	Stoech.	Yield
FmocCl	3 eq	DCM	DIEPA	3 eq	5%

---

FmocCl	1 eq	DCM	TMSCl/DIEPA	4eq/3eq	11%
Z <sub>2</sub> O	4 eq	Dioxane/Water	NaOH	1 eq	0%
ZCl	3 eq	DCM	DIEPA	3 eq	33%

Table 2 : protection of creatine

With creatine, only the monoprotected derivative was produced. Unfortunately this compound was not reactive for the following step of the synthesis. Moreover, the inventors isolated a new compound not useful obtained by addition of the chloroacetylene on the methylene.

In addition, synthesis with the FMOC group led to diprotected creatinine after self cyclization in the reaction media.

### I.3. Synthesis of esters from monoprotected creatine.

The protocols and yields are summarized in Table 3.

Substrate	Reagents	Yield
(Z) creatine	DMF/DCC/DMAP	0%
(Z) creatine	THF/TEA/trichlorobenzoylchloride	0%
(Z) creatine	Stearyl alcohol/ 4-pyrrolidinopyridine	1.3%
(Z) creatine- TriCl benzoyle	"in situ" production" Stearyl alcohol/NaH/THF	0%

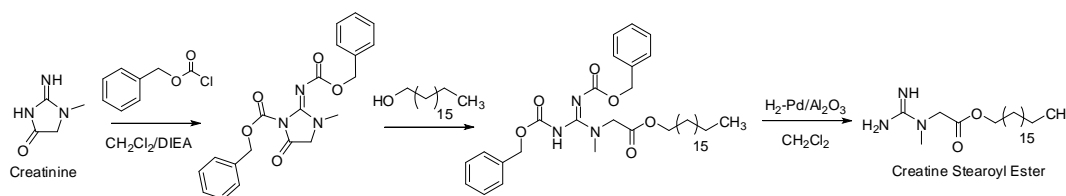
Table 3

Even with the activation of the acid function of creatine by trichlorobenzoyl chloride on protected creatine, only very poor yields were obtained.

## II. Synthesis of creatine stearyl ester according to the present invention

### II.1. General procedure.

This synthesis is carried out by opening the ring of di-protected creatinine, (Z<sub>2</sub>)-creatinine, by stearyl alcohol followed by deprotection under hydrogen/Pd. Hereinafter, scheme 3 shows the synthetic sequences of creatine stearyl ester preparation:



Scheme

3

#### A. (Z<sub>2</sub>)-creatinine.

Benzoylchloroformate (4.2 ml - 3 eq) were added to a solution of diisopropyl ethylamine (5.2 ml - 3 eq) with creatinine (1.124 g - 1 eq) in 100 ml of anhydrous dichloromethane under nitrogen. The benzoylchloroformate is added dropwise in an ice bath. The mixture is allowed to react with stirring 30 min in the ice bath and overnight at room temperature.



The reaction is controlled by CCM (Silica, Heptane/Ethyl Acetate) and LC/MS. The reaction medium is extracted by addition of dichloromethane and water. The dichloromethane phase is washed 3 times with water and dried by magnesium sulphate.

The dichloromethane solution is concentrated by evaporation under vacuum and allowed to crystallize. 3.25 g of crude (Z<sub>2</sub>)-creatinine are obtained (87%). The (Z<sub>2</sub>)-creatinine can be purified on silica gel (Heptane /Ethyl Acetate gradient) for the determination of structure. The crude product is used to perform the esterification step.

*B. (Z<sub>2</sub>)-Creatine Stearoyl Ester.*

Stearoyl alcohol (0.5 g - 2 eq) is allowed to react with 1 eq of crude (Z<sub>2</sub>)-creatinine in a tube heated to 80°C during 5 h. The reaction is monitored by CCM (Silica, Heptane/Ethyl Acetate) and LC/MS.

The crude (Z<sub>2</sub>)-creatinine stearoyl ester is purified on silica gel (Heptane /Ethyl Acetate gradient) to yield 286 mg of pure (Z<sub>2</sub>)-creatinine stearoyl ester with a 50% yield.

*C. Creatine Stearoyl Ester.*

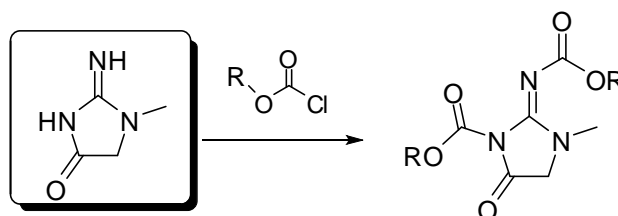
Pure (Z<sub>2</sub>)-creatinine stearoyl ester (140 mg) is dissolved in anhydrous dichloromethane/methanol solution (6 ml/12 ml) under nitrogen. Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5% (20 mg) is added. The reaction mixture is degassed under vacuum, frozen to be purged and the vacuum is broken by hydrogen. The purge with hydrogen is done three times. Then the medium is allowed to reach room temperature and react under vigorous stirring.

The reaction is monitored by CCM (Silica, Heptane/Ethyl Acetate) and LC/MS. When the reaction is complete, generally after 3 h, filtration on 0.5 µm filter gives creatine stearoyl ester solution.

The creatine stearyl ester solution is evaporated under vacuum to yield 75 mg (quantitative yield).

## II.2. Variants of the method according to the present invention.

### A. *Protection of creatinine.*



*Creatinine*

Scheme 4 : protection of creatinine

Protective Reagent	Stoech.	Conditions	Base	Stoech.	Yield
Boc <sub>2</sub> O	5 eq	RT, Dioxane/Water	NaOH	1 eq	0.6%
Boc <sub>2</sub> O	6 eq	RT, DCM	DIEPA	6 eq	43%
FmocCl	1,5 eq	RT, DCM	DIEPA	1,5 eq	28%
ZCl	3 eq	RT, DCM	DIEPA	3 eq	87%

Table 4

Different protective reagents were tested in order to prepare protected creatinine. Results are presented in Table 4.

Reaction of creatinine with Boc<sub>2</sub>O presented very poor yield under aqueous conditions and reaction with Boc<sub>2</sub>O under anhydrous conditions led to a new and unuseful compound with 3 Boc functions by addition of the Boc group on the methylene with a 43% isolated yield.

Fortunately, the reaction with the benzoyl chloroformate (ZCl) yielded 87% of diprotected creatinine used as a "crude" product after crystallisation in hexane.

### B. *Nucleophilic addition of alcohols on diprotected creatinine.*

Different molecules bearing a alcohol group were tested for nucleophilic addition on diprotected creatinine. Results are presented in Table 5.

R'	Stoech.	Conditions	Yield
C1	as solvent	RT 2h	92%
C2	as solvent	80°C 4h	72%
iPrOH	4 eq	80°C 4h	5,5%
C4	10 eq	60°C 4h	60%
C8	4 eq	80°C 4h	40%
Octanol-2	4 eq	80°C 4h	5%
C9	8 eq	80°C 5h	25%
C12	8 eq	80°C 7h	47%
C16	6 eq	80°C 7h	55%
C18	1,5 eq	80°C 16h	25%
C18 rad	10 eq	80°C 5h	28% (HPLC)
C18 ins	4 eq	80°C 5h	20%
Glucose	1 eq	80°C 3h30	0,5 %
Z3,OMe Glu C6-OH	3,25 eq	80°C 5h	21%

Table 5

In Table 5, "C18 rad" means  $^{14}\text{C}$  labelled compound, "C18 ins" a C18 aliphatic chain presenting insaturation(s) and "Z3,OMe Glu C6-OH" means a glucose in which 3 of the 4 alcohol groups borne by the carbon atoms 1, 2, 3 and 4 are protected, while the alcohol group borne by the carbon atom 6 is free and reacts during the ring opening step in the method according to the present invention.

Nucleophilic addition of alcohols occurs spontaneously in methanol at room temperature using the alcohol as solvent. The crude diprotected showed a better reactivity probably because acidic impurity catalyses the addition.

Increasing the length of the aliphatic chain needed to react with heating up to 80°C. The reaction time was about 3 h. Increasing the reaction time might degrade the desired compound to provide by-compounds as compounds obtained by deprotection of one protective group and transesterification by excess alcohol.

Finally, the inventors obtained 45% yields for addition of aliphatic alcohols with chain length comprised between 8 and 18 carbons.

*C. Deprotection of (Z<sub>2</sub>) creatine fatty esters.*

The deprotection of the Z groups leads to the recovery of the guanidine function, well-known for its very polar character.

Palladium over alumina was preferred to palladium over charcoal because the recovery of the desired product needs steps of washing the catalyst by less amounts of methanol.

Creatinine was systematically obtained as by product because of the propensity for cyclization of our derivatives. Creatinine is easily eliminated on reversed phase column. The deprotection of short aliphatic chain was unsuccessful because the formation of creatinine by self-cyclization was complete and no creatine ester could be obtained.

Results on the deprotection are presented in Table 6.

R'	Reactants	Conditions	Yield
C1	TMSI, CH <sub>3</sub> CN	50°C, 30 min 40 mg/ml	Quantitative, HPLC yield
C1	MeOH Pd/C 5%	PA, 1h RT 40 mg/ml	0% (creatinine)
C1	DCE Pd/C 5%	PA, 4h RT 40 mg/ml	0% (creatinine)
C4	DCM Pd/C 5%	PA, 4h RT 20 mg/ml	7% (isolated by LC/MS)
C8	CH <sub>3</sub> CN Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 4h RT 1 mg/ml	0% (mono)
C8	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 3h RT 10 mg/ml	100% (+44)
C8	ACN/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 4h RT 10 mg/ml	13%
C9	DCE Pd/C 5%	PA, 3h RT 10 mg/ml	50%
C12	CH <sub>3</sub> CN Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 4h RT 1 mg/ml	0% (mono)
C12	DCM/MeOH (1/4) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 4h RT 10 mg/ml	100% (+44)
C12	DCM/MeOH (1/2) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 4h RT 10 mg/ml	100% (+44)
C16	CH <sub>3</sub> CN	PA, 3h RT	0% (mono)

	Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	4 mg/ml	
C16	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, RT 10 mg/ml	100%
C18	DCM/MeOH (1/2) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 3h RT 8 mg/ml	90%
C18 rad	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 3h RT 2 mg/ml	65%
C18 ins	DCE Pd/C 5%	PA, 2h RT 20 mg/ml	0% (saturated analogue)
Glucose	DCM/MeOH (1/1) Pd/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5%	PA, 3h RT 3 mg/ml	Molecular pic available

Table 6

Depending on the solvent used and the ratio of DCM/methanol or acetonitrile, the inventors produced the carbonated form of the creatine fatty ester (+44) isolated by LC/MS preparative chromatography.

The deprotection of unsaturated compounds (C18 ins) gave the saturated analogues. The method with TMSI/CH<sub>3</sub>CN must be used for these compounds.

In Table 6, "0% (mono)" means that monoprotected creatine fatty ester was obtained and that additional deprotection step was necessary to prepare the deprotected form.

Finally the prepared compounds were not or poorly soluble in water or biological media and not or poorly stable in organic solution. They had to be conserved on a solid form and proceeded to the biological protocol just before their use.

That is the reason why the inventors decided to develop more hydrophilic esters by reaction with protected glucose. In such compounds, the glucose moiety acts as a ligand to favour the transport of the creatine derivatives in particular through the BBB.

### **III. Translocation of creatine fatty esters across the in-vitro cell-based BBB model.**

The *in-vitro* cell-based BBB model which is used to assess the permeability of fatty esters consists in a coculture of glial cells and brain endothelial cells.

A transport buffer (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.8 mM glucose and 5 mM HEPES) is added: 1500 µl to the basolateral chamber (which represents the cerebral parenchyma) and 500 µl to the apical chamber (which represents the blood).

The fatty esters are introduced in the apical compartment. After 60 min, aliquots are removed from the apical and basolateral chambers for drug-concentration determination. The percentage of drug from the initial dosage that crossed BBB is calculated as follows :  $P (\%) = [(B_f \times 1500) / (A_0 \times 500)] \times 100$  where B<sub>f</sub> is the amount of tested compounds in the basolateral compartment at the end point. A<sub>0</sub> is the initial amount in the apical compartment at time point 0.

After 60 min of incubation with creatine fatty esters, the inventors noticed that fatty esters C18 but not C2 presented a good permeability through the blood brain barrier.

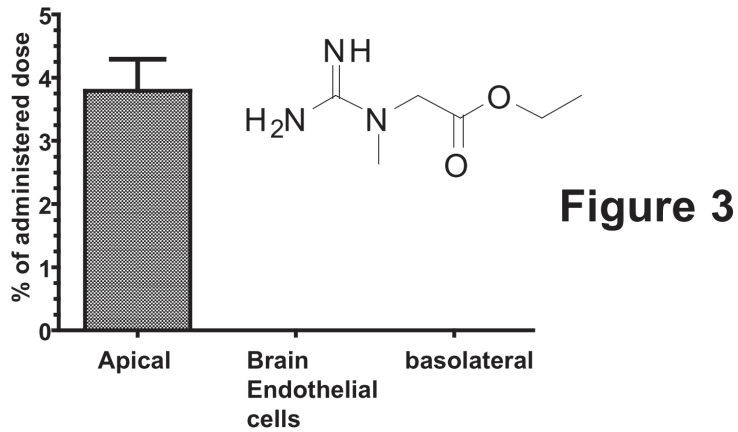
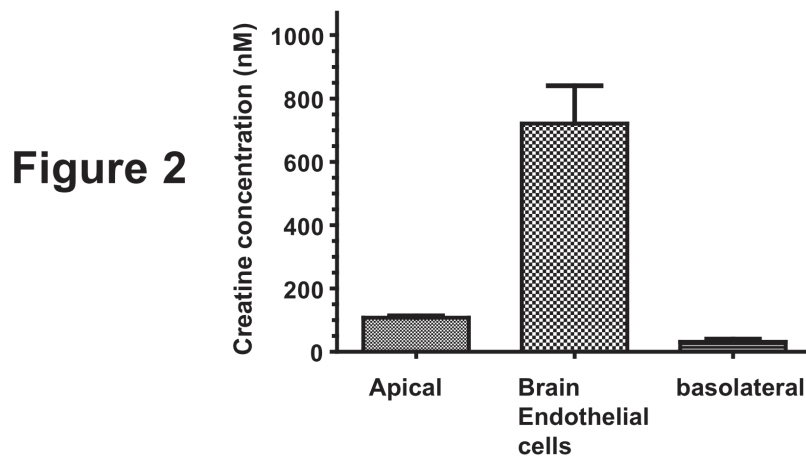
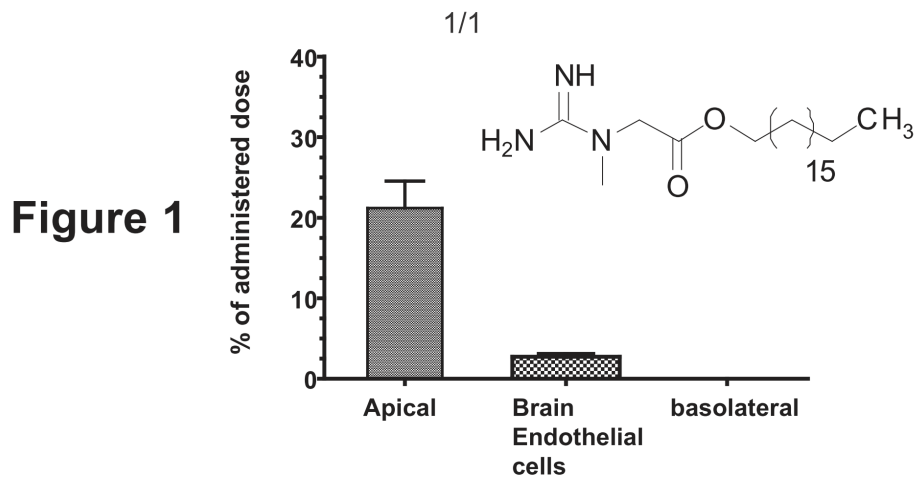
Indeed, in the case of creatine fatty ester C18, intracellular level of creatine stearoyl ester increased within brain endothelial cells after incubation of cells with this compound (Figure 1). Notably, this tremendous increase in creatine stearoyl ester strikingly coincided with the appearance of creatine content (about 700 nM) within brain endothelial cells as well as in the basal compartment (about 31 nM) (Figure 2), suggesting the potential interaction of yielded creatine with cells (e.g. neuronal cells) of brain parenchyma.

In the case of creatine fatty ester C2, the inventors found no translocation of this compound within brain endothelial cells or in the basal compartment of the *in vitro* cell-based blood-brain barrier model. The inventors found no

evidence of the appearance of creatine content within cells or in the brain parenchyma compartment (Figure 3).

Taken together, the present findings report for the first time differential translocation throughout the BBB between creatine fatty esters. To sum up, the inventors bring the first evidence of the usefulness of the design molecular strategy to get creatine within brain endothelial cells and brain parenchyma compartment after administration of creatine fatty esters. Creatine fatty esters can thus represent the promising candidates for the development of new drugs useful in the treatment of creatine deficiency transporter.

SP. 52730





## REFERENCES

[1] International application WO 02/22135 in the name of Board of Regents of the University of Nebraska and published on March 21, 2002.

[2] Patent application US 2002/0049253 in the name of Kaddurah-Daouk and published on April 25, 2002.

[3] Patent application US 2003/0212130 in the name of Miller *et al.* and published on November 13, 2003.

[4] Patent US 6,413,552 in the name of Stoll and published on July 2, 2002.

[5] Article of Edgar and Shiver, 1925, "The equilibrium between creatine and creatinine in aqueous solution. The effects of hydrogen ion", J. Amer. Chem. Soc., vol. 47, pages 1179-1188.

[6] Patent application CN 1616420 in the name of XinMao Dacron Chemical General and published on May 18, 2005.

[7] Patent application US 2005/0049428 in the name of Vennerstrom and published on March 3, 2005.

[8] Patent application CN 1900056 in the name of Tiangcheng Pharmaceutical Co. Lt. and published on January 24, 2007.

[9] International application WO 2008/101309 in the name of Multi Formulations Ltd. and published on August 28, 2008.

**[10]** Patent application US 2011/0269986 in the name of Burov *et al.* and published on November 3, 2011.

**[11]** Patent application US 2008/0200705 in the name of Chaudhuri *et al.* and published on August 21, 2008.

**[12]** Article of Gers *et al.*, 2004, "Reagents for efficient conversion of amines to protected guanidines", *Synthesis*, vol. 2004, pages 37-42.

**[13]** Article of Robles *et al.*, 1999, "Towards nucleopeptides containing any trifunctional amino acid", *Tetrahedron*, vol. 55, pages 13251-13261.

### CLAIMS

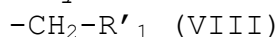
1) Method for preparing a creatine fatty ester or derivative thereof comprising at least one step consisting in reacting a diprotected creatinine with a molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) :



in which R' represents a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms.

2) Method according to claim 1, wherein the radical R' is chosen in the group consisting of an alkyl radical with 4 to 30 carbon atoms, an alkenyl radical with 4 to 30 carbon atoms, and an aryl radical with 6 to 30 carbon atoms.

3) Method according to claim 1 or 2, wherein the radical R' is represented by the following formula (VIII) :



in which R'<sub>1</sub> is a hydrocarbon radical containing at least 3 carbon atoms.

4) Method according to claim 1 or 2, wherein the radical R' is a glucosyl radical optionally substituted.

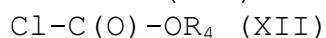
5) Method according to any one of claims 1 to 4, wherein said method comprises the following successive steps consisting in :

a) reacting creatinine with a protective agent to obtain a diprotected creatinine ;

b) reacting the diprotected creatinine obtained at step (a) with a molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) to obtain a diprotected creatine fatty ester ; and

c) deprotecting the diprotected creatine fatty ester or derivative thereof obtained at step (b), in order to obtain said creatine fatty ester or derivative thereof.

6) Method according to claim 5, wherein said protective agent is of formula (XII) :



in which the radical R<sub>4</sub> represents a hydrocarbon group.

7) Method according to claim 5 or 6, wherein the solvent in the solution containing creatinine and the protective agent implemented at step (a) is dichloromethane (DCM) and notably anhydrous DCM.

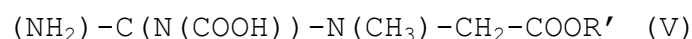
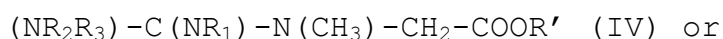
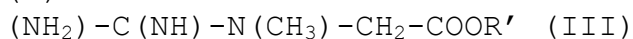
8) Method according to any one of claims 5 to 7, wherein the solution containing creatinine and the protective agent implemented at step (a) contains the Hünig's base or N,N-diisopropyl ethylamine (DIEPA).

9) Method according to any one of claims 5 to 8, wherein, at step (b), for one equivalent of diprotected creatinine, the amount of molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula (I) expressed in equivalent is comprised between 1 and 15, notably between 1 and 10.

10) Method according to any one of claims 5 to 9, wherein said step (b) is carried out during 1 to 20 h, notably during 2 to 16 h, and particularly, during 2 to 10 h.

11) Method according to any one of claims 5 to 10, wherein said step (b) is carried out at a temperature comprised between 60 and 100°C, notably 70 and 90°C and, particularly, at around 80°C (i.e. 80°C ± 5°C).

12) Compound that can be prepared by a method according to any one of claims 1 to 11, said compound having the formula (III), (IV) or (V):



in which :

- the radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, identical or different, represent an hydrogen atom or a carboxylic acid group and at least one among the radicals R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> is a carboxylic acid group,

- the radical R' is a glucosyl radical optionally substituted,

or a salt thereof.

13) Composition comprising at least one compound according to claim 12, in an acceptable vehicle, wherein said composition is a food additive or a nutritional supplement.

14) Pharmaceutical, diagnostic or imaging composition comprising at least one compound according to claim 12, in an acceptable pharmaceutical vehicle.

15) Compound according to claim 12 or composition according to claim 14 for use in medicine.

16) Compound according to claim 12 or composition according to claim 14 for treating or preventing at least one disease, disorder or condition selected in the group consisting of Parkinson's disease, Huntington's disease, a neuromuscular disorder, hypoxia, an ischemic brain disease such as stroke, an heart disease, a muscular dystrophy, a skin disorders and inflammation.

17) Compound according to claim 12 or composition according to claim 14 for treating the brain creatine deficiency transporter disease.

**ABSTRACT**

The present invention concerns a method for preparing a creatine fatty ester or derivative thereof comprising at least one step consisting in reacting a diprotected creatinine with a molecule bearing at least one alcohol functional group and of formula R'-OH in which R' represents a hydrocarbon radical containing at least 4 carbon atoms. The present invention also concerns particular creatine fatty esters or derivative thereof and medical uses thereof.



***ARTICLE 1***

*SOU MIS AU*

***JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY***

***(LE 11 FÉVRIER 2013)***





**Journal of Medicinal Chemistry**

**Synthesis and Biological Evaluation of New Creatine Fatty Esters Revealed Dodecyl Creatine Ester as a Promising Drug Candidate for the Treatment of the Creatine Transporter Deficiency**

Journal:	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID:	jm-2013-00214h
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	11-Feb-2013
Complete List of Authors:	Trotier-Faurion, Alexandra; CEA, Institute of biology and Technology of Saclay Dezard, Sophie; CEA, Institute of biology and Technology of Saclay Taran, Frédéric; CEA, Institute of biology and Technology of Saclay Valayannopoulos, Vassili; Hôpital Necker-Enfants malades, de Lonlay, Pascale; Hôpital Necker-Enfants malades, Mabondzo, Aloïse; CEA, Institute of biology and Technology of Saclay

SCHOLARONE™  
Manuscripts

ACS Paragon Plus Environment



## Journal of Medicinal Chemistry

### **Synthesis and Biological Evaluation of New Creatine Fatty Esters Revealed Dodecyl Creatine Ester as a Promising Drug Candidate for the Treatment of the Creatine Transporter Deficiency**

Alexandra Trotier-Faurion<sup>1</sup>, Sophie Dézard<sup>2</sup>, Frédéric Taran<sup>2</sup>, Vassili Valayannopoulos<sup>3</sup>,

Pascale de Lonlay<sup>3</sup> and Aloïse Mabondzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CEA, DSV, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif sur Yvette, France

<sup>2</sup> CEA, DSV, iBiTec-S, Service de Chimie Bio Organique et de Marquage, Gif sur Yvette, France

<sup>3</sup> Centre de référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme de l'Enfant et de l'Adulte, Hôpital Necker-Enfants malades, Université Paris Descartes, Paris, France

Correspondence should be addressed to:

Dr Aloïse Mabondzo, CEA, DSV, iBiTec-S, Service de pharmacologie et d'immunoanalyse,

91191 Gif sur Yvette cedex, France. Phone: +33 1 69 08 13 31; fax: +33 1 69 08 59 07; e-mail:

[aloïse.mabondzo@cea.fr](mailto:aloïse.mabondzo@cea.fr)

▪ **ABSTRACT**

The creatine transporter deficiency is a neurological disease caused by impairment of the creatine transporter SLC6A8, resulting in mental retardation associated with a complete absence of creatine within the brain and cellular energy perturbation of neuronal cells. One of the therapeutic hypotheses was to administer lipophilic creatine derivatives which are 1) thought to have better permeability through the cell membrane and 2) would not rely on the activity of SLC6A8 to penetrate the brain. Here, we synthesized creatine fatty esters through original organic chemistry process. A screening on an *in vitro* rat primary cell-based blood-brain barrier model and on a rat primary neuronal cells model demonstrated interesting properties of these prodrugs to incorporate into endothelial cells, astroglial and neuronal cells according to a structure-activity relationship. Dodecyl creatine ester showed then a 20-fold increase in creatine content in pathological human fibroblasts compared with the endogenous creatine content, stating that it could be a promising drug candidate.

## ▪ INTRODUCTION

Cerebral creatine deficiency syndromes (CCDS) are a group of inborn errors of creatine biosynthesis and transport through the cellular membranes<sup>47</sup>. These diseases are associated with severe neurologic features: mental retardation, expressive speech and language delay, autistic-like behavior and epilepsy. They are characterized by a lack of creatine in the brain<sup>47, 273</sup> and metabolic disturbances in the nervous system since the creatine is involved in the cellular phosphocreatine energy system<sup>5</sup>. The only way to treat patients is to restore the cerebral creatine pool by bringing creatine into the brain. Nowadays, the treatment of creatine biosynthesis defects has yielded significant clinical improvement<sup>152</sup>. However, successful therapeutic strategies still need to be discovered in order to treat the creatine transporter defect<sup>167, 273</sup>.

Some clinical studies based on the use of creatine supplemented by amino acids such as L-arginine and L-glycine showed no improvement of clinical features in long follow-up of patients<sup>170</sup>. The absence of functional creatine transporters at the blood-brain barrier (BBB) may prevent the entry of creatine into the brain, thus affecting the cognitive functions<sup>43, 164, 274</sup>. For instance, creatine amino acids and phosphocreatine-Mg complex show neuroprotective activity in *in vivo* animal models of cerebral stroke, ischemia or hypoxia<sup>96, 175, 181</sup>. In addition, a 9-week treatment with cyclocreatine as treatment in SLC6A8 knockout mice<sup>182</sup> resulted in an increase in phosphocreatine and phosphocyclocreatine <sup>31</sup>P-MRS signals as well as normalization of behavioural test findings<sup>183</sup>.

Creatine esters are believed to play an important role in the restoration of cerebral creatine content. First, they are highly lipophilic and so probably cross biological membranes such as the BBB by passive transport<sup>174</sup>. Second, cellular esterases are able to biotransform these

prodrugs and deliver creatine into the cells. Two creatine esters have been considered so far (creatine benzyl ester and creatine ethyl ester). Creatine benzyl ester showed interesting properties and increased the creatine pool in mouse hippocampal slices<sup>174</sup>. The same was observed with creatine ethyl ester<sup>176</sup>. However, a 12-month clinical study in patients did not reveal any neuropsychologic improvement<sup>177</sup>, likely because of a lack of chemical stability: creatine esters are highly susceptible to hydrolysis in the gastric environment and to the effect of plasmatic esterases<sup>174, 177</sup>. The esters are thus biotransformed to creatine which has no therapeutic properties.

Herein we present the synthesis of creatine derivatives by means of an original method for preparing creatine fatty esters by carrying out a ring opening step on diprotected creatinine with a molecule bearing an alcohol functional group. The whole chemical library of creatine fatty esters was screened for their ability to cross the BBB and to be internalized in primary neuronal cells. Moreover, we shed light on the molecular mechanisms underlying translocation processes using human fibroblasts from patients affected by the creatine transporter deficiency.

▪ **RESULTS**

**Chemistry**

Although several procedures have already been described for the preparation of anhydride (WO 2008/101309) and amide (US 2011/0269986, US 2008/0200705) derivatives of creatine, efficient methods leading to creatine fatty esters are still lacking. To the best of our knowledge classical acid-catalyzed esterification of creatine by alcohols is the only method described so far (US 2005/0049428). Since the alcohol partner is used as solvent in this process, the method is limited to the preparation of small esters like ethyl, propyl and butyl esters of creatine.

We therefore were interested in developing a more general method leading to real fatty esters of creatine. Figure 1 describes our general strategy for a brand new synthesis of creatine fatty esters. The strategy is based on activation of the electrophilicity of the carbonyl moiety of creatinine **1** by double protection of this cyclic guanidine. Indeed, the carbamate derivative of the guanidine moiety should be a good leaving group and therefore should promote the opening of the creatinine ring in presence of nucleophiles such as alcohols. This ring opening reaction followed by carbamate deprotection would thus generate the desired creatine esters.

*Protection of creatinine*

Reaction of creatinine (Figure 2) with  $\text{Boc}_2\text{O}$  gave a very poor yield either under aqueous or anhydrous conditions.



Fmoc double protection was also found difficult but, fortunately, the reaction with the benzoyl chloroformate yielded 87% of diprotected creatinine after crystallization in hexane (entry 4, Table 1)(compound **2c**, Figure 3).

#### *Nucleophilic addition of alcohols to diprotected creatinine*

Double CBz-protected creatinine **2c** undergoes spontaneous ring opening at room temperature once dissolved in methanol to afford creatine methyl ester **3a** (entry 1, Table 2). Heating up to 80°C is however needed for alcohols bearing longer chain. We were particularly pleased to observe that the reaction is still effective with long, hydrophobic alcohols. The octadecyl creatine ester **3h** was for example successfully obtained using only 2 equivalents of stearyl alcohol (entry 9, Table 2). These results represent a significant improvement since such hydrophobic creatine esters were never successfully obtained by other methods.

#### *Carbamate deprotection of the creatine fatty esters 3*

The deprotection of the Z groups of creatine esters **3** was carried out under hydrogen using palladium-supported catalysis (figure 4). This step was found quite delicate because of the polarity of the guanidine part of the molecules which do not facilitate product recovery. After screening of a panel of reaction conditions, palladium over alumina was finally selected and products were successfully recovered after washing the catalyst with methanol. Using these conditions creatine esters were obtained in quantitative yields except for products **4c** and **4e** which required purification on reversed phase column. These products were isolated

in poor and moderate yields respectively because of their relative instability on silica gel (Table 3).

## **Pharmacology:**

### *Stability of creatine fatty esters:*

The main pitfall for experimentations with creatine fatty esters is their chemical stability<sup>174, 176, 177, 181, 275-277</sup>. Thus, particular attention has been paid to finding a way to maintain satisfactory stability of our products during the experiments. The degradation of the esters occurs by intramolecular cyclization leading to biologically inactive creatinine and alcohols. We showed that the rate of degradation is higher with the longer carbon chains. Thus, 60 min of incubation at 37°C degraded creatine octadecyl ester by 90%, dodecyl ester by 75% and octyl ester by 30%. The dilution of samples in acetonitrile supplemented by 5% formic acid stopped the undergoing degradation.

### *Creatine fatty esters are not toxic as regards of cell viability and do not alter blood-brain barrier integrity*

None of the experimental conditions showed a decrease in the cell viability of brain endothelial cells, glial cells or neuronal cells compared with a 100% vehicle, suggesting that none of the tested conditions are toxic in terms of cell viability (Table 5). The permeability of Lucifer yellow (LY P<sub>app</sub>), a paracellular route marker compound was then evaluated in *in vitro* cell-based rat BBB model in the presence of the creatine fatty ester. Whatever the creatine fatty ester used in the experiments, the LY P<sub>app</sub> value was below the limit range of  $5 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ <sup>268</sup>, suggesting that the creatine fatty esters did not compromise the integrity of the *in vitro* cell-based rat BBB model and that the cell monolayer is intact.

*Translocation of creatine fatty esters through the in vitro cell based rat BBB model:*

Having demonstrated the integrity of the BBB cell monolayer in the presence of different creatine fatty esters (Table 6), we investigated the ability of the creatine fatty esters to reach the brain. This was determined by an *in vitro* cell-based model of rat BBB<sup>268</sup>. We demonstrated that the creatine esters were able to penetrate into the brain endothelial cells according to a structure-activity relationship (Table 5). After a 60-min incubation of 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of creatine fatty esters, we found  $70.6 \pm 7.80$  nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins of dodecyl creatine ester in brain endothelial cell lysate, which was 10 times that with octadecyl ( $6.46 \pm 1.42$  nmoles.mg<sup>-1</sup>) and nonyl ( $8.14 \pm 3.95$  nmoles.mg<sup>-1</sup>) creatine ester and more than 200 times that with octyl creatine ester ( $0.33 \pm 0.10$  nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins). None of the ethyl and butyl creatine ester was detected in BBB endothelial cell lysates. When we looked at the astroglial lysate, we observed that not only had the creatine esters crossed the brain endothelial cells, but they had also entered the astroglial cells. About  $31.6 \pm 13.2$  nmoles.mg<sup>-1</sup> proteins and  $13.3 \pm 4.50$  nmoles.mg<sup>-1</sup> proteins of dodecyl and nonyl creatine esters were detected in astroglial lysates, respectively, whereas octyl and octadecyl creatine esters were poorly detectable ( $0.24 \pm 0.04$  nmoles.mg<sup>-1</sup> and  $0.12 \pm 0.07$  nmoles.mg<sup>-1</sup> proteins respectively). Ethyl and butyl creatine esters were undetectable in our experimental conditions.

*Translocation of creatine fatty ester in an in vitro primary neuronal cell culture model:*

We next analyzed the translocation of these creatine prodrugs into primary cortical neuronal cells, which are the target cells (Table 7) expressing neuronal cell markers such as Microtubule Associated Protein-2 (MAP2) and neurofilament proteins (data not shown). Intracellular creatine ester content was determined and compared with the residual content

in the supernatant after 60 min of incubation. Dodecyl and octadecyl were best able to enter the neurons since we found  $257 \pm 76.8$  nmoles.mg<sup>-1</sup> and  $53.9 \pm 10.7$  nmoles.mg<sup>-1</sup> in the neuronal cell lysate respectively, corresponding to  $58.2 \pm 11.3\%$  and  $32.2 \pm 1.45\%$  of administered dose, respectively.  $5.88 \pm 0.44$  nmoles.mg<sup>-1</sup> proteins ( $11.4 \pm 0.43\%$  of initial dose) of octyl creatine fatty ester were retrieved in the cell lysate whereas the ethyl creatine ester was poorly detectable in the cell lysate ( $1.47 \pm 0.34$  nmoles.mg<sup>-1</sup> proteins equivalent to  $0.16 \pm 0.01\%$  of the administered dose).

These data indicated that compound dodecyl creatine ester was best incorporated in brain endothelial cells and astroglial cells and was thus able to diffuse through the BBB to the neurons.

#### *Pharmacological activity of creatine fatty esters:*

The pharmacological activity of creatine fatty esters was evaluated in terms of their capacity to restore the creatine pool into the cells. We first attempted to determine the esterase activity (Figure 5) in the pathological model using pediatric patients' fibroblasts, which lack functional SLC6A8 transporter. We noticed that each fibroblast batch was able to convert the 4-nitrophenyl acetate into p-nitrophenol, with peak activity reached at 30 min for control K and CTp3 and 80 min for DTp1 and VLp2. This indicates that fibroblasts expressed functional esterases and allowed us to perform a 60-min incubation. We then evaluated the uptake of dodecyl creatine ester (Figure 6) in human fibroblasts. This compound accumulated in human fibroblast lysates at between 100 and 150 nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins in 60 min. The same profile was obtained for the control K ( $107 \pm 8.92$  nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins), the child with a functional creatine transporter, and the pathological DTp1 ( $123 \pm$

11.2 nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins), VLp2 (149 ± 8.26 nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins) and CTp3 (107 ± 20.5 nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins). This suggests that the dodecyl creatine ester is able to accumulate inside the fibroblasts even if the creatine transporter SLC6A8 is no longer functional.

The therapeutic strategy is based on the conversion of the creatine ester into creatine, so we measured the impact of the treatment with dodecyl creatine ester on the creatine cell content (Figure 7). A 5.8-fold increase in the creatine content was noted in the control K compared with the same experimental conditions without the dodecyl creatine ester treatment. In comparison, the endogenous creatine content detectable in fibroblasts from control K cells was 33.6 ± 1.24 nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins. Considering the endogenous value in these cells, the increase in creatine was 2.6-fold. But the most interesting observations were made on fibroblasts from patients suffering from a SLC6A8 creatine transporter deficiency syndrome. Whereas the creatine loading in the cells in the absence of dodecyl creatine ester was below our lowest quantitation limit of 0.05 µg.mL<sup>-1</sup>, the creatine content increased after a 60-min incubation with dodecyl ester up to 66.1 ± 4.33, 76.1 ± 2.19 and 55.4 ± 7.78 nmoles.mg<sup>-1</sup> of proteins in the DTp1, VLp2 and CTp3 patients, respectively. When considering the initial endogenous creatine content, these values were increased 23.9-, 20.0- and 21.6-fold, respectively, assuming that the dodecyl creatine ester may have been taken up by cell esterases and converted into creatine to replenish the cell's energy supply.

▪ **DISCUSSION AND CONCLUSION**

Cerebral creatine deficiency is a neurological disorder which induces severe neurodevelopmental delays in children. One of the established etiologies is deficiency in creatine transporter because of mutations of the encoding gene<sup>146</sup>. Therapeutic strategies rely on the use of a creatine prodrug, which enters neuronal cells by a passive transport and is converted into creatine. Based on the principle that increasing drug lipophilicity will promote the diffusion through the BBB, we aimed to develop creatine esters linking long and fatty carbon chains to the creatine structure. When acted on by cellular esterases these prodrugs deliver both the energetic creatine and fatty alcohols which also have neurophysiologic properties.

What is first striking when considering the creatine derivatives is the huge number of patents: several synthesis pathways have been described to date, but very few compounds have been reported in the literature. The only one which has been extensively described is the creatine ethyl ester<sup>176, 181</sup>. When we first tried to reproduce the published methods, it turned that they were not convenient for the synthesis of long-chain creatine esters. An original synthesis process was therefore implemented and a library of 9 creatine prodrugs was prepared. Only 6 of these were considered during the pharmacological studies. None of the 6 compounds decreased cell viability or increased BBB permeability, and so they were usable for further investigations on their brain penetrability and diffusion, using the *in vitro* BBB model. This revealed a structure-activity relationship: the longer the carbon chain is the greater the entry in both brain endothelial and astroglial cells. The compound showing the most interesting properties was the dodecyl creatine ester, whereas the shortest carbon

chains (ethyl to octyl) displayed limited diffusion through cell membranes. The octadecyl creatine ester was detected in brain endothelial cells but not in astroglial cells indicating that it was probably stuck into the endothelial phospholipid bilayer. In the BBB model, the detection of the creatine ester did not correlate with an increase in intracellular creatine content but with an increase in the creatine signal in the blood compartment. This observation suggested two hypotheses. First, in the BBB model, the creatine transporter is functional and it seems to mediate the efflux of creatine from blood to brain and from brain to blood. Secondly, the creatine content of healthy cells is very high:  $55.5 \pm 26.9$  and  $173.4 \pm 38.8$   $\mu\text{M}$  in endothelial cells and astroglial cells, respectively. This compared with  $16.2 \pm 1.42$   $\mu\text{M}$  of exogenous creatine provided by the 5% serum in cell culture media and indicates that these cells may rely on a creatine biosynthesis in addition to the uptake from the supernatant. Creatine esters taken up in this way may be turned into the desired creatine, but it remains unclear whether creatine metabolism can be saturated. In this hypothesis, excess creatine could be released in the blood compartment.

Interestingly the same profile was obtained in a primary neuronal model. The dodecyl and octadecyl creatine esters penetrated cells well, unlike the ethyl creatine ester, which was scarcely detectable in the cell lysate. Penetration of the octyl creatine ester was intermediate.

These experiments show that the incorporation of creatine fatty esters in endothelial, astroglial and neuronal cells depends on the length of the carbonyl chain. We sought a new therapeutic strategy for creatine transporter deficiency, using experiments with the pathological model. Human fibroblasts from patients with cerebral creatine deficiency caused by a transporter deficiency were used to investigate whether the dodecyl creatine



ester could enter the cells even if it could not be taken up by the SLC6A8 transporter. Creatine content in the fibroblasts was increased, especially in the pathological fibroblasts when treated by dodecyl creatine ester. This demonstrated that the dodecyl can be acted up by cellular esterases, which we demonstrated are active in these cells, and replenishes the creatine content in these cells. Interestingly, the ethyl creatine ester was not able to penetrate the cells and so did not increase creatine content. This suggests that on the basis of published observations<sup>176, 177</sup>, ethyl creatine ester is not an effective drugable compound because of its poor cell membrane permeability. In contrast, dodecyl creatine ester is a good candidate for development as a treatment option in patients with creatine deficiency transporter. However, further investigations are needed to determine the optimum vehicle for the drug, since the dodecyl creatine ester is degraded by plasma esterases and we need to find the best way to protect its chemical structure. In treating creatine transporter deficiency, the challenge will be to protect the dodecyl creatine ester against plasma esterases, deliver it through the BBB and improve neuronal creatine and phosphocreatine synthesis.

▪ **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Mickael Kempf, Anne-Cécile Guyot, and Dr Agnès Belly (CEA, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Gif-sur-Yvette, France) David-Alexandre Buisson, Céline Puente and Emilie Dubois (CEA, iBiTec-S, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage) for their technical skills and all the patients included in this study. This work was financially supported by the Fondation Lejeune.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE: **Figures 1-12**, available free of charge via the internet at <http://pubs.acs.org>.

▪ **EXPERIMENTAL SECTION**

**Chemistry**

All the reagents were from Aldrich (Steinheim, Germany). TLC was performed on Merck F 254 plates using the specified solvent system. Analytical and preparative LC/MS were performed on a Waters Autopurify System. The elution was done on a reversed phase column (Waters XBridge C18 100\*4.6 mm, particles of 3.5  $\mu\text{m}$  particles) with three methods depending on the polarity of the different compounds: the time T is in min.

Generic:

T0: 95/5 H<sub>2</sub>O/ACN (+1/1000 HCO<sub>2</sub>H)

T8: 100% ACN +1/1000 HCO<sub>2</sub>H

T13 min: 100% ACN +1/1000 HCO<sub>2</sub>H

Eluent 1:

T0: 95/5 H<sub>2</sub>O/ACN (+1/1000 HCO<sub>2</sub>H)

T5: 100% ACN +1/1000 HCO<sub>2</sub>H

T13 min: 100% ACN +1/1000 HCO<sub>2</sub>H

Eluent 2:

T0: 95/5 H<sub>2</sub>O/ACN (+1/1000 HCO<sub>2</sub>H)

T2: 100% ACN +1/1000 HCO<sub>2</sub>H

T13 min : 100% ACN +1/1000 HCO<sub>2</sub>H

All the compounds were identified by LC/MS and NMR spectra (Bruker UltraShield 400 MHz for proton and 100 MHz for carbon 13). Most purifications were performed on Combiflash Teledyne isco on silica columns with UV detection. Additional analyses were done when possible (IR on Perkin Elmer 2000 FT-IR, melting points on Büchi Melting Point B-545). Proton NMR assignments were based on the integration on the singlet of the N-methyl group (3H). The alpha methylene of the carboxy group also gave a singlet, which was used to calculate the NMR purity of the compounds.

**General procedure for synthesis of (E)-tert-butyl 2-((tert-butoxycarbonyl)imino)-3-methyl-5-oxoimidazolidine-1-carboxylate (2c: supplementary Figure 1)**

Benzoylchloroformate (4.2 mL – 3 eq) was added to a solution of di-isopropyl ethylamine (5.2 mL – 3 eq) with creatinine (1.124 g – 1 eq) in 100 mL of anhydrous dichloromethane under nitrogen. Benzoylchloroformate was added dropwise in an ice bath. The mixture was stirred for 30 mn in the ice bath and over night at room temperature.

The reaction is checked by CCM (silica, heptane/ethyl acetate) and LC/MS. The reaction medium was extracted by addition of dichloromethane and water. The dichloromethane phase was washed 3 times with water and dried with magnesium sulphate.

The dichloromethane solution was concentrated by evaporation under vacuum and allowed to crystallize. 3.25 g of crude (Z<sub>2</sub>)-creatinine was obtained (87%). The (Z<sub>2</sub>)-creatinine was purified on silica gel (heptane /ethyl acetate gradient) for structure determination. The crude product was used for the esterification step.

**(E)-tert-butyl2-((tert-butoxycarbonyl)imino)-3-methyl-5-oxoimidazolidine-1carboxylate (2c)**

**Chemical Formula:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>. **MW:** 381 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** amber colored solid.

**NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ = 3.07 (s, 3H), δ = 4.01 (s, 2H), δ = 5.02 (s, 2H), δ = 5.09 (s, 2H) and δ = 7.34 (m, 10H).

**NMR <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ = 31.5, δ = 51.4, δ = 67.8, δ = 70.2, δ = 127.0, δ = 133.7, δ = 136.1, δ = 147.2, δ = 151.7, δ = 159.5, δ = 155.9.

**FTIR (KBr):** ν max: 3361, 2976, 2667, 1800, 1744, 1669, 1623, 1453, 1384, 1318, 1222, 1135, 1072, 981, 902, 871, 799, 728, 695 cm<sup>-1</sup>.

**MS (ES+):** m/z: 382.3

**Mp:** 124°C.

**Rf:** 0.25 (5:5, heptane/ethyl acetate, revealed by UV 254 nm)

**General procedure for synthesis of (Z<sub>2</sub>)-creatine fatty esters**

Compound **2c** was mixed with excess fatty alcohol without solvent in a pill box according to Table 2 and heated with stirring at 80 °C for 3 to 5 hours until the mixture became a solution (depending on the melting point of the fatty alcohol). The reaction mixture was analyzed by LC/MS analysis and purified on the CombiFlash apparatus.

**(Z)-butyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino)acetate (3c: Supplementary**

**Figure 2):**

**Chemical Formula:** C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. **MW:** 455 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** colorless oil.

**NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ = 0.95 (t, 3H), δ = 1.36 (q, 2H), δ = 1.6 (q, 2H), δ = 3.12 (s, 3H), δ = 4.14 (m, 4H), δ = 5.14 (m, 4H), δ = 7.36 (m, 10H).

**MS (ES+):** m/z: 456.19

**Rf:** 0.75 (5:5, heptane/ethyl acetate, revealed by UV 254 nm)

**Purification:** Combiflash on silica, solvent: heptane/ethyl acetate, gradient: 100/0 → 80/20

**(Z)-octyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino)acetate (3d: Supplementary**

**Figure 3):**

**Chemical Formula:** C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. **MW:** 511 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** yellow oil.

**NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ = 0.87 (t, 3H), δ = 1.26 (m, 10H), δ = 1.62 (q, 2H), δ = 3.13 (s, 3H), δ = 4.14 (m, 2H), δ = 4.19 (s, 2H), δ = 5.14 (s, 2H), δ = 5.19 (s, 2H) δ = 7.33 (m, 10H).

**NMR <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ = 14.0, δ = 14.1, δ = 20.9, δ = 22.5, δ = 25.7, δ = 28.4, δ = 29.0, δ = 31.6, δ = 38.8, δ = 60.3, δ = 65.5, δ = 67.7, δ = 128.1, δ = 128.2, δ = 128.3, δ = 128.4, δ = 128.5, δ = 156.6, δ = 168.2, δ = 171.0

**MS (ES+):** m/z: 512.2

**Rf:** 0.7 (5:5, heptane/ethyl acetate, revealed by UV 254 nm)

**Purification:** Combiflash on silica, solvent: heptane/ethyl acetate, gradient: 100/0 → 80/20

**(Z)-nonyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino)acetate (3e: Supplementary**

**Figure 4):**

**Chemical Formula:** C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. **MW:** 525 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** yellow oil.

**NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ = 0.87 (t, 3H), δ = 1.25 (m, 14H), δ = 1.61 (q, 2H), δ = 3.12 (s, 3H), δ = 3.92 (s, 2H), δ = 4.16 (m, 2H), δ = 5.14 (s, 2H), δ = 5.16 (s, 2H) δ = 7.36 (m, 10H).

**MS (ES+):** m/z: 526.11

**Rf:** 0.7 (5:5, heptane/ethyl acetate, revealed by UV 254 nm)

**Purification:** Combiflash on silica, solvent: heptane/ethyl acetate, gradient: 100/0 → 80/20

**(Z)-dodecyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1-methylguanidino)acetate (3f: Supplementary Figure 5):**

**Chemical Formula:** C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. **MW:** 567 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** yellow oil.

**NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ = 0.88 (t, 3H), δ = 1.25 (m, 18H), δ = 1.62 (q, 2H), δ = 3.07 (s, 3H), δ = 4.16 (m, 4H), δ = 5.14 (s, 2H), δ = 5.19 (s, 2H) δ = 7.35 (m, 10H).

**NMR <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):** δ = 8.0, δ = 8.5, δ = 14.0, δ = 22.6, δ = 25.7, δ = 28.4, δ = 29.1, δ = 38.9, δ = 45.7, δ = 52.9, δ = 53.3, δ = 63.3, δ = 65.5, δ = 67.7, δ = 126.9, δ = 128.0, δ = 128.4, δ = 128.5, δ = 156.5, δ = 168.1

**MS (ES+):** m/z: 568.3

**Rf:** 0.45 (5:5, heptane/ethyl acetate, revealed by UV 254 nm)

**Purification:** Combiflash on silica, solvent: heptane/ethyl acetate, gradient: 100/0 → 80/20

**(Z)-octadecyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1-methylguanidino)acetate (3h: Supplementary Figure 6)**

**Chemical Formula:** C<sub>38</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. **MW:** 651 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** yellow oil.

**NMR <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):** δ = 0.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), δ = 1.26 (m, 30H), δ = 1.629 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), δ = 3.13 (s, 3H), δ = 4.14 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), δ = 4.19 (s, 2H), δ = 5.15 (s, 2H), δ = 5.20 (s, 2H), δ = 7.33 (m, 10H).

**MS (ES+):** m/z: 652.0

**Rf:** 0.17 (5:5, heptane/ethyl acetate, revealed by UV 254 nm)

**Purification:** Combiflash on silica, solvent: heptane/ethyl acetate, gradient: 95/05 → 80/20

### General procedure for synthesis of creatine fatty esters

10 mg.mL<sup>-1</sup> pure (Z<sub>2</sub>) creatine fatty ester was dissolved in anhydrous dichloromethane/methanol solution (1/2) or acetonitrile/methanol (1/1) under nitrogen. 5% Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was added and the reaction mixture was degassed under vacuum, frozen, and purged three times with hydrogen. The medium was allowed to reach room temperature and react, with vigorous stirring.

The reaction was monitored by CCM (silica, heptan/ethyl acetate) and LC/MS. When the reaction was complete, generally after 3 hours, the creatine fatty ester solution was filtered (0.5 µm filter).

#### Butyl 2-(1-methylguanidino)acetate (4c: Supplementary Figure 8):

**Chemical Formula:** C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> **MW:** 187g.mol<sup>-1</sup> **Appearance:** colorless oil.

**NMR <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):** δ =0.9 (t, J = 7Hz, 3H), δ =1.37 (m, J = 7Hz, 2H), δ =1.65 (m, J = 7Hz, 2H), δ =3.07 (s, 3H), δ = 4.24 (m, 4H).

**MS (ES+):** m/z: 188.4

#### Octyl 2-(1-methylguanidino) acetate (4d: Supplementary Figure 9):

**Chemical Formula:** C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. **MW:** 244 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** thick white solid.

**NMR <sup>1</sup>H (MeOD, 400 MHz):**  $\delta = 0.90$  (t,  $J = 5.2$  Hz, 3H),  $\delta = 1.31$  (m, 12H),  $\delta = 3.04$  (s, 3H),  $\delta = 3.30$  (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H),  $\delta = 3.93$  (s, 2H).

**NMR <sup>13</sup>C (MeOD, 100 MHz):**  $\delta = 12.9$ ,  $\delta = 22.2$ ,  $\delta = 25.5$ ,  $\delta = 29.4$ ,  $\delta = 29.4$ ,  $\delta = 29.5$ ,  $\delta = 31.4$ ,  $\delta = 36.5$ ,  $\delta = 55.8$ ,  $\delta = 66.8$ ,  $\delta = 169.9$ ,  $\delta = 186.1$ .

**MS (ES+):** m/z: 244.1

**FTIR:**  $\nu$  max: 3455, 2953, 2849, 2085, 1636, 1493, 1396, 1363, 1249, 1110, 1064, 1028, 898, 823.

**Nonyl 2-(1-methylguanidino) acetate (4e: Supplementary Figure 10):**

**Chemical Formula:** C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. **MW:** 258 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** thick white solid.

**NMR <sup>1</sup>H (MeOD, 400 MHz):**  $\delta = 1.09$  (t, 3H),  $\delta = 1.49$  (m, 14H),  $\delta = 1.86$  (m, 2 H),  $\delta = 3.25$  (s, 3H),  $\delta = 4.38$  (t, 2H),  $\delta = 4.42$  (s, 2H).

**MS (ES+):** m/z: 258.80

**Dodecyl 2-(1-methylguanidino)acetate (4f: Supplementary Figure 11):**

**Chemical Formula:** C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. **MW:** 300 g.mol<sup>-1</sup>. **Appearance:** thick white solid

**NMR <sup>1</sup>H (MeOD, 400 MHz):**  $\delta = 0.90$  (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H),  $\delta = 1.29$  (m, 16H),  $\delta = 1.67$  (m, 4H),  $\delta = 3.06$  (s, 3H),  $\delta = 4.18$  (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H),  $\delta = 4.22$  (s, 2H).

**NMR <sup>13</sup>C (MeOD, 100 MHz):**  $\delta = 12.9$ ,  $\delta = 22.2$ ,  $\delta = 25.4$ ,  $\delta = 28.1$ ,  $\delta = 28.8$ ,  $\delta = 28.9$ ,  $\delta = 29.1$ ,  $\delta = 29.1$ ,  $\delta = 29.2$ ,  $\delta = 29.2$ ,  $\delta = 29.5$ ,  $\delta = 31.5$ ,  $\delta = 32.1$ ,  $\delta = 36.3$ ,  $\delta = 51.0$ ,  $\delta = 61.5$ ,  $\delta = 65.5$ ,  $\delta = 77.4$ ,  $\delta = 77.7$ ,  $\delta = 78.1$ ,  $\delta = 167.8$ .

**MS (ES+):** m/z: 300.8



**FTIR (KBr):**  $\nu$  max : 2921, 2852, 1743, 1669, 1592, 1498, 1466, 1418, 1328, 1220, 1116, 681, 608  $\text{cm}^{-1}$ .

**Mp:** 101.4 °C

**Octadecyl 2-(1-methylguanidino)acetate (4h: Supplementary Figure 12):**

**Chemical Formula:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_2$ . **MW:** 383  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . **Appearance:** white solid

**NMR  $^1\text{H}$  (MeOD, 400 MHz):**  $\delta = 0.86$  (t,  $J = 8\text{Hz}$ , 3H),  $\delta = 1.26$  (m, 30H),  $\delta =$  (t,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , 2H),  $\delta = 3.03$  (s, 3H),  $\delta = 4.12$  (t,  $J = 8\text{Hz}$ , 2H),  $\delta = 4.31$  (s, 2H)

**NMR  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 100 MHz):**  $\delta = 14.0$ ,  $\delta = 22.6$ ,  $\delta = 25.7$ ,  $\delta = 29.1$ ,  $\delta = 29.3$ ,  $\delta = 29.4$ ,  $\delta = 29.4$ ,  $\delta = 29.5$ ,  $\delta = 29.6$ ,  $\delta = 29.6$ ,  $\delta = 31.8$ ,  $\delta = 32.7$ ,  $\delta = 63.0$ ,  $\delta = 114.9$ ,  $\delta = 127.9$ ,  $\delta = 128.2$ .

**MS (ES+):** m/z: 384.4

**FTIR (KBr):**  $\nu$  max: 3415, 2958, 2918, 2850, 2397, 2303, 1742, 1588, 1468, 1263, 1209, 1163, 1071, 967  $\text{cm}^{-1}$

**Mp:** 55.5 °C

**General procedure for synthesis of creatine ethyl ester**

Pure thionyl chloride (2.5 mL) was added through a condenser under nitrogen to a solution of creatine (1.23g -9.38 mmol) in dried ethanol (80 mL) according to US 2005/0049428. The solution was refluxed for one hour and then allowed to cool to room temperature. Creatine ethyl ester hydrochloride was recovered by crystallization in a 50% yield.

**Ethyl 2-(1-methylguanidino)acetate (4b: Supplementary Figure7) HCl:**

**Chemical Formula:**  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$  **MW:** 159  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  **Appearance:** crystal white needles.

**NMR  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):**  $\delta = 1.26$  (t,  $J = 7\text{Hz}$ , 3H),  $\delta = 3.05$  (s, 3H),  $\delta = 4.25$  (q,  $J = 7\text{Hz}$ , 2H),  $\delta = 4.24$  (s, 2H).

**MS (ES+):** m/z: 160

### **Pharmacology:**

#### ***In vitro* primary cell based rat blood-brain barrier model**

We first tested the capacity of the creatine fatty esters to cross the *in vitro* BBB model, which consisted of a coculture of rat primary endothelial and astroglial cells. Primary rat astroglial cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well in 1500  $\mu\text{L}$  on a 12-well plate. The astroglial culture medium was a mixture of  $2 \times 10^4$  cells/well in 1500  $\mu\text{L}$  on a 12% FBS, 1% human serum, 1% penicillin/streptomycin/neomycin and 0.4% FGF. 24 hours later, Transwell inserts (Costar; pore size 0.4  $\mu\text{m}$ ; diameter 12 mm; surface 1.12  $\text{cm}^2$ ) were placed inside the wells and primary rat endothelial cells were plated out on the upper layer at a density of  $8 \times 10^4$  cells/insert in 500  $\mu\text{L}$  EBM-2 basal medium supplemented with the EGM-2MV kit (Lonza). The chambers containing endothelial cells and astroglial cells were considered as the apical and basolateral compartments, respectively. The plates were incubated at 37°C in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  and the BBB model formed confluent monolayers within 12 days<sup>268, 278</sup>.

After 12 days, the integrity of this BBB model was assessed (see below) and the creatine fatty esters were screened. The apical and basolateral media were replaced by specific transport buffer (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.8 mM glucose and 5 mM HEPES) in which the creatine fatty esters were dissolved at 1 and 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . After 60 min of incubation, supernatants were diluted 5 fold in acetonitrile-5%

formic acid and cells were scrapped in a mixture 20% water/76% acetonitrile/4% formic acid. An HPLC-MS/MS was then performed to detect the creatine fatty esters in each compartment and in endothelial and astroglial cell lysates. The creatine fatty esters which were concerned in this experiment were 4b, 4c, 4d, 4e, 4f and 4h.

The integrity of the cell-based BBB models was demonstrated by measuring the flux of [<sup>14</sup>C]-sucrose, [<sup>3</sup>H]-vinblastine and [<sup>3</sup>H]-propranolol, through the monolayer. Transwells with rat endothelial cells monolayers were transferred to new 12-well plates. A specific transport buffer was added: 500 µL to the apical compartment and 1500 µL to the basolateral compartment. After 60 min of incubation at 37°C of 0.1 µCi/mL of [<sup>14</sup>C]-labeled sucrose, of 1 µCi/mL of [<sup>3</sup>H]-propranolol in the apical compartment and 0.1 µCi/mL of [<sup>3</sup>H]-vinblastine in the apical and basolateral compartment, supernatants from both apical and basolateral compartments were collected. The amount of tracer that passed through the endothelial monolayer was determined by scintillation counting and the permeability  $P_{app}$  of each compound was assessed using the formula (A):

$$P_{app} X_{A \rightarrow B} = \frac{[X_{basolateral}] \times V_B}{T \times S \times [X_0]}$$

X is the compound for which the permeability is assessed,  $[X_{basolateral}]$  the concentration of the compound X in the basolateral compartment at the end of the incubation,  $V_B$  the total volume of the basolateral compartment (1.5 mL), T the time of the incubation, S the transwell surface area and  $[X_0]$  the concentration of compound X at  $T_0$ .

Validated BBB models have sucrose permeability below  $8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , propranolol permeability above  $16 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  and vinblastine permeability ratio above 2.

The absence of toxicity of the creatine fatty esters on the endothelial cells viability was been estimated by an MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) cell viability test on endothelial monolayers. The endothelial culture medium was replaced by a solution of  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of creatine fatty ester in the transport buffer. The cells were incubated for 75 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . The solution was then removed and  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  MTT in PBS was added for an overnight incubation. MTT is reduced by metabolically active cells to insoluble purple formazan dye crystals. DMSO is then added to the wells, solubilizing the crystals so the absorbance can be read using a spectrophotometer at wavelengths of 550 nm and 650 nm. Results are expressed as  $[\text{OD}_{(550 \text{ nm})} - \text{OD}_{(650 \text{ nm})}]$ , percentage of control.

The Lucifer yellow (LY) permeability test was used to study the effect of creatine fatty esters on BBB integrity. LY was diluted in transport buffer to a final concentration of  $100 \mu\text{M}$  and added to the apical compartment during creatine ester incubation. Fluorescence leakage was determined for LY with 485 nm excitation and 530 nm emission using a fluorescence plate reader. The LY permeability ( $\text{LY } P_{\text{app}}$ ) was then assessed using formula (A). An  $\text{LY } P_{\text{app}}$  value below  $5.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  indicates that the creatine ester did not damage BBB integrity.

### ***In vitro* rat primary neuronal model**

Primary cortical neurons were prepared from fetal (E18) rat cortices according to the 86/609 European directive. The pregnant female was anesthetized with isoflurane and the embryos were extracted by laparotomy and placed in a Petri dish containing HBSS supplemented with 5 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4. The brain was removed from the skull and the cortices were dissected. Two enzymatic dissociations were performed with 0.25% trypsin-

EDTA (Life Technologies) without and then with DNase (Sigma Aldrich). Cortical cells were then seeded at a density of  $10^5$  cells/cm<sup>2</sup> onto poly-D-lysine (Sigma)-coated 24-well plates in a medium consisting of DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% horse serum (Life Technologies) first. Two hours later, the medium was replaced by Neurobasal containing B27 1X (Life Technologies), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 10 U/mL penicillin/streptomycin/neomycin. At culture day 4, 3  $\mu$ M of cytosine- $\beta$ -D-arabinose was added. Neuronal cells express typical markers such as MAP2 and neurofilament (data not shown).

The tests with creatine esters were performed at 10 DIV in HBSS at 1 and 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. After one hour at 37°C and under 5% CO<sub>2</sub>, the supernatant was diluted 5-fold in acetonitrile-5% formic acid and cells were scrapped in 20% water/76% acetonitrile/4% formic acid. An HPLC-MS/MS was then performed to detect the creatine fatty esters in the cell lysates.

A lactate deshydrogenase (LDH) test was performed to assess the absence of neuronal death. 70  $\mu$ L of LDH lysis solution was added to each well after the 60-min experiment and was incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 45 min. 50  $\mu$ L was removed for testing and 100  $\mu$ L of LDH assay mixture was added for 30 min at room temperature. 10  $\mu$ L of 1N HCl was finally added to the wells and the absorbance was read using a spectrophotometer at wavelengths of 490 nm and 690 nm. Results are expressed as  $[DO_{(490\text{ nm})} - DO_{(690\text{ nm})}]$ , ratio to the control. A ratio equal to or less than 1 indicates an absence of neuronal cell toxicity.

### **Human primary fibroblasts cell culture**

Human fibroblasts were obtained from skin biopsies, through a gift of the Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme at the Necker Hospital in Paris. Three

patients with cerebral creatine deficiency caused by lack of the creatine transporter functionality and 1 control were studied. All of the mutations were previously described in Valayannopoulos et al., 2013<sup>279</sup>: p.Asn336del c.1006\_1008delAAC (patient 1, DTp1) and p.(Gly499del) c.1497\_1500delGAG (patient 2, VLp2) as P3 and P4, respectively, or in Valayannopoulos et al., 2012<sup>156</sup>: p.(G414del) c.1221\_1223delTTC (patient 3, CTp3) as P2. The fibroblasts were plated out at 30 000 cells per well in 6-well plates in a DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin/neomycin, 1% sodium pyruvate and 1% L-glutamine. They were cultured for 6 days by replacing the medium every 2 to 3 days. The incubation of creatine esters consisted in replacing the medium by HBSS in which the compound was diluted to 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . After one hour at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, the supernatant was diluted 5-fold in acetonitrile-5% formic acid and cells were scrapped in 20% water/76% acetonitrile/4% formic acid. An HPLC-MS/MS was then performed to detect the creatine fatty esters in the cell lysates.

### **Esterase activity determination**

Esterase activity in fibroblast cells was determined by incubating 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of cell proteins with 350  $\mu\text{M}$  of 4-nitrophenyl acetate (Sigma Aldrich) in deionized water. Conversion of the 4-nitrophenyl acetate by esterases leads to p-nitrophenol which can be monitored by absorbance spectroscopy at 405 nm.

### **HPLC-MS/MS analysis**

Liquid chromatography (Shimadzu HPLC system LC 20AD) with a 2.0 × 150 mm Uptisphere Diol HPLC column (UP6OH, Interchim) was used for elution of creatine esters. The mobile phase was isocratic at 40/60 (detection of creatine, ethyl and butyl creatine esters) or 20/80 (detection of octyl, nonyl, dodecyl and octadecyl creatine esters) A/B where solvent A was H<sub>2</sub>O containing 0.1% formic acid and solvent B was acetonitrile containing 0.1% formic acid; the flow rate was 0.4 mL/min. Analyte (10 µL) was injected onto the column placed in an oven at 40°C. The total run time was 6 min.

Detection was done by tandem mass spectrometry (Finnigan TSQ Quantum Discovery with Xcalibur and LC Quan softwares, Thermo) in positive electrospray mode. Spray voltage was 3.0 kV and sheath and auxiliary gas pressures were 50 and 20 (arbitrary units), respectively. The in-source CID energy was fixed at 12 V and capillary temperature was 350°C. Tube lens and collision energy values were optimized for each compound and are summarized in table 4. Multiple reaction monitoring was used for the detection of the ion transitions (Table 4). The standard curves showed linearity for creatine over a range of 0.05-10 µg.mL<sup>-1</sup> and of 0.01-5 µg.mL<sup>-1</sup> for ethyl, butyl, octyl, nonyl, dodecyl and octadecyl creatine esters. Creatine fatty esters and creatine concentrations and amounts were determined in each compartment and in endothelial cells, astroglial cells and fibroblasts lysates. The amount of creatine fatty esters and the amount of creatine were standardized to the amount of protein in each lysate.

Each experiment was performed in triplicates.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using the Prism 5.01 program (GraphPad Software, Inc, San Diego SA). Statistical comparisons were made using a two-tailed unpaired t test and a variance analysis one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test. Changes were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

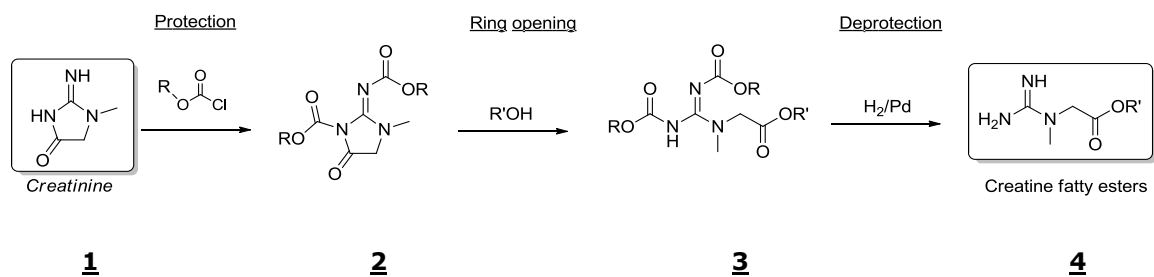


▪ REFERENCES

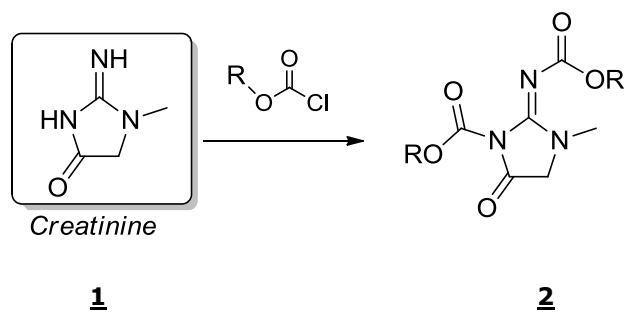
1. Stockler, S.; Schutz, P. W.; Salomons, G. S. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* **2007**, *46*, 149-66.
2. Schulze, A. Creatine deficiency syndromes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2003**, *244*, 143-150.
3. Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* **2000**, *80*, 1107-213.
4. Stockler, S.; Hanefeld, F.; Frahm, J. Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *Lancet* **1996**, *348*, 789-90.
5. Poo-Arguelles, P.; Arias, A.; Vilaseca, M. A.; Ribes, A.; Artuch, R.; Sans-Fito, A.; Moreno, A.; Jakobs, C.; Salomons, G. X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* **2006**, *29*, 220-3.
6. van de Kamp, J. M.; Pouwels, P. J.; Aarsen, F. K.; ten Hoopen, L. W.; Knol, D. L.; de Klerk, J. B.; de Coo, I. F.; Huijmans, J. G.; Jakobs, C.; van der Knaap, M. S.; Salomons, G. S.; Mancini, G. M. Long-term follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* **2012**, *35*, 141-9.
7. Cecil, K. M.; Salomons, G. S.; Ball, W. S., Jr.; Wong, B.; Chuck, G.; Verhoeven, N. M.; Jakobs, C.; DeGrauw, T. J. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect? *Ann Neurol* **2001**, *49*, 401-4.
8. Ohtsuki, S.; Tachikawa, M.; Takanaga, H.; Shimizu, H.; Watanabe, M.; Hosoya, K.; Terasaki, T. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**, *22*, 1327-35.
9. deGrauw, T. J.; Cecil, K. M.; Byars, A. W.; Salomons, G. S.; Ball, W. S.; Jakobs, C. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* **2003**, *244*, 45-8.
10. Perasso, L.; Lunardi, G. L.; Risso, F.; Pohvozcheva, A. V.; Leko, M. V.; Gandolfo, C.; Florio, T.; Cupello, A.; Burov, S. V.; Balestrino, M. Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochem Res* **2008**, *33*, 765-75.
11. Perasso, L.; Adriano, E.; Ruggeri, P.; Burov, S. V.; Gandolfo, C.; Balestrino, M. In vivo neuroprotection by a creatine-derived compound: phosphocreatine-Mg-complex acetate. *Brain Res* **2009**, *1285*, 158-63.
12. Burov, S.; Leko, M.; Dorosh, M.; Dobrodumov, A.; Veselkina, O. Creatinyl amino acids: new hybrid compounds with neuroprotective activity. *J Pept Sci* **2011**, *17*, 620-6.
13. Skelton, M. R.; Schaefer, T. L.; Graham, D. L.; Degrauw, T. J.; Clark, J. F.; Williams, M. T.; Vorhees, C. V. Creatine transporter (CrT; Slc6a8) knockout mice as a model of human CrT deficiency. *PLoS One* **2011**, *6*, e16187.
14. Kurosawa, Y.; Degrauw, T. J.; Lindquist, D. M.; Blanco, V. M.; Pyne-Geithman, G. J.; Daikoku, T.; Chambers, J. B.; Benoit, S. C.; Clark, J. F. Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J Clin Invest* **2012**, *122*, 2837-46.
15. Lunardi, G.; Parodi, A.; Perasso, L.; Pohvozcheva, A. V.; Scarrone, S.; Adriano, E.; Florio, T.; Gandolfo, C.; Cupello, A.; Burov, S. V.; Balestrino, M. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience* **2006**, *142*, 991-7.

16. Adriano, E.; Garbati, P.; Damonte, G.; Salis, A.; Armirotti, A.; Balestrino, M. Searching for a therapy of creatine transporter deficiency: some effects of creatine ethyl ester in brain slices in vitro. *Neuroscience* **2011**, 199, 386-93.
17. Fons, C.; Arias, A.; Sempere, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Mas, A.; Lopez-Sala, A.; Garcia-Villoria, J.; Vilaseca, M. A.; Ozaez, L.; Lluch, M.; Artuch, R.; Campistol, J.; Ribes, A. Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency. *Mol Genet Metab* **2010**, 99, 296-9.
18. Katseres, N. S.; Reading, D. W.; Shayya, L.; DiCesare, J. C.; Purser, G. H. Non-enzymatic hydrolysis of creatine ethyl ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, 386, 363-367.
19. Katseres, N. S.; Reading, D. W.; Shayya, L.; DiCesare, J.; Purser, G. H. Hydrolysis of creatine ethyl ester. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2009**, 237.
20. Giese, M. W.; Lecher, C. S. Non-enzymatic cyclization of creatine ethyl ester to creatinine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, 388, 252-255.
21. Lacombe, O.; Videau, O.; Chevillon, D.; Guyot, A. C.; Contreras, C.; Blondel, S.; Nicolas, L.; Ghetas, A.; Benech, H.; Thevenot, E.; Pruvost, A.; Bolze, S.; Krzaczkowski, L.; Prevost, C.; Mabondzo, A. In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm* **2011**, 8, 651-63.
22. Salomons, G. S.; van Dooren, S. J.; Verhoeven, N. M.; Cecil, K. M.; Ball, W. S.; Degrauw, T. J.; Jakobs, C. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* **2001**, 68, 1497-500.
23. Brun, E.; Carriere, M.; Mabondzo, A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO(2) nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, 33, 886-96.
24. Valayannopoulos, V.; Bakouh, N.; Mazzuca, M.; Nonnenmacher, L.; Hubert, L.; Makaci, F. L.; Chabli, A.; Salomons, G. S.; Mellot-Draznieks, C.; Brule, E.; de Lonlay, P.; Toulhoat, H.; Munnich, A.; Planelles, G.; de Keyzer, Y. Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab Dis* **2012**, 36, 103-12.
25. Valayannopoulos, V.; Boddaert, N.; Chabli, A.; Barbier, V.; Desguerre, I.; Philippe, A.; Afenjar, A.; Mazzuca, M.; Cheillan, D.; Munnich, A.; de Keyzer, Y.; Jakobs, C.; Salomons, G. S.; de Lonlay, P. Treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* **2012**, 35, 151-7.

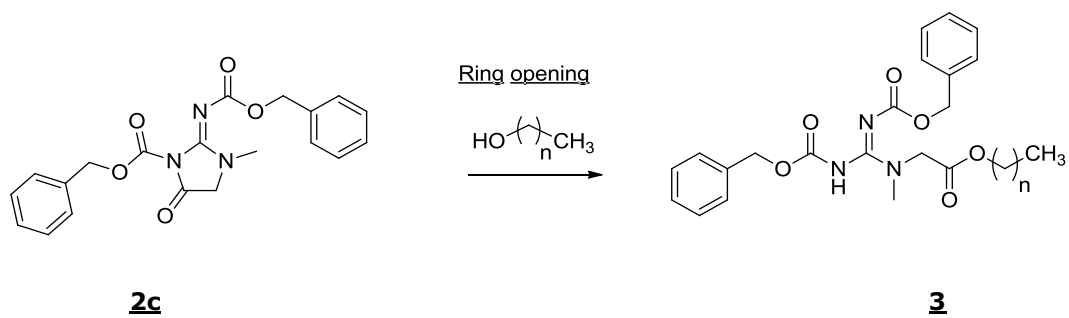
**Figure 1:**



**Figure 2:**



**Figure 3:**



**Figure 4:**

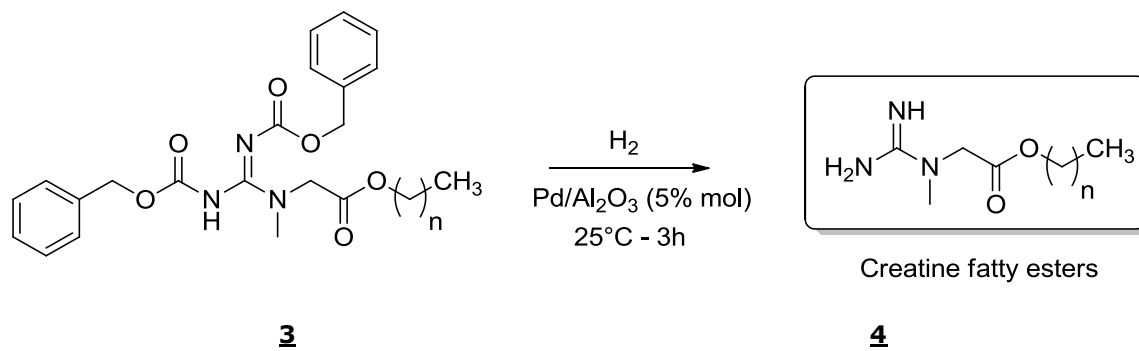


Figure 5:

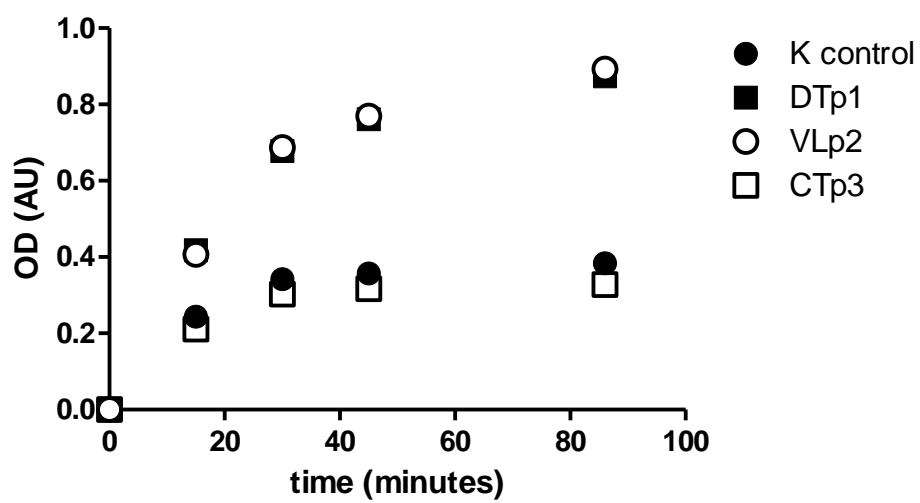


Figure 6:

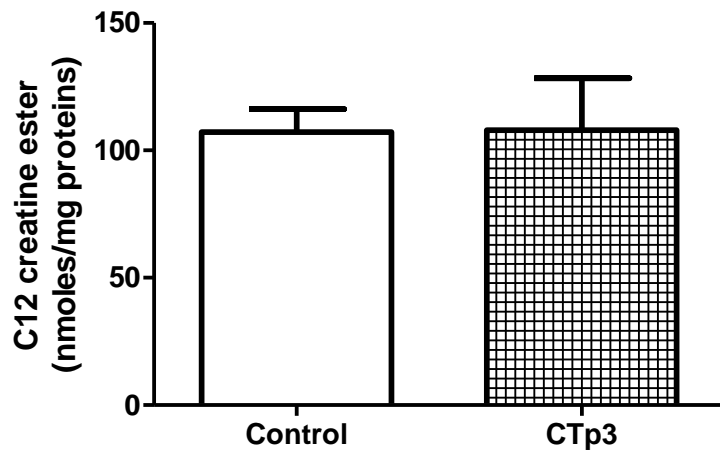
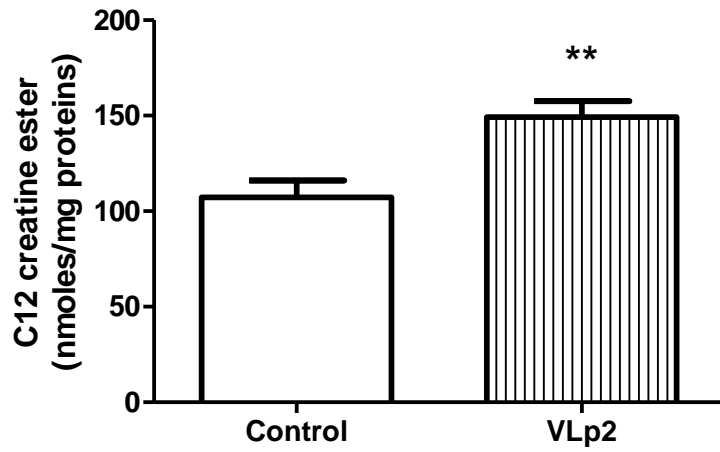
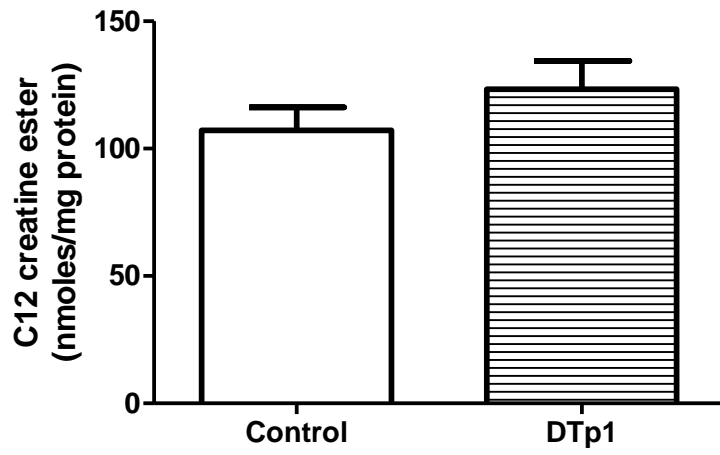
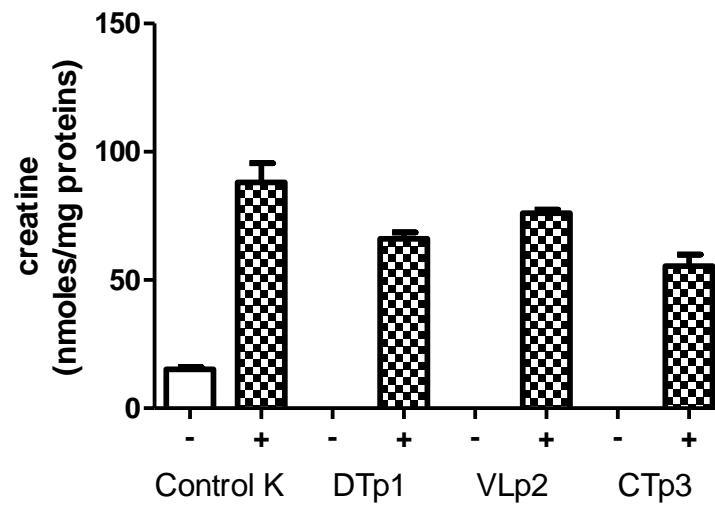




Figure 7:



**Table 1:**

Entry	Reagent	Solvent	Base	Product	Yield (%)
1	Boc <sub>2</sub> O (5 equiv.)	Dioxane/Water	NaOH (1 equiv.)	2a	traces
2	Boc <sub>2</sub> O (6 equiv.)	DCM	DIEPA (6 equiv.)	2a	traces
3	FmocCl (3 equiv.)	DCM	DIEPA (3 equiv.)	2b	21
4	ZCl (3 equiv.)	DCM	DIEPA (3 equiv.)	2c	87

Reactions were carried out with 0.1 M reactants at room temperature overnight.

**Table 2:**

Entry	Alcohol	Stoichiometry (equiv.)	Conditions	Yield (%)	Product
1	CH <sub>3</sub> OH	as solvent	25°C 2h	92	3a
2	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	as solvent	80°C 4h	72	3b
3	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	10	60°C 4h	60	3c
4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> OH	4	80°C 4h	40	3d
5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> OH	8	80°C 5h	25	3e
6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OH	8	80°C 7h	47	3f
7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> OH	6	80°C 7h	55	3g
8	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> OH	1,5	80°C 16h	25	3h
9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> OH	2	80°C 5h	50	3h

Reactions were carried out with 0.1 M reactants.

**Table 3:**

Reactant	Solvent	Product	Yield (%)
3c	DCM	4c	7
3d	DCM/MeOH (1/1)	4d	>95
3e	DCE	4e	50
3f	DCM/MeOH (1/4)	4f	>95
3f	DCM/MeOH (1/2)	4f	>95
3g	DCM/MeOH (1/1)	4g	>95
3h	DCM/MeOH (1/2)	4h	>95

**Table 4:**

Compound/chain lenght	Transition (ES+)	parent ion m/z	product ion m/z	collision energy (eV)	Tube lens
creatine (CR)	T1	132.156	90.185	10	100
creatinine (CRN)	T1	114.124	86.196	10	75
	T2	114.124	44.254	10	75
	T3	114.124	44.254	10	75
4b/C2	T1	160.153	90.195	15	20
	T2	160.153	132.126	12	20
	T3	160.153	118.175	12	20
4c/C4	T1	188.197	90.175	15	70
	T2	188.197	132.144	12	70
	T3	188.197	146.166	12	70
4d/C8	T1	244.236	90.165	20	80
	T2	244.236	132.137	15	80
	T3	244.236	202.185	15	80
4e/C9	T1	258.225	90.175	13	100
	T2	258.225	132.135	20	100
	T3	258.225	342.346	15	100
4f/C12	T1	300.285	90.125	25	110
	T2	300.285	132.146	20	110
	T3	300.285	258.195	15	110
4h/C18	T1	384.364	90.185	35	115
	T2	384.364	132.136	25	115
	T3	384.364	342.346	20	115

**Table 5:**

creatine fatty ester	MW	logP	PSA (Å)	concentration (µg/ml)	endothelial cells		astroglial cells		neurons			
					cell lysate (nmoles/mg)	% T0	cell lysate (nmoles/mg)	% T0	surpernatant (nmoles)	% T0	cell lysate (nmoles/mg)	% T0
4b/C2	159.2	-0.72	81.15	1	nd	nd	nd	nd	4.78 ± 0.17	108 ± 3.75 ***	0.21 ± 0.04 †	0.24 ± 0.05 ***
				10	nd	nd ***	nd	nd ***	44.4 ± 0.88	96.0 ± 1.88 ***	1.47 ± 0.34 †	0.16 ± 0.01 ***
4c/C4	187.2	0.25	81.15	1	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
				10	nd	nd ***	nd	nd ***	-	-	-	-
4d/C8	243.4	2.03	81.15	1	-	-	-	-	2.21 ± 0.36	98.4 ± 16.0 ***	5.88 ± 0.44	12.6 ± 0.29 ***
				10	0.33 ± 0.10	0.18 ± 0.06 ***	0.24 ± 0.04	0.22 ± 0.03 ***	21.3 ± 0.62	104 ± 3.06 ***	5.88 ± 0.44	11.4 ± 0.43 ***
4e/C9	257.4	2.47	81.15	1	1.59 ± 0.48	5.24 ± 1.55	1.44 ± 0.42	5.82 ± 1.66	-	-	-	-
				10	8.14 ± 3.95	4.21 ± 1.23 ***	13.3 ± 4.50	7.83 ± 4.00 ***	-	-	-	-
4f/C12	299.5	3.81	81.15	1	-	-	-	-	0.18 ± 0.03	5.87 ± 1.62	18.6 ± 3.58	55.3 ± 28.7
				10	70.6 ± 7.80	15.4 ± 1.70	31.6 ± 13.2	11.5 ± 4.77	1.85 ± 0.24	10.5 ± 2.52	257 ± 76.8	58.2 ± 11.3
4h/C18	383.6	5.59	81.15	1	-	-	-	-	0.27 ± 0.06	43.1 ± 9.93 *	12.5 ± 1.54	75.5 ± 8.15 ***
				10	6.46 ± 1.42	2.03 ± 0.45 ***	0.12 ± 0.07	0.06 ± 0.03 ***	6.85 ± 1.39	80.0 ± 16.3 ***	53.9 ± 10.7	32.2 ± 1.45 ***

**Table 6 :**

	Concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	LY P <sub>app</sub> (*10 <sup>-6</sup> cm/s)	MTT endothelial cells (% of control)	MTT astroglial cells (% of control)	LDH neurons (ratio compared to ctrl)
4b/C2	1	1.54 ± 0.28	-	-	0.53
	10	1.13 ± 0.47	-	76.9 ± 21.5	0.53
4c/C4	1	1.23 ± 0.55	-	-	0.54
	10	1.81 ± 0.69	-	90.6 ± 9.48	0.58
4d/C8	1	0.93 ± 0.33	-	-	0.65
	10	2.42 ± 1.26	84.6 ± 13.0	122 ± 20.4	0.64
4e/C9	1	1.49 ± 0.33	-	-	0.52
	10	1.18 ± 0.25	-	143 ± 33.2	0.45
4f/C12	1	0.70 ± 0.05	-	-	0.67
	5/10	1.70 ± 0.49	87.8 ± 13.0	145 ± 19.9	0.69
4h/C18	1	-	-	-	0.65
	10	-	95.3 ± 6.21	88.3 ± 8.81	0.69

## Legends

**Figure 1: Synthesis of creatine fatty ester by ring opening of protected creatinine by fatty alcohols**

**Figure 2: Protection of creatinine**

**Figure 3: Nucleophilic addition of alcohols to diprotected creatinine**

**Figure 4: Deprotection of (Z<sub>2</sub>) creatine fatty esters**

**Figure 5: Activity of cellular esterases in fibroblasts.** The activity of cellular esterases in human fibroblasts is, represented by the optical density of p-nitrophenol as a function of time, for control subject K (black circle) and three patients (DTp1, VLp2, CTp3) with creatine transporter deficiency.

**Figure 6: Quantitative determination of dodecyl creatine ester.** Dodecyl creatine ester is expressed as nmoles of ester per mg of proteins in the cellular extract, in the fibroblasts of 3 patients compared with the control subject. Student's t-test was used to determine significant differences between control and patient, \*\* stands for  $p < 0.01$ .

**Figure 7: Quantitative determination of creatine,** The amount of creatine is expressed as nmoles of ester per mg of proteins in the cellular extract, in the fibroblasts of the control subject and 3 patients in the presence (+) or absence (-) of dodecyl creatine ester.

**Table 1: Protection of creatinine**

**Table 2: Nucleophilic addition of alcohols to compound 2c**

**Table 3: Deprotection of the Z groups**



**Table 4: Multiple reaction monitoring parameters for the detection of creatine, creatinine and creatine ethyl (4b/C2), butyl (4c/C4), octyl (4d/C8), nonyl (4e/C9), dodecyl (4f/C12) and octadecyl (4h/C18) fatty esters by HPLC-MS/MS.**

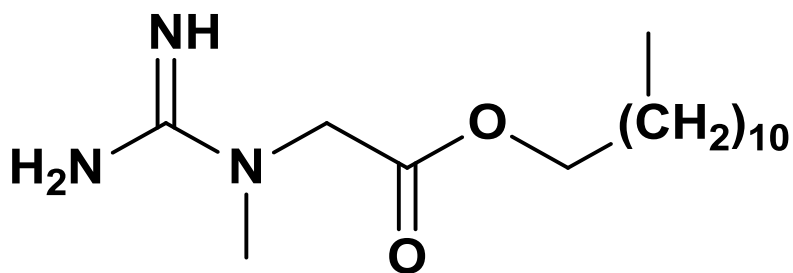
**Table 5: Structure activity relationships of ethyl (4b/C2), butyl (4c/C4), octyl (4d/C8), nonyl (4e/C9), dodecyl (4f/C12) and octadecyl (4h/C18) creatine fatty esters.** The physicochemical parameters, including molecular weight (MW), lipophilicity (logP) and polar surface area (PSA), show that the carbonyl chains linkages increase both MW and logP but not PSA. The quantitative determinations in each cell types (e.g. endothelial, astroglial cells and neurons) are referred to as quantity, expressed in nmoles per mg of proteins in the cellular extract or in nmoles in supernatants, and percentage of initial content. Nd: not detectable; -: not performed; † values near the lowest quantitation limit. The statistical significance was assessed by an ANOVA followed by a Bonferonni post-test with dodecyl creatine ester as a reference since its uptake into cells is the greatest: \* stands for  $p < 0.05$  and \*\*\* stands for  $p < 0.0001$ . For each compounds, two experiments were performed in triplicates.

**Table 6: *In vitro* evaluation of toxicity of creatine ethyl (4b/C2), butyl (4c/C4), octyl (4d/C8), nonyl (4e/C9), dodecyl (4f/C12) and octadecyl (4h/C18) fatty esters.** Three tests assessing the cellular toxicity were performed. The Lucifer Yellow permeability (LY  $P_{app}$ ) showed values less than  $5 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  for all conditions, indicating that none of them induced BBB disruption. The mitochondrial function was not altered in any conditions as showed by the MTT test, in which the cell viability did not differ of more than 20% from the control, and by the LDH test, in which the ratio compared with the control was below 1, meaning that no condition induced neurotoxicity. -: test not performed

### Table of Contents Graphic

**Synthesis and Biological Evaluation of New Creatine Fatty Esters Revealed Dodecyl Creatine Ester as a Promising Drug Candidate for the Treatment of the Creatine Transporter Deficiency**

Alexandra **Trotier-Faurion**, Sophie **Dézard**, Frédéric **Taran**, Vassili **Valayannopoulos**,  
Pascale **de Lonlay** and Aloïse **Mabondzo**



Dodecyl Creatine ester

## Supporting Informations

### Synthesis and Biological Evaluation of New Creatine Fatty Esters Revealed Dodecyl Creatine Ester as a Promising Drug Candidate for the Treatment of the Creatine Transporter Deficiency

Alexandra Trotier-Faurion, Sophie Dézard, Frédéric Taran, Vassili Valayannopoulos, Pascale de Lonlay and Aloïse Mabondzo

Supplementary Figure 1.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of (E)-tert-butyl 2-((tert-butoxycarbonyl)imino)-3-methyl-5-oxoimidazolidine-1-carboxylate

Supplementary Figure 2.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of (Z)-butyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino)acetate

Supplementary Figure 3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of (Z)-octyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino)acetate

Supplementary Figure 4.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of (Z)-nonyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino) acetate

Supplementary Figure 5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of (Z)-dodecyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1methylguanidino)acetate

Supplementary Figure 6.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of (Z)-octadecyl 2-(2,3-bis((benzyloxy)carbonyl)-1-methylguanidino)acetate

Supplementary Figure 7.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Ethyl 2-(1-methylguanidino)acetate

Supplementary Figure 8.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Butyl 2-(1-methylguanidino)acetate

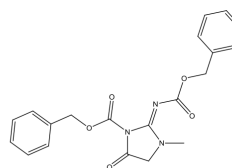
**Supplementary Figure 9.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of Octyl 2-(1-methylguanidino) acetate**

**Supplementary Figure 10.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Nonyl 2-(1-methylguanidino) acetate**

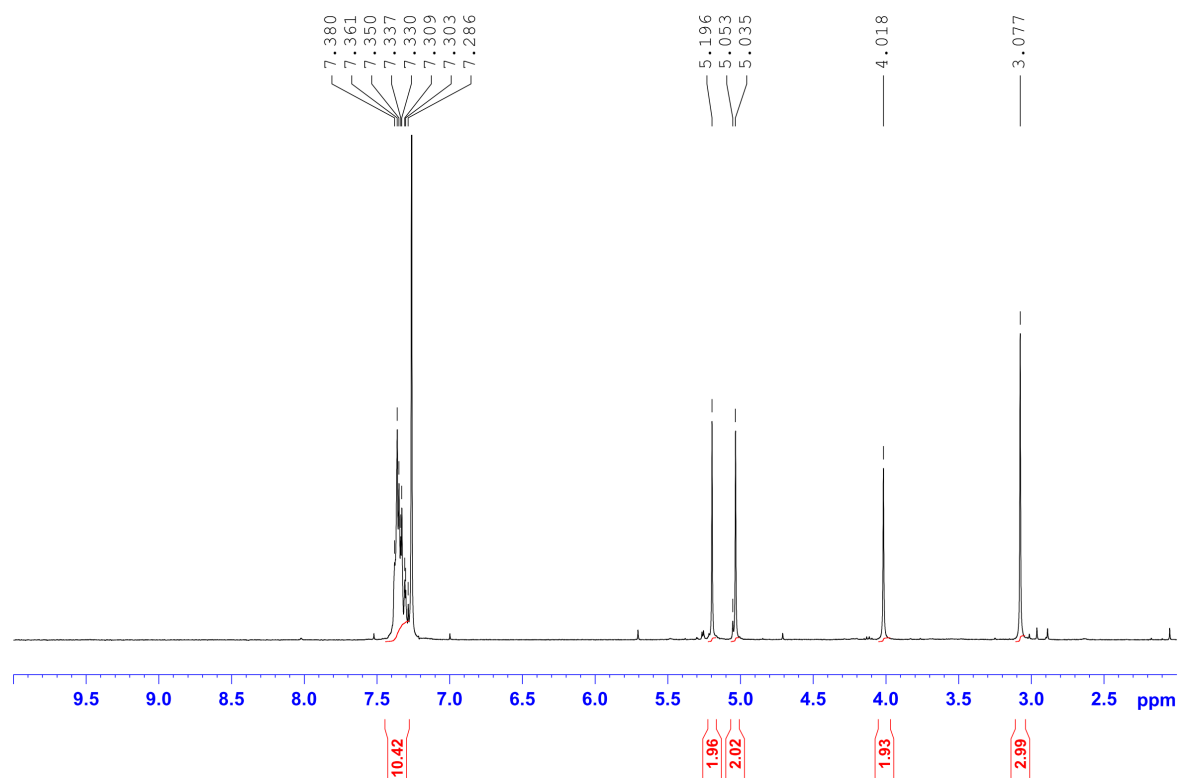
**Supplementary Figure 11.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of Dodecyl 2-(1-methylguanidino)acetate**

**Supplementary Figure 12.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Octadecyl 2-(1-methylguanidino)acetate**

Compound **2c**

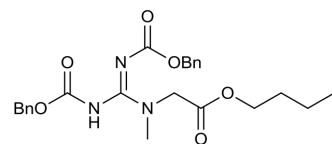


MW : 381

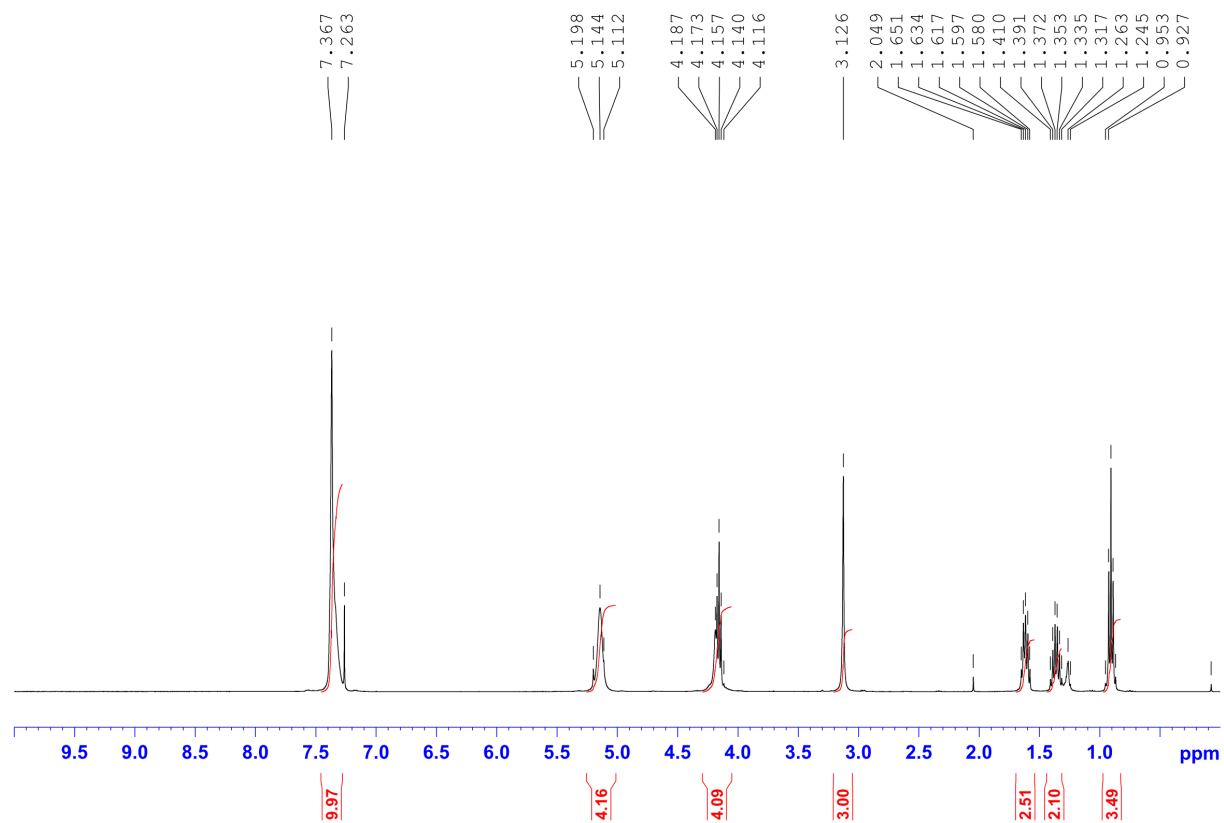


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 1

Compound **3c**

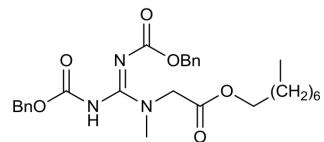


MW : 455

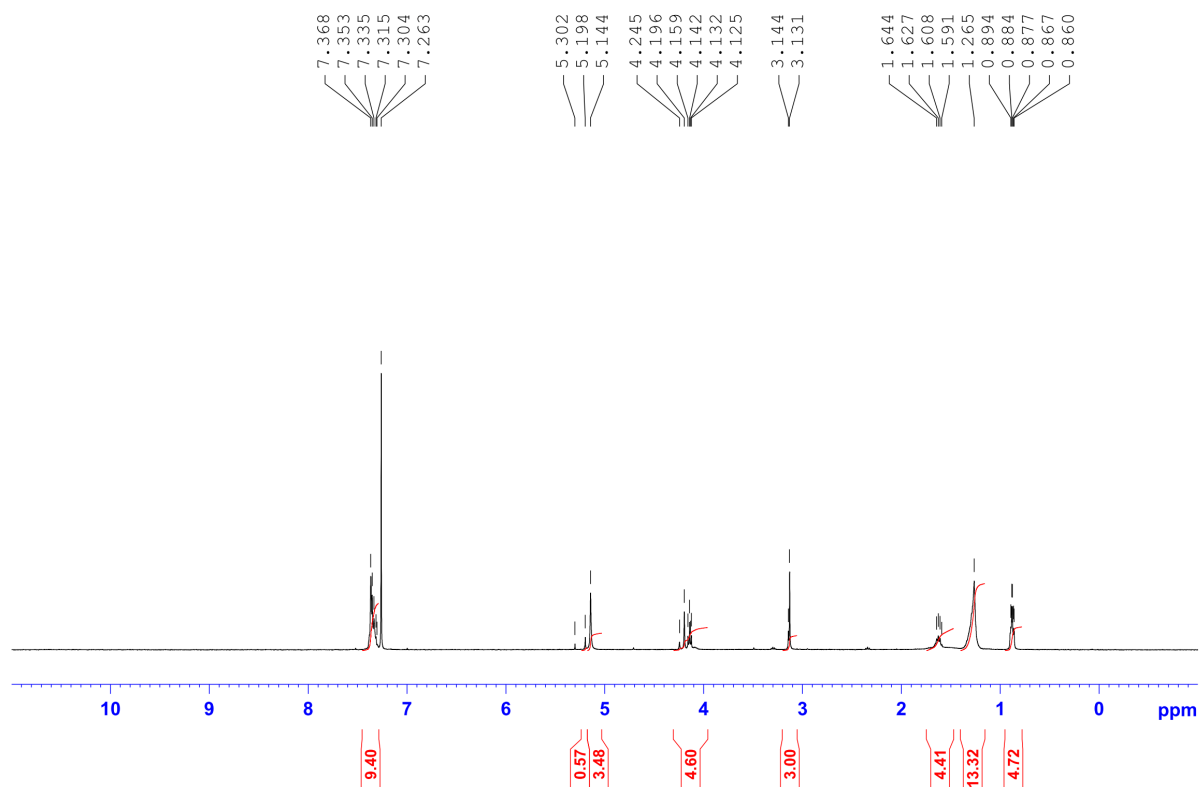


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 2

Compound **3d**

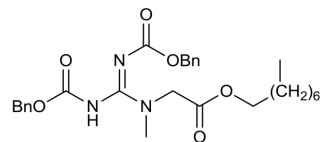


MW : 511

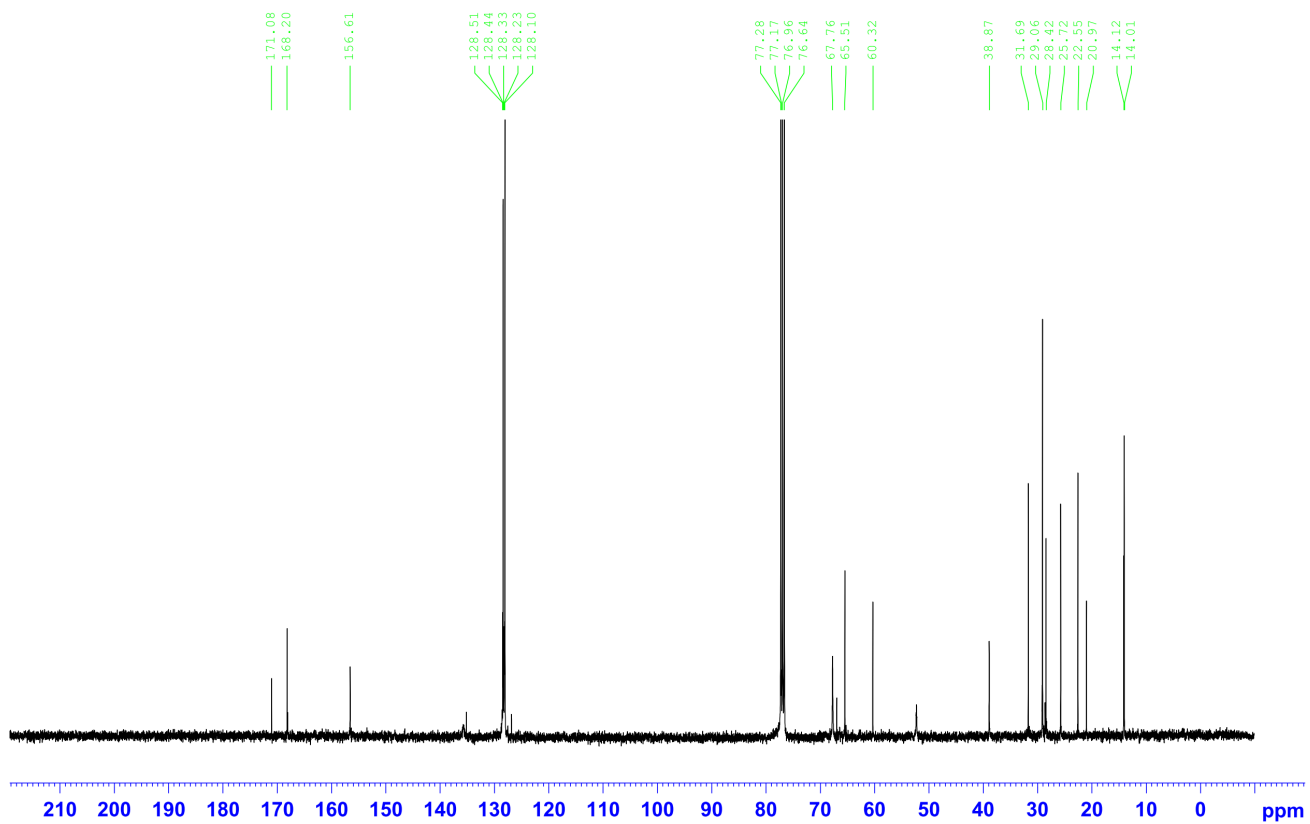


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 3 (<sup>1</sup>H NMR)

Compound **3d**



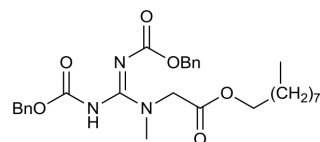
MW : 511



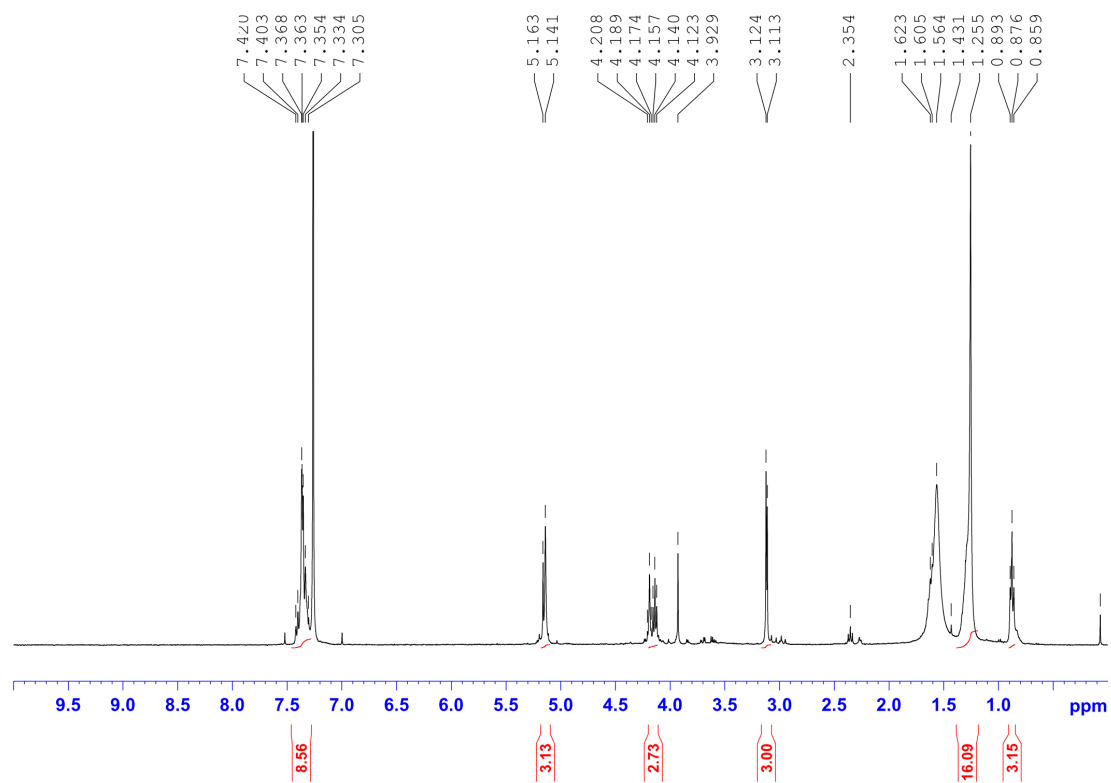
Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 3 (<sup>13</sup>C NMR)



Compound **3e**

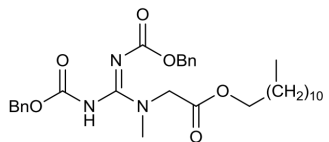


MW : 525

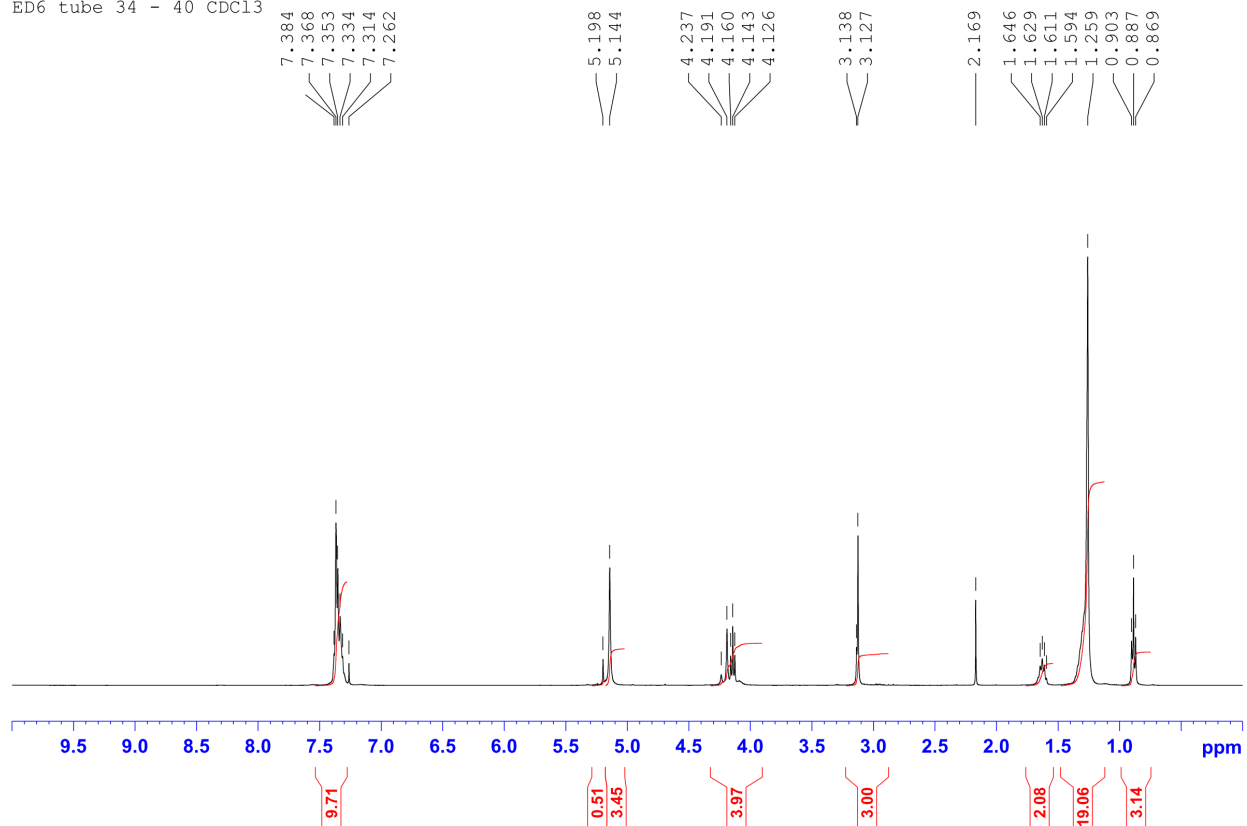


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 4

**Compound 3f**

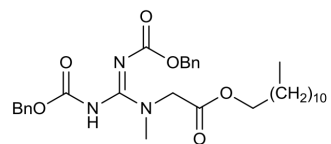


ED6 tube 34 - 40 CDCl<sub>3</sub>

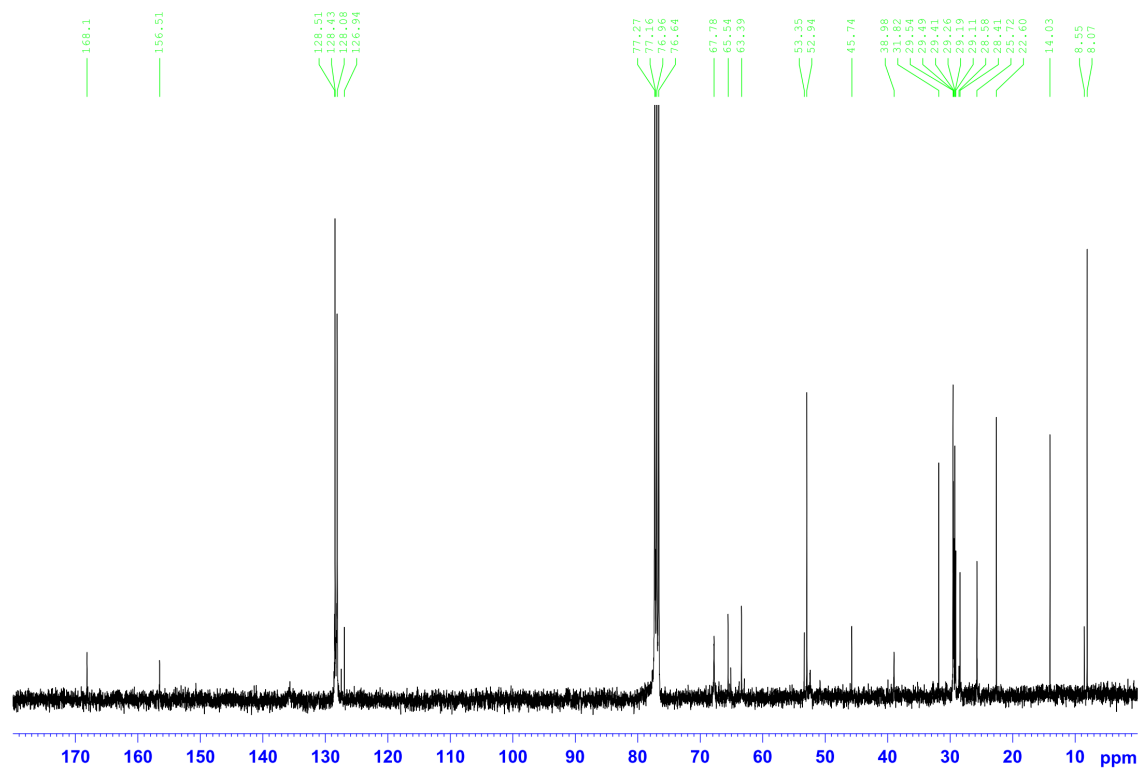


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 5 (<sup>1</sup>H NMR)

Compound **3f**

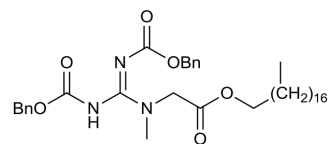


MW : 566

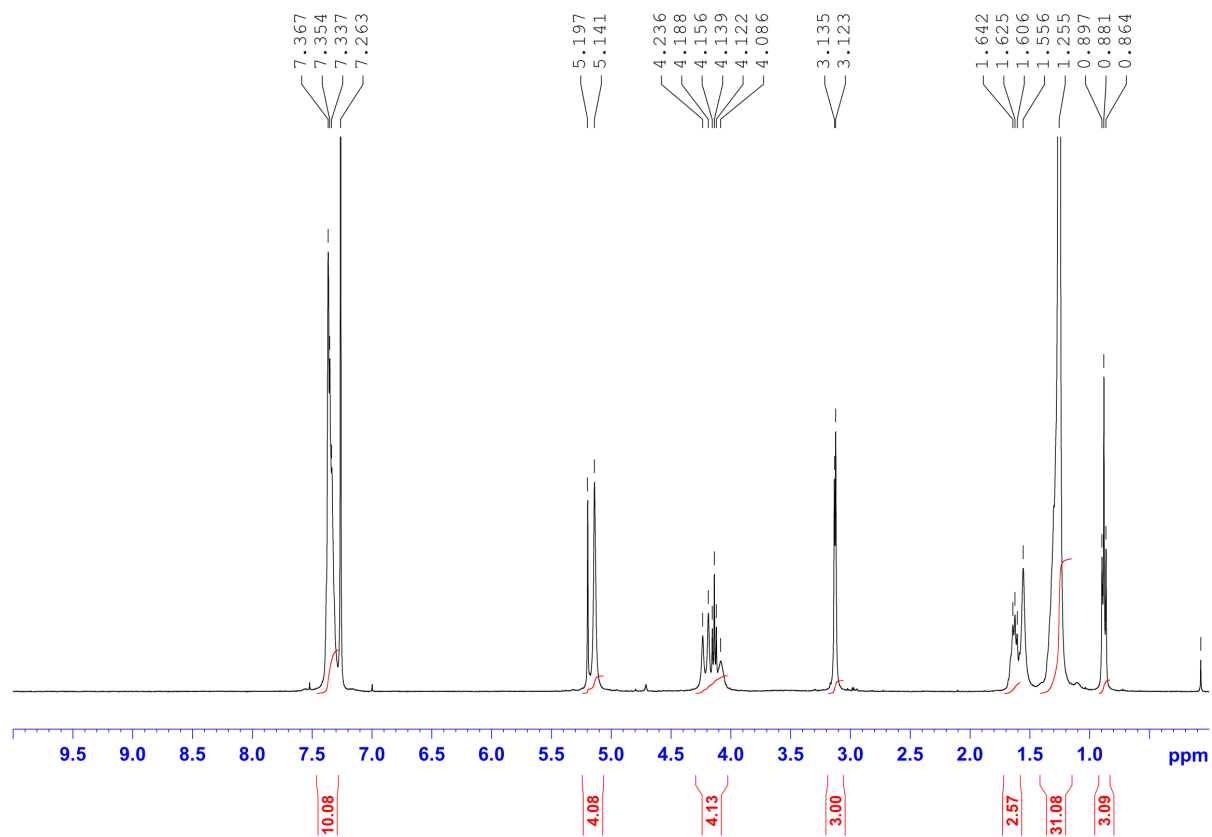


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 5 ( $^{13}\text{C}$  NMR)

Compound **3h**

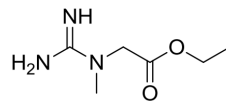


MW : 651

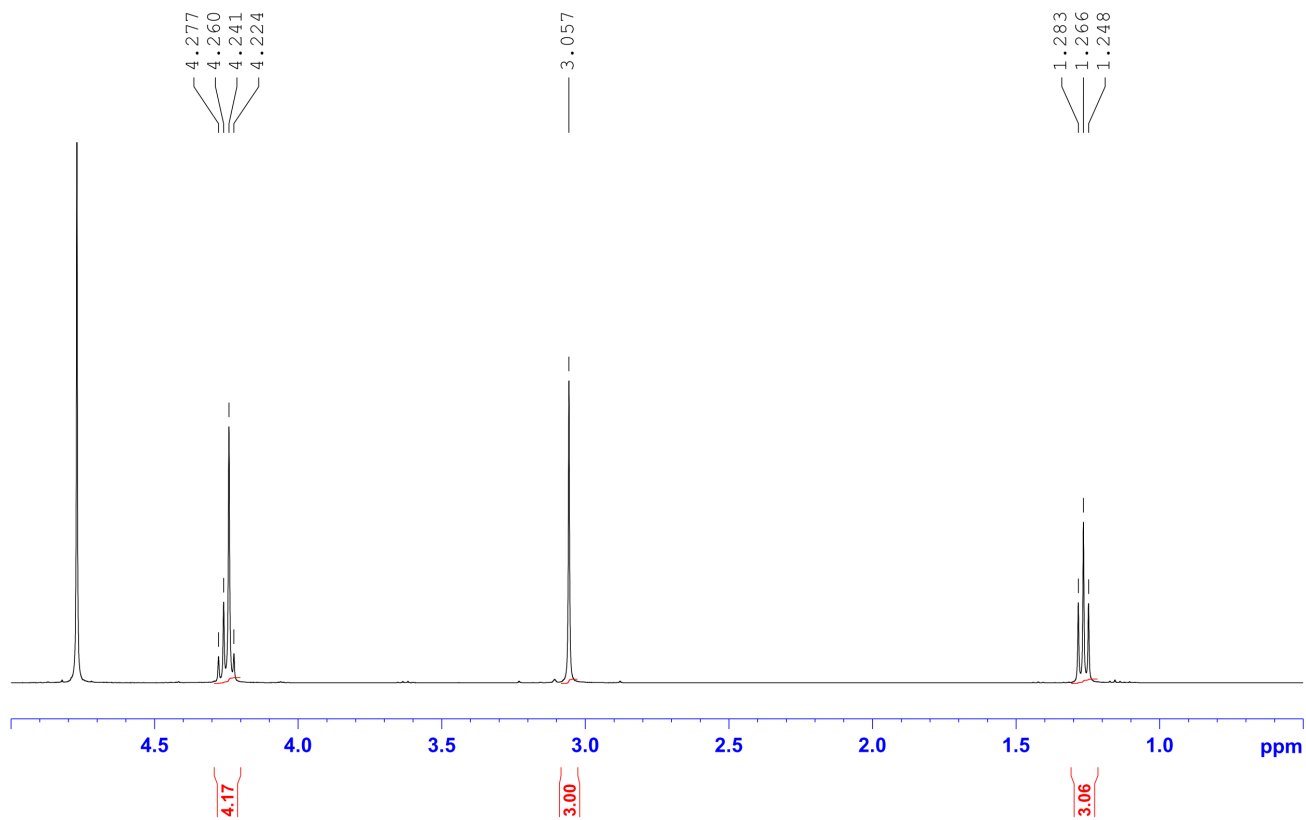


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 6

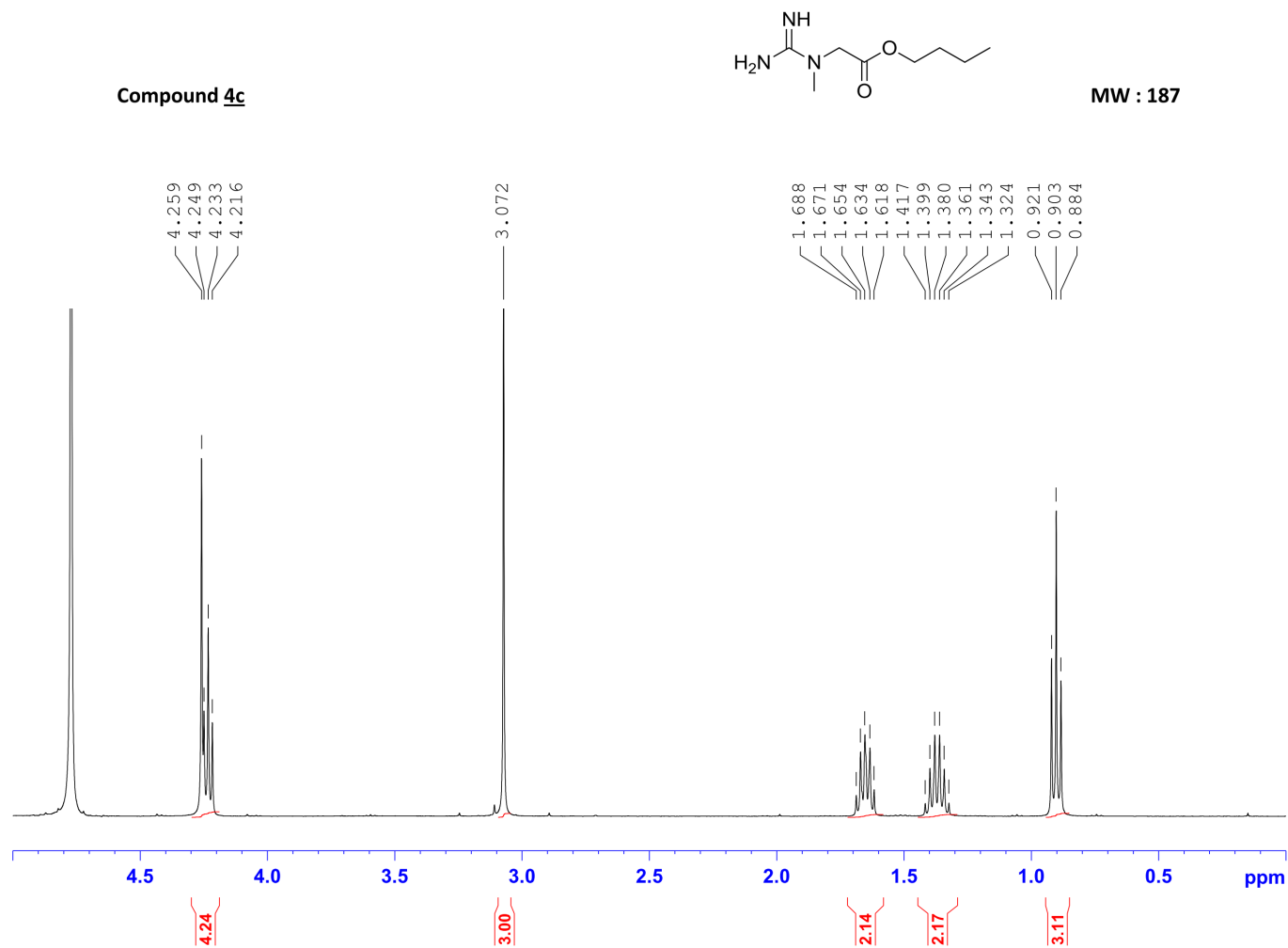
Compound **4b**



MW : 159

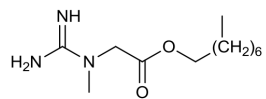


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 7

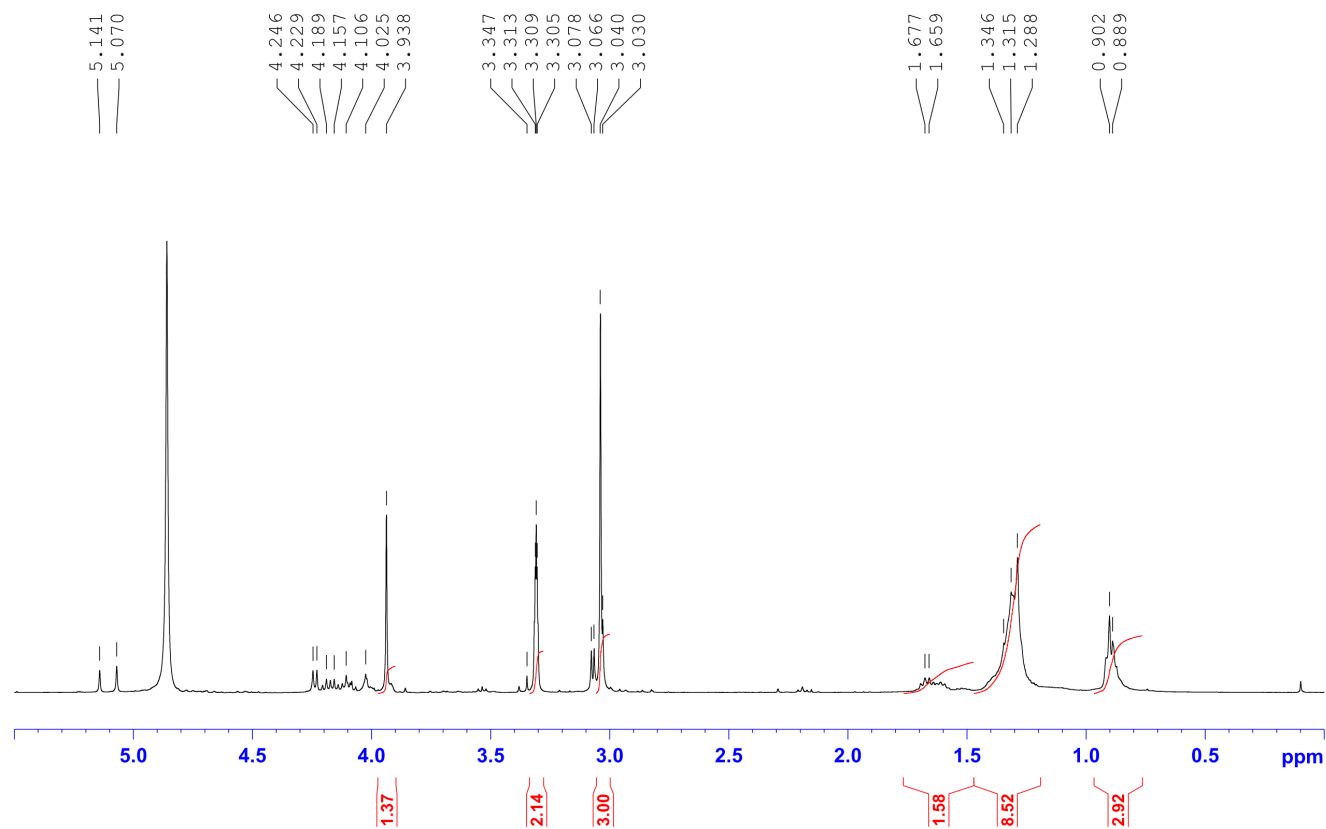


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 8

Compound **4d**

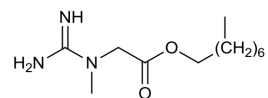


MW : 244

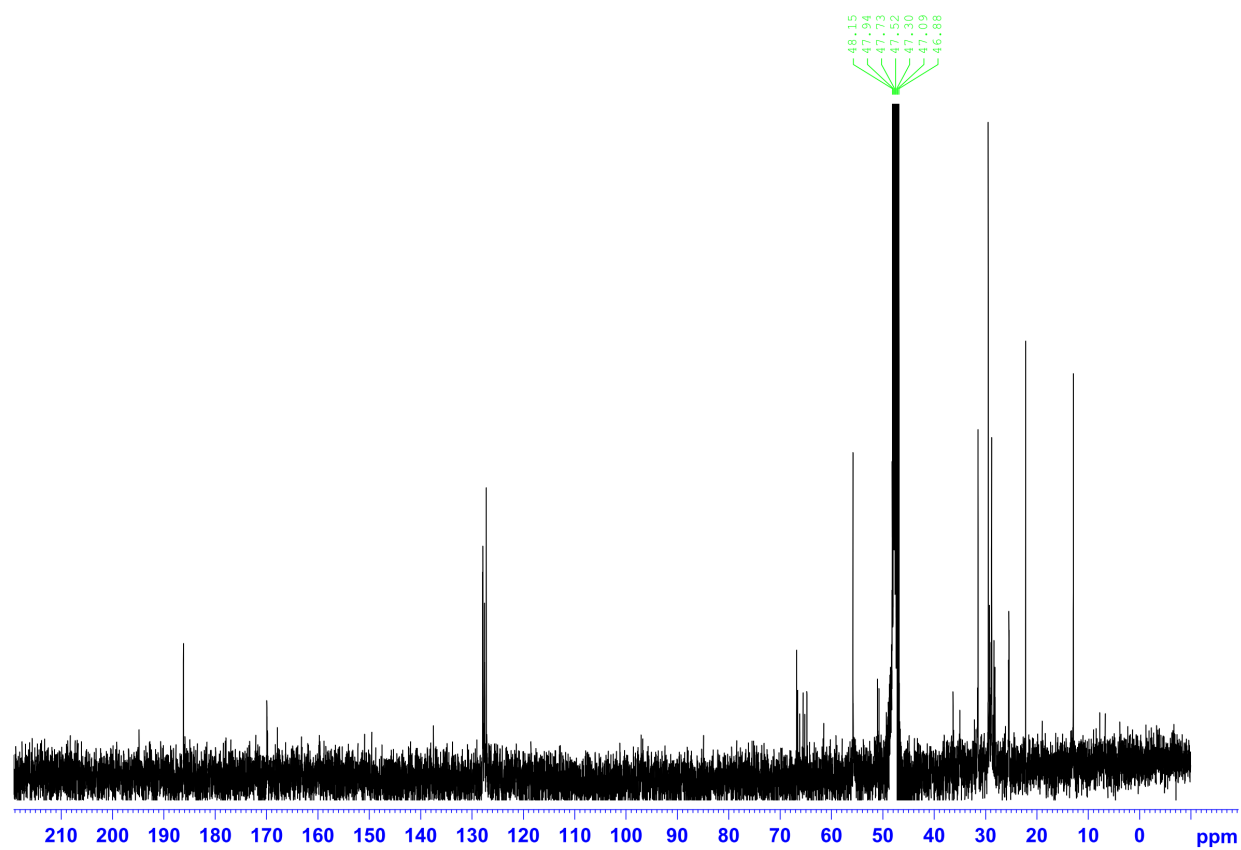


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 9 (<sup>1</sup>H NMR)

Compound **4d**



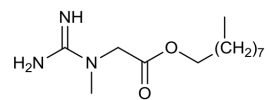
MW : 244



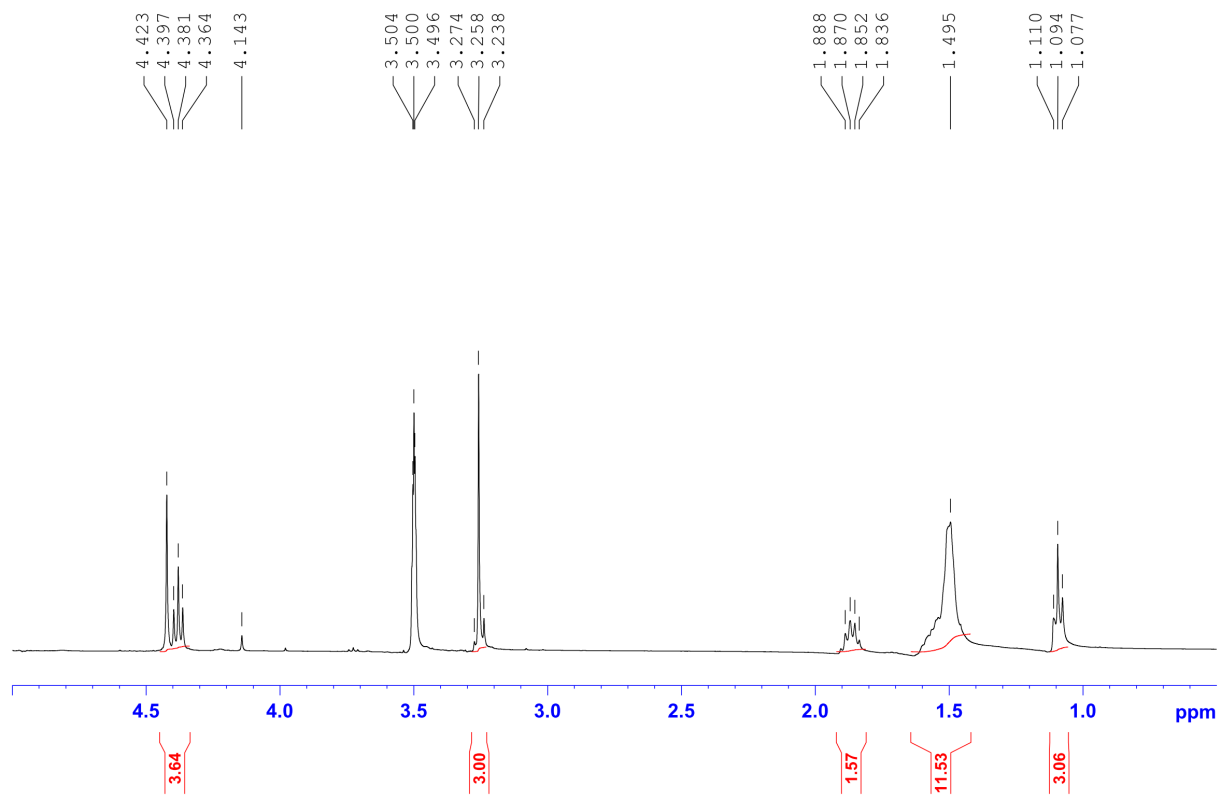
Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 9 (<sup>13</sup>C NMR)



Compound **4e**

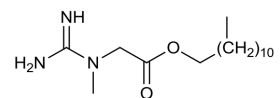


MW : 258

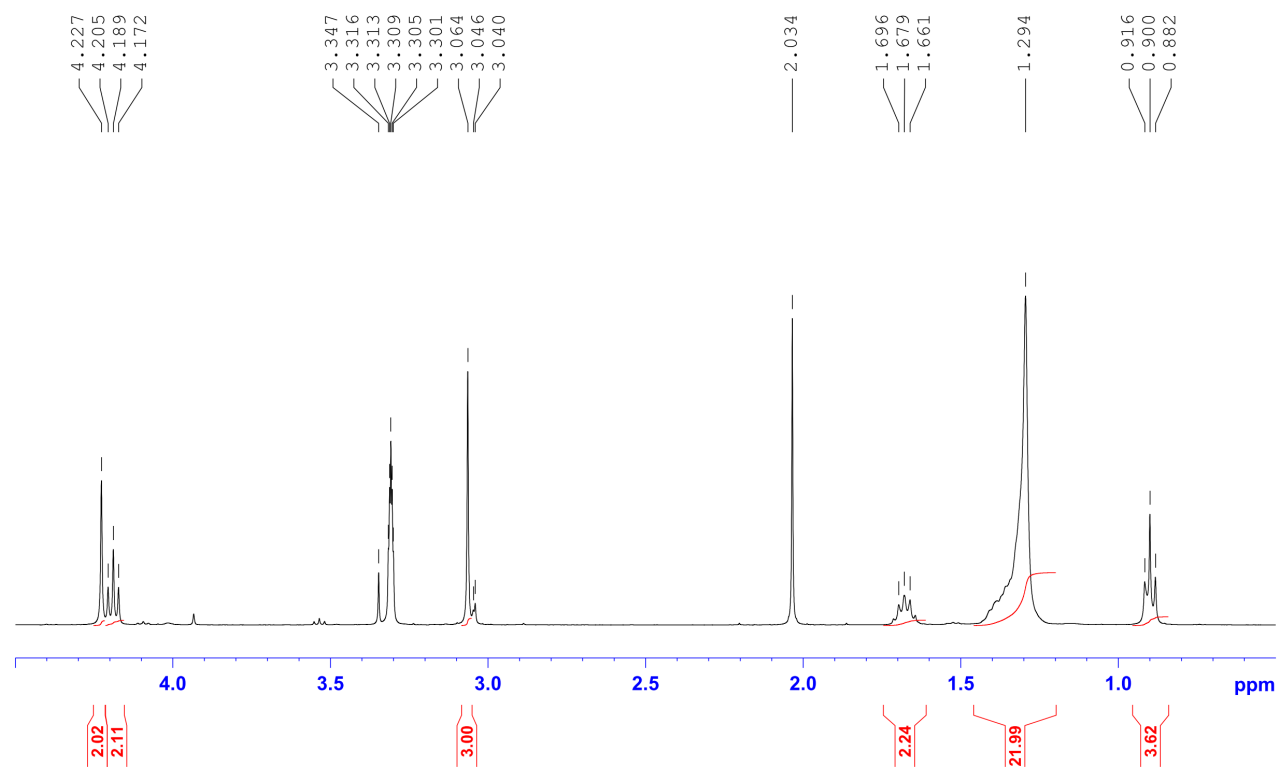


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 10 ( $^1\text{H}$  NMR)

Compound **4f**

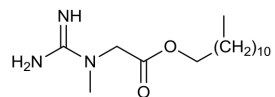


MW : 300

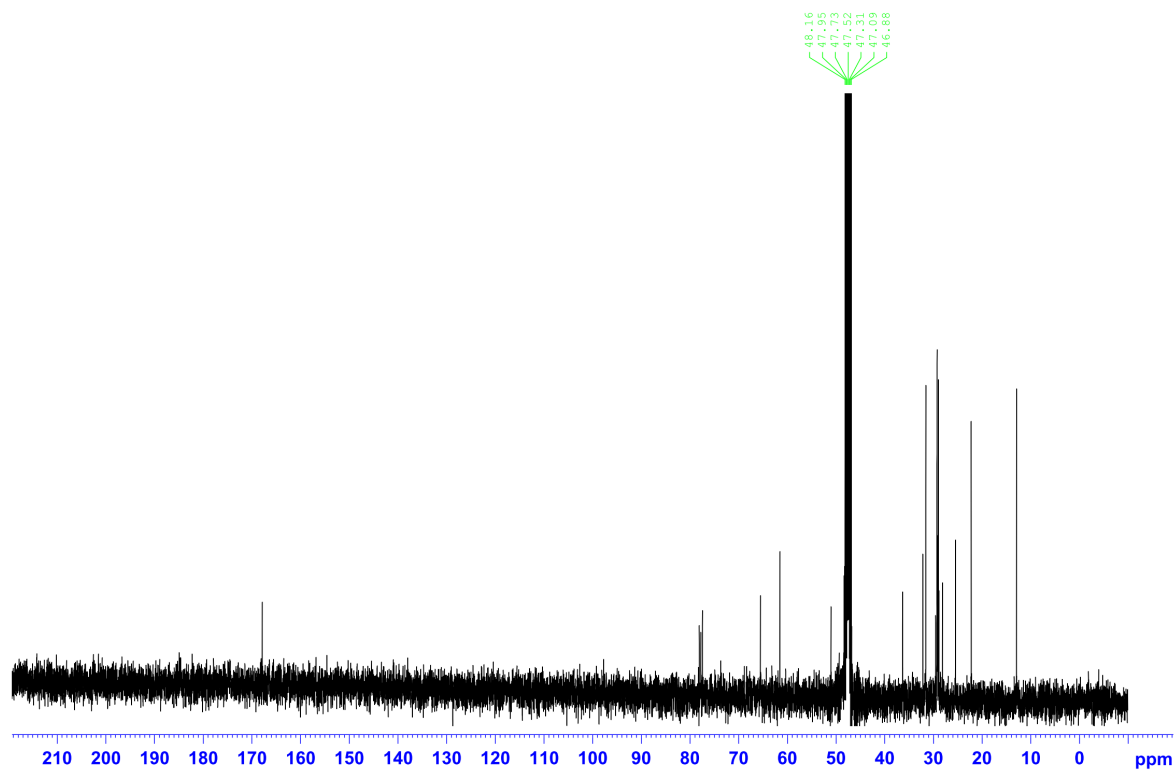


Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 11 ( $^1\text{H}$  NMR)

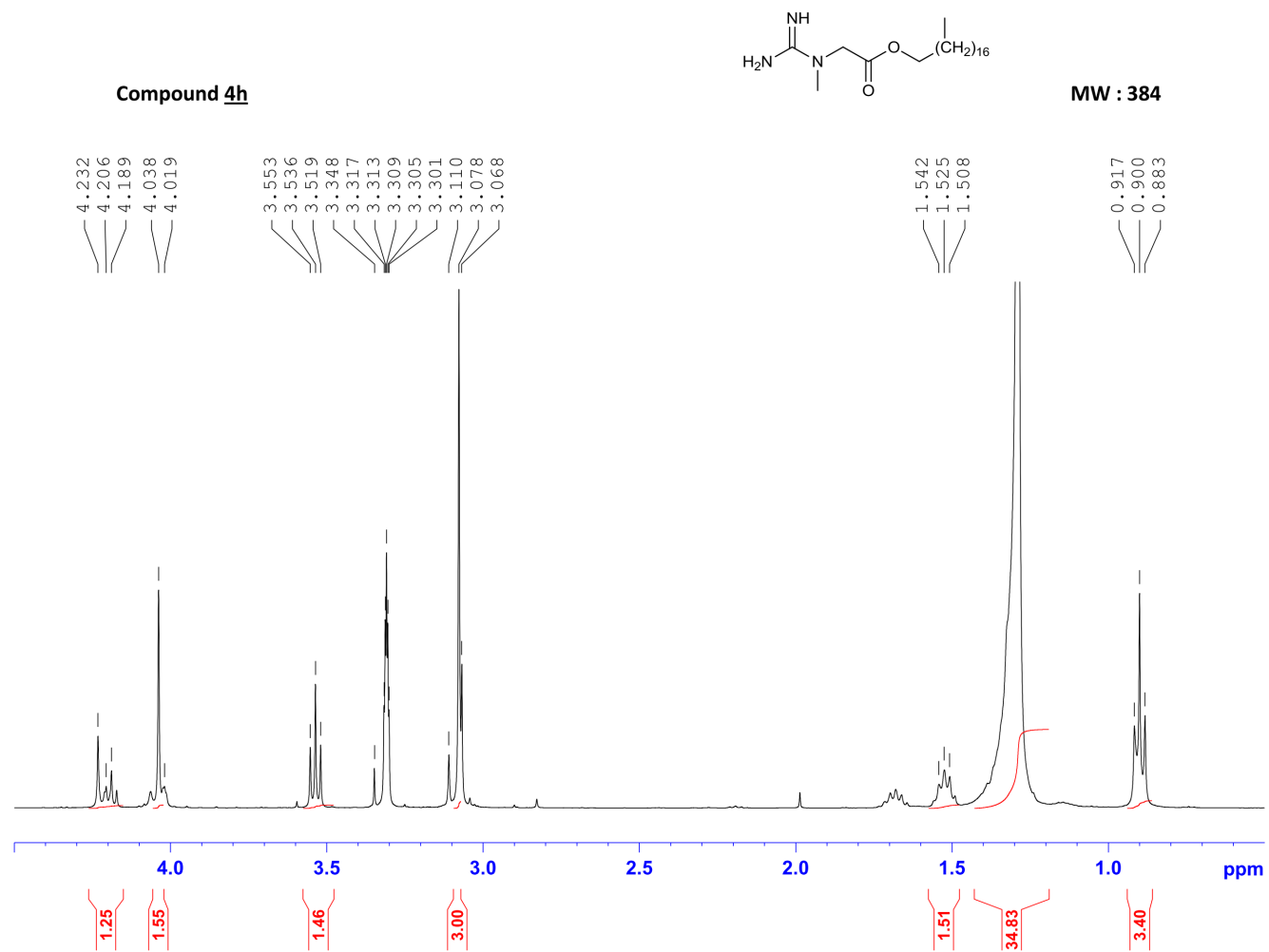
Compound **4f**



MW : 300



Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 11 ( $^{13}\text{C}$  NMR)



Trotier-Faurion et al., Suppl Figure 12



***PARTIE 2***

***NANOCAPSULES LIPIDIQUES***

***POUR LA FORMULATION DE L'ESTER***

***DODECYLIQUE DE CREATINE***

---



## 4.6 Caractérisation des Nanocapsules Lipidiques (NCL)

### 4.6.1 Description des NCL

#### 4.6.1.1 Sur le plan physico-chimique

Trois familles de Nanocapsules Lipidiques (NCL) ont été préparées : des NCL chargées en fluorophore DiD (NCL-DiD), chargées en amiodarone (NCL-amiodarone) et chargées en ester dodécylrique de créatine (NCL-C12) (cf Méthodes expérimentales §3.3.2). Pour les deux premières familles, trois formulations ont été déclinées : la forme non greffée (NCL) et les formes greffées avec le poly-éthylène glycol et l'insuline : PegOMe et PegIns (cf Méthodes expérimentales §3.3.1).

Les lots de NCL produits ont été caractérisés suivant les méthodes indiquées dans Méthodes expérimentales §3.3.3.1. Les Tableaux 20 à 22 présentent les propriétés physico-chimiques pour chaque type de formulation (DiD, amiodarone et ester dodécylrique de créatine) en termes de taille, d'indice de polydispersité, de potentiel zéta et de concentration en nanoparticules.

	[LNC] (mg/ml)	Taille (nm)	Pdl	Potentiel Zéta (mV)
NCL	207.0 ± 0.00	53.8 ± 0.62	0.081 ± 0.02	-6.3 ± 1.56
NCL PegOMe	23.0 ± 4.70	78.0 ± 10.7	0.104 ± 0.02	-36.4 ± 12.4
NCL PegIns	25.4 ± 4.29	131.4 ± 17.0	0.203 ± 0.00	-35.1 ± 2.83

**Tableau 20 : Caractéristiques des NCL chargées en DiD (NCL-DiD)**

*Charge théorique en DiD : 0.6 mg (N=2) ; [LNC] : concentration théorique en NCL ; Taille : diamètre ; Pdl : indice de polydispersité ; potentiel zéta : charge de surface des NCL*

	[LNC] (mg/ml)	Taille (nm)	Pdl	Potentiel zéta (mV)
NCL	203.8 ± 0.00	54.9 ± 1.86	0.042 ± 0.01	-8.3 ± 1.04
NCL-PegOMe	39.8 ± 7.51	68.9 ± 3.97	0.073 ± 0.02	-23.2 ± 6.69
NCL-PegIns	20.9 ± 4.45	87.7 ± 2.53	0.141 ± 0.03	-36.3 ± 10.9

**Tableau 21 : Caractéristiques des NCL chargées en amiodarone (NCL-amiodarone)**

*Charge théorique en amiodarone 2 mg/ml (N=4) ; [LNC] : concentration théorique en NCL ; Taille : diamètre ; Pdl : indice de polydispersité ; potentiel zéta : charge de surface des NCL*



	Concentration théorique en NCL (mg/ml)	Taille (nm)	Pdl	Potentiel Zéta (mV)
NCL-C12	260	48.31 ± 1.77	0.07 ± 0.01	-0.17

**Tableau 22 : Caractéristiques des NCL chargées en ester dodécylque de créatine (NCL-C12)**

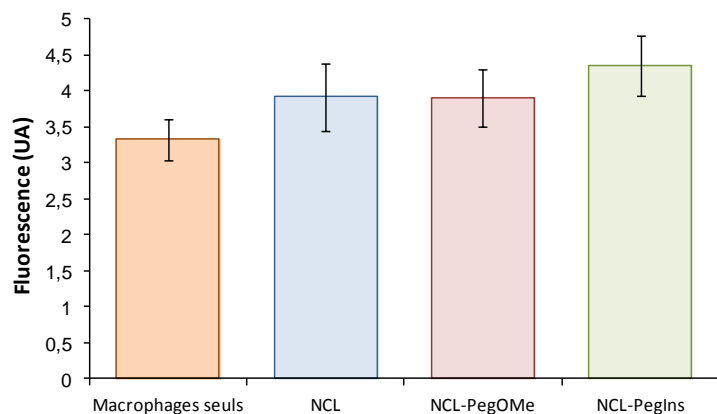
Charge théorique en ester dodécylque : 300 µg/ml (N=2) ; [LNC] : concentration théorique en NCL ; Taille : diamètre ; Pdl : indice de polydispersité ; potentiel zéta : charge de surface des NCL

#### 4.6.1.2 Détection d'une éventuelle réponse immunitaire inappropriée

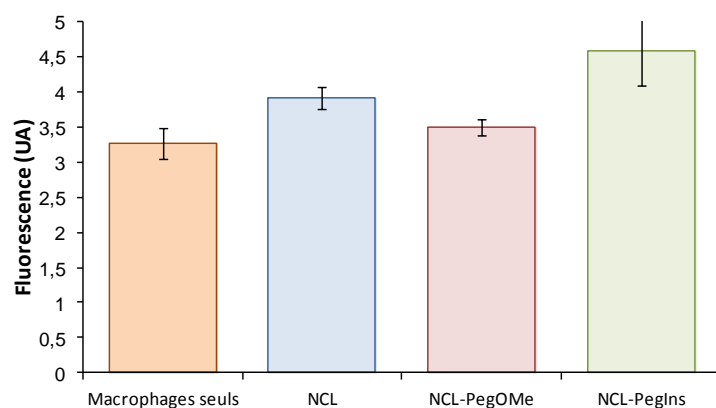
##### ❖ Capture macrophagique (cf Méthodes expérimentales §3.3.3.2)

La fluorescence obtenue pour une suspension de macrophages ne varie pas en présence de NCL (Figure 70 A), ce qui signifie que les NCL n'ont pas été captées par les macrophages. Il n'y a pas de différence entre une incubation à 37°C et une incubation à +4°C. Les 3 formulations NCL, NCL-PegOMe et NCL-PegIns ne sont pas capturées par les macrophages.

A :



B :



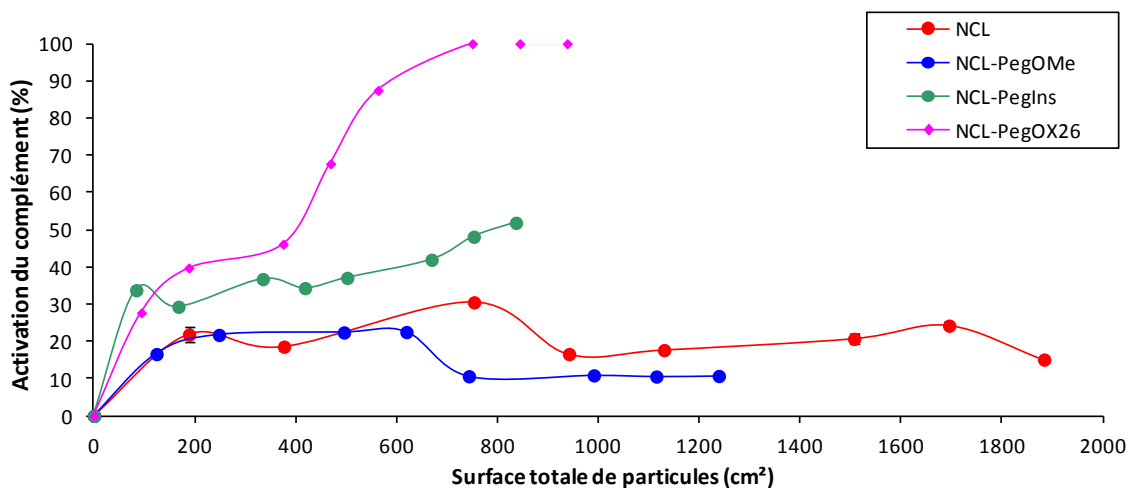
**Figure 70 : Absence de capture macrophagique des NCL**

Le signal de fluorescence détecté par cytométrie de flux dans des suspensions de macrophages est évalué après l'incubation des macrophages avec 1.5 mg/ml de formulation NCL (NCL, NCL-PegOMe, NCL-PegIns) à la température d'incubation = 37°C (A) ou +4°C (B,) suivie d'un lavage pour éliminer les NCL. On compare ce signal à l'autofluorescence des macrophages seuls. Si les macrophages ont capté les NCL, le signal de fluorescence sera augmenté.

## ❖ Activation du système du complément (cf Méthodes expérimentales §3.3.3.2)

La Figure 71 présente l'activation des protéines du complément induite par les formulations de NCL en fonction de la surface nanoparticulaire et donc de la concentration de NCL : plus la concentration en NCL augmente et plus la surface totale nanoparticulaire augmente. Dans nos conditions expérimentales, la surface totale nanoparticulaire la plus élevée correspond à une concentration en NCL de 1.56 mg/ml. Cette surface nanoparticulaire varie en fonction des greffages réalisés, ainsi pour une même concentration, la surface des NCL non greffées sera environ deux fois plus importante que celle des NCL prises comme référence portant à leur surface l'anticorps reconnaissant le récepteur à la transferrine (NCL-PegOX26).

Nous montrons que l'activation du complément est comparable lors du greffage des chaînes Peg en surface (courbe bleue) par rapport aux NCL blanches (courbe rouge). On considère alors que la furtivité des NCL est augmentée. Le greffage de protéines à l'extrémité de ces Peg favorise la reconnaissance spécifique par une cible cellulaire mais stimule également la réponse immunitaire. Ainsi les NCL-PegOX26 activent fortement la cascade du complément par la reconnaissance de l'anticorps par le complexe C1 avec un phénomène de saturation à 100% qui indique une réponse immunitaire forte. En revanche, les NCL portant à leur surface la protéine insuline induisent une activation du complément beaucoup plus faible et qui reste inférieure à 50% pour des surfaces totales de particules importantes et donc pour des concentrations en NCL de 1.56 mg/ml. Ces NCL sont exploitables pour une administration *in vivo*.

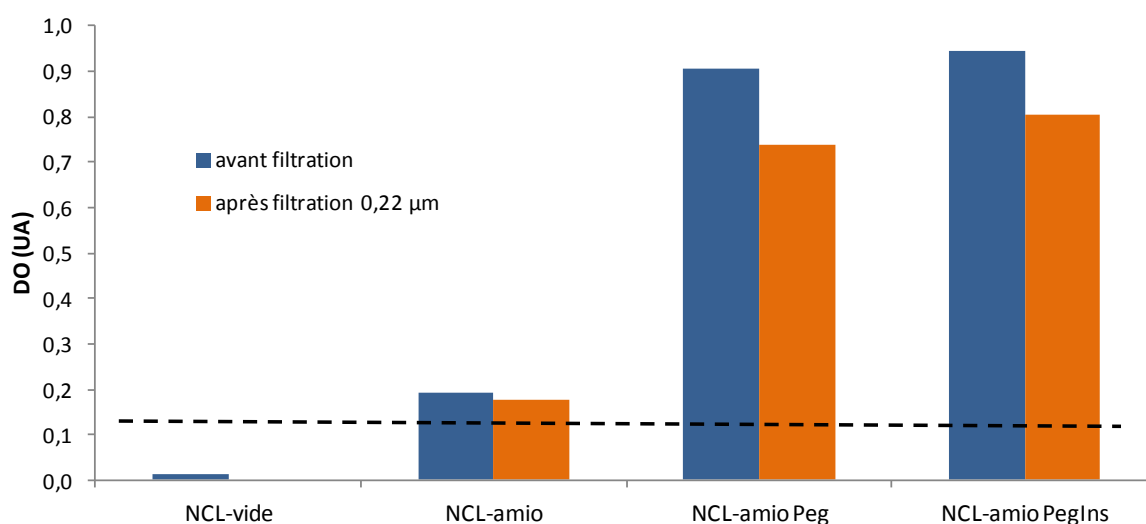


**Figure 71 : Absence d'activation du système du complément**

Activation du complément (en % du contrôle positif) en fonction de la surface totale nanoparticulaire (en cm²).

## ❖ Dosage des endotoxines (cf Méthodes expérimentales §3.3.3.2)

La Figure 72 montre la quantité d'endotoxine détectée dans les formulations de NCL-amiodarone déterminée par le test Limulus Amebocyte Lysate. La valeur de référence (ligne pointillée) correspond à l'absorbance obtenue pour le milieu de culture utilisé. Nous constatons qu'il n'y a pas d'endotoxines présentes dans les NCL vides et les NCL chargées en amiodarone. En revanche, le signal augmente lorsqu'on considère les NCL-Peg et les NCL-PegIns. Les endotoxines semblent être apportées par les préparations de poly-éthylène glycol et d'insuline. Toutefois, la quantification du signal équivalent en endotoxines du lipopolysaccharide bactérien d'*Escherichia coli* selon la même technique indique que les valeurs obtenues pour les NCL-amio Peg et les NCL-amio PegIns correspondent à une concentration de 1 ng/ml de LPS, présentée dans la littérature comme n'induisant pas de rupture de l'intégrité de la BHE *in vitro* ou *in vivo*.



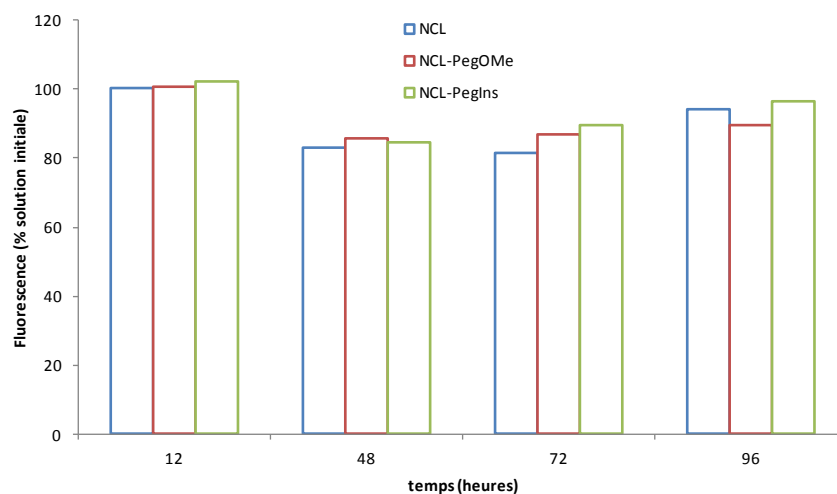
**Figure 72 : Détection des endotoxines dans les préparations de NCL**

Absorbance de la *p*-nitroaniline en densité optique (DO) en fonction des formulations de NCL avant (histogrammes bleus) et après (histogrammes oranges) filtration sur une membrane de porosité 0.2 µm.

#### 4.6.2 Stabilité des NCL

Nous avons évalué la stabilité des NCL afin de vérifier qu'il n'y avait pas de dégradation des systèmes nanoparticulaires au cours des expérimentations. Les NCL chargées en fluorochrome lipidique (DiD) nous ont permis de montrer que l'intensité de fluorescence ne variait pas de plus de 20% par rapport

au signal initial, quel que soit le greffage de surface (Figure 73). Les NCL sont stables pendant un stockage d'au moins 100 heures à +4°C.

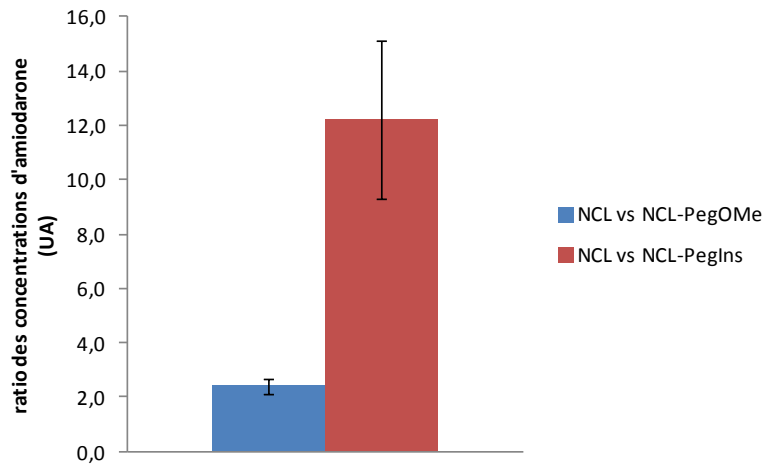


**Figure 73 : Stabilité des NCL lors d'une conservation à + 4°C**

*Abscisse : temps ; Ordonnée : % de la fluorescence au temps initial*

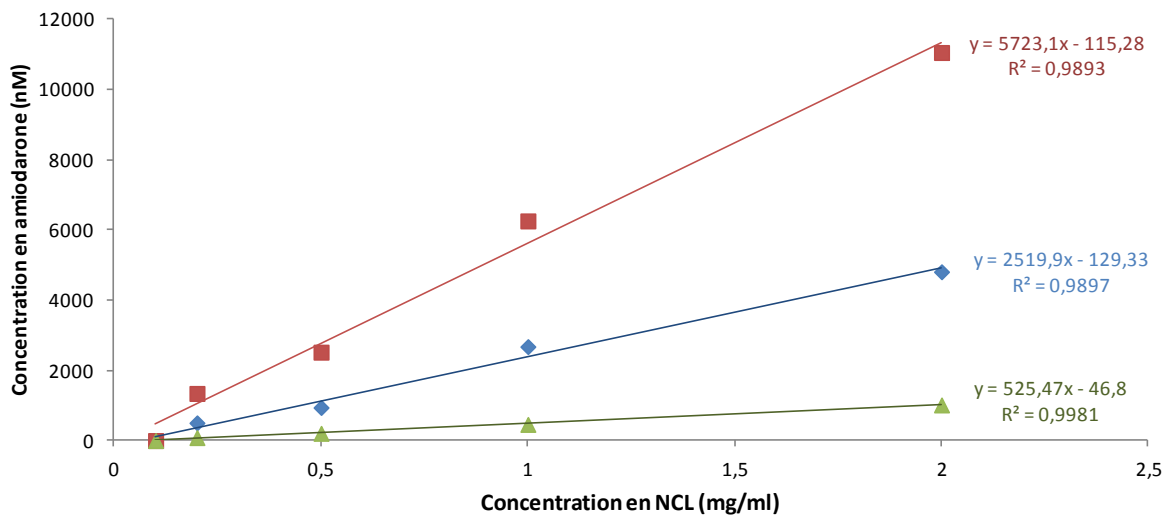
### 4.6.3 Impact des post-insertions sur la quantité de molécule encapsulée

La post-insertion réalisée pour le greffage des chaînes Peg conduit à une perte d'un facteur 2 de la concentration d'amiodarone détectée et l'ajout des liaisons covalentes avec l'insuline un facteur 12 en moyenne (Figure 74). Cela conduit donc à des concentrations en amiodarone variables en fonction des préparations. Ce phénomène s'explique par la localisation de l'amiodarone dans la structure nanoparticulaire. En effet, il semble que cette molécule soit dans la membrane des nanoparticules et non pas dans le cœur lipidique<sup>267</sup>. Or, lors des post-insertions la membrane lipidique est déstabilisée, ce qui peut conduire à des fuites de la molécule intégrée dans la structure. Ces post-insertions font donc varier le taux de charge, c'est-à-dire la concentration en amiodarone. Les concentrations d'amiodarone sont cependant linéaires avec la concentration en nanocapsules, indiquant que l'amiodarone est bien toujours associé aux NCL (Figure 75). L'amiodarone n'étant pas soluble dans l'eau, il forme des agrégats qui sont éliminés lors des purifications des formulations.



**Figure 74 : Perte du composé encapsulé en fonction des post-insertions réalisée sur la structure des NCL**

Ratio des concentrations d'amiodarone quantifiées pour les NCL versus les NCL-PegOMe (histogramme bleu) et pour les NCL versus les NCL-PegIns (histogramme rouge). Plus la valeur est élevée et plus l'amiodarone a été extrait des NCL.



**Figure 75 : Linéarité de la relation entre la quantité d'amiodarone détectée et la concentration en NCL**

Quantification des concentrations en amiodarone (exprimées nM) en fonction des concentrations en NCL (exprimées en mg/ml) pour les NCL (rouge), NCL-Peg (bleu) et NCL-PegIns (vert).

## 4.6.4 Efficacité de la lyse des NCL

### 4.6.4.1 Dans des échantillons de NCL en solution aqueuse

La lyse la plus efficace des NCL est réalisée dans 1/5<sup>ème</sup> méthanol (MeOH). Nos données indiquent qu'il n'y a pas de différence entre ce protocole et une lyse réalisée au 1/5<sup>ème</sup> dans l'acétonitrile (ACN) lorsque les NCL sont en solution dans un tampon aqueux (Figure 76).

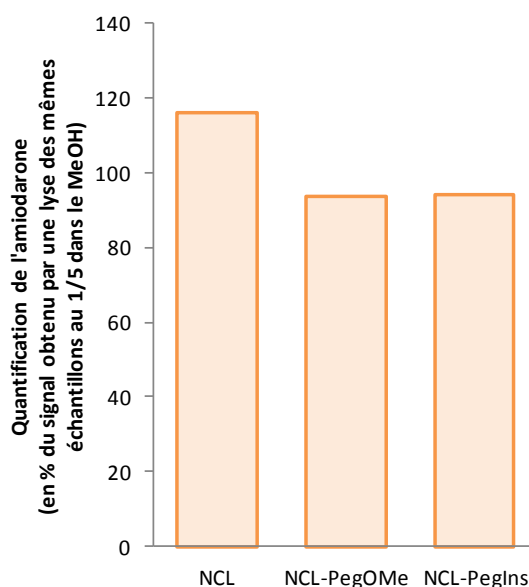


Figure 76 : Efficacité de la lyse des 3 types de NCL au 1/5<sup>ème</sup> dans l'acétonitrile

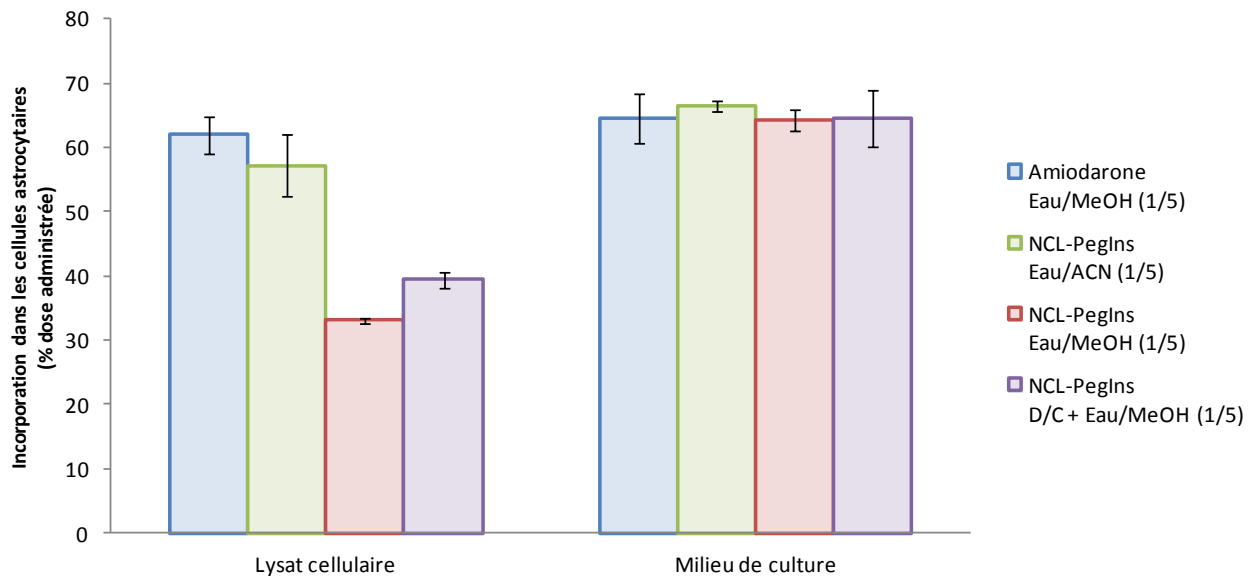
*Quantification de l'amiodarone exprimée en % du signal obtenu par une lyse des formulations NCL-amiodarone, NCL-amiodarone PegOMe et NCL-amiodarone PegIns au 1/5<sup>ème</sup> dans l'acétonitrile par rapport au 1/5<sup>ème</sup> dans le méthanol*

### 4.6.4.2 Dans des échantillons de NCL internalisés dans les cellules

La Figure 77 présente l'efficacité de la lyse conjointe des cellules et des NCL de 3 protocoles différents : 1/5<sup>ème</sup> méthanol ; 1/5<sup>ème</sup> acétonitrile et un cycle de congélation/décongélation suivi d'une lyse au 1/5<sup>ème</sup> méthanol.

Lorsque les cellules incubées avec les NCL-PegIns sont lysées par le protocole 1/5<sup>ème</sup> acétonitrile, nous obtenons un pourcentage d'internalisation de 57% de la dose initiale. En revanche, la lyse par 1/5<sup>ème</sup> eau/méthanol conduit à un résultat 2 fois inférieur à celui obtenu pour la lyse à l'acétonitrile, indiquant que la lyse des NCL ou des cellules est probablement incomplète. Enfin, la lyse cellulaire

peut être légèrement améliorée par un cycle de congélation/décongélation (C/D) puisqu'on observe une perte de moins de 20% du signal par rapport à la condition 1/5<sup>ème</sup> acétonitrile. A titre de comparaison, l'amiodarone en solution dans le tampon à la même concentration (55.5 nM pour 68.5 nM détectées dans les NCL-PegIns) conduit à une internalisation de 62% de la dose initiale en 24 heures dans des cellules astrocytaires. Il semble donc que la lyse dans 1/5<sup>ème</sup> eau/méthanol soit moins efficace que dans l'acétonitrile. Cette observation est spécifique à la lyse cellulaire : lorsqu'on dose l'amiodarone dans les surnageants, c'est-à-dire dans le milieu de culture, aucune différence n'est observée en fonction des conditions de lyse. Le méthanol est connu pour ses propriétés de fixation des cellules. Ceci gêne donc probablement la dégradation des membranes et empêche la libération de l'amiodarone en solution organique.



**Figure 77 : Comparaison de 3 protocoles de lyse des NCL internalisées dans les cellules gliales après 24 h d'incubation d'une solution de 0.1 mg/ml de NCL-PegIns ou de 55.5 nM d'amiodarone en solution**

## 4.7 Passage de la BHE par les NCL-amiodarone et translocation dans le parenchyme cérébral

### 4.7.1 Passage de la BHE

Le passage de la BHE par les NCL *in vitro* montre (Figure 78) que les NCL-amiodarone sont internalisées dans les cellules endothéliales de la BHE. On note une augmentation de cette capture endothéliale au cours des premières 24h qui se stabilise ensuite à un niveau oscillant entre 30 et 40% de la dose administrée, ceci étant corrélé à une diminution de la quantité de NCL-amiodarone dans le compartiment apical. Aux temps 4 et 24h, nous notons une augmentation significative de l'internalisation des NCL-PegOMe et NCL-PegIns par comparaison aux NCL (Figure 79). La différence n'est cependant plus détectable au-delà de 24h. L'incubation avec une concentration 5 fois supérieure (à 0.5 mg/ml) montre une internalisation beaucoup moins favorable pour les NCL et le pourcentage de la dose initiale retrouvée dans le compartiment « cellules endothéliales » atteint à peine 10% en 24h (à 0.1 mg/ml, il était de 25%). Les formulations NCL-PegOMe et NCL-PegIns à la concentration de 0.5 mg/ml sont deux fois moins internalisées au temps 4h qu'avec la formulation à 0.1 mg/ml. Mais la différence s'atténue avec la durée de l'incubation puisqu'à 24h, nous détectons 40% de la dose initiale dans les cellules endothéliales, ce qui est comparable au profil obtenu pour la concentration 0.1 mg/ml.

Lorsqu'on incube l'amiodarone sans les NCL, nous observons également une internalisation de la molécule dans les cellules endothéliales (Figure 80). A la concentration de 0.05  $\mu$ M, l'internalisation de la molécule correspond à 40% de la dose initiale et elle est réduite d'un facteur 2 pour une concentration 20 fois supérieure (1  $\mu$ M). En revanche, aucune différence n'a pu être détectée en fonction du temps. La cinétique d'internalisation de l'amiodarone dans les cellules endothéliales diffère donc lorsqu'elle est encapsulée dans les NCL.



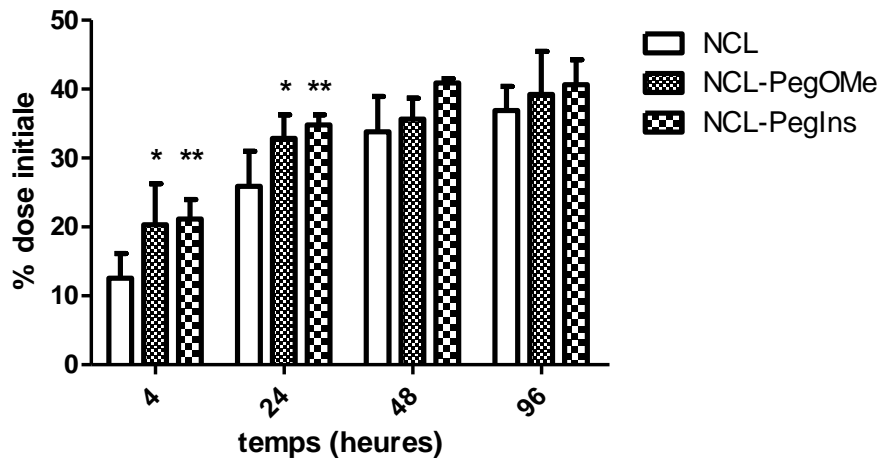


Figure 78 : Internalisation de 0.1 mg/ml de NCL chargée en amiodarone dans les cellules endothéliales du modèle *in vitro* de BHE

Quantité d'amiodarone associée aux cellules endothéliales exprimée en % de la dose initiale en fonction du temps pour 3 formulations NCL-amiodarone, NCL-amiodarone-PegOMe et NCL-amiodarone-PegIns. \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (two-way ANOVA)

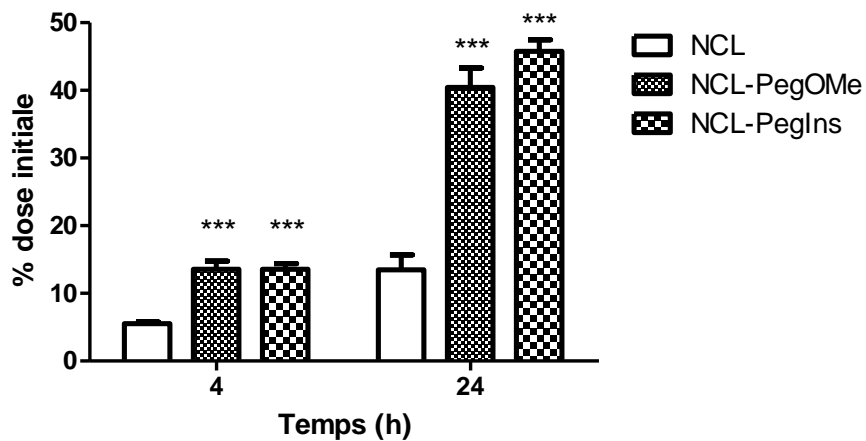
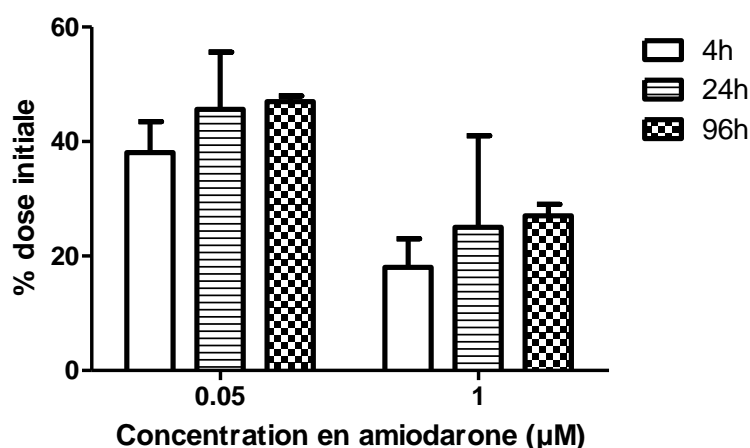


Figure 79 : Internalisation de 0.5 mg/ml de NCL chargée en amiodarone dans les cellules endothéliales du modèle *in vitro* de BHE

Légende : cf Figure 78. \*\*\* :  $p < 0.001$  (two-way ANOVA)



**Figure 80 : Internalisation de 0.05 et 1 µM d'amiodarone seule dans les cellules endothéliales du modèle *in vitro* de BHE**

*Quantité d'amiodarone associée aux cellules endothéliales exprimée en % de la dose initiale en fonction des concentrations en amiodarone pour les 3 temps testés : 4, 24 et 96h*

#### 4.7.2 Translocation dans le parenchyme cérébral

Cette internalisation endothéliale est associée à une translocation cérébrale puisque nous détectons de l'amiodarone dans les cellules astrocytaires présentes au fond des puits de culture (Figure 81). Quoique non significative, nous notons une tendance à l'augmentation au cours du temps sans différence en fonction du type de NCL considéré, atteignant 10% de la dose initiale après 48h d'incubation.

Par ailleurs, l'augmentation d'un facteur 5 de la concentration en NCL ne conduit pas à une augmentation du signal d'amiodarone détecté dans les cellules gliales (Figure 82). Ceci serait en faveur de l'hypothèse d'une ouverture des NCL dans les cellules endothéliales et d'un transport de l'amiodarone dans le parenchyme cérébral. D'autant plus que le même profil est retrouvé lors de l'incubation de l'amiodarone seule : quelles que soient les concentrations d'amiodarone ou les durées d'incubation, le pourcentage d'internalisation ne dépasse pas 10% en moyenne (Figure 83).

Toutefois, il est intéressant de noter que le profil de libération de l'amiodarone des NCL retarde sa détection au niveau maximal de 10% dans les cellules astrocytaires. Bien que l'on observe un retard dans la libération (probablement due à la dégradation de la nanoparticule dans les cellules

endothéliales), cette différence dans la cinétique de translocation valide l'approche par vectorisation particulière. En effet, cela aboutit *in fine* à la même quantité de produit libéré dans les cellules.

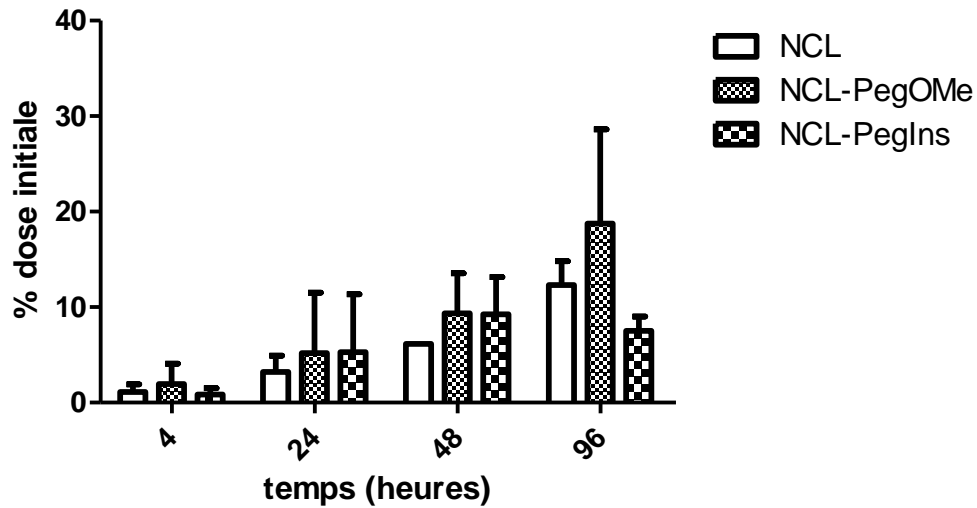


Figure 81 : Internalisation de 0.1 mg/ml de NCL chargées en amiodarone dans les cellules gliales du modèle *in vitro* de BHE après translocation à travers la monocouche endothéliale

Quantité d'amiodarone associée aux cellules gliales exprimée en % de la dose initiale en fonction du temps pour 3 formulations NCL-amiodarone, NCL-amiodarone-PegOMe et NCL-amiodarone-PegIns

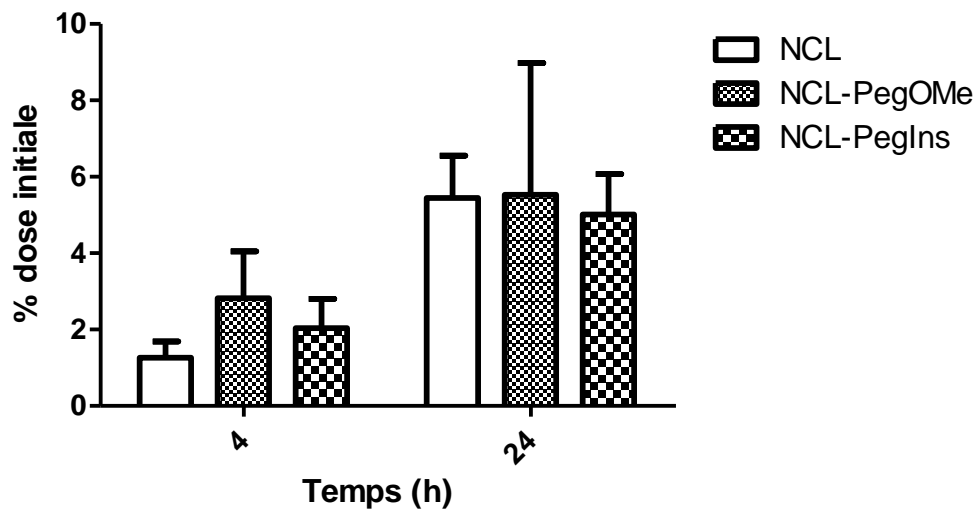
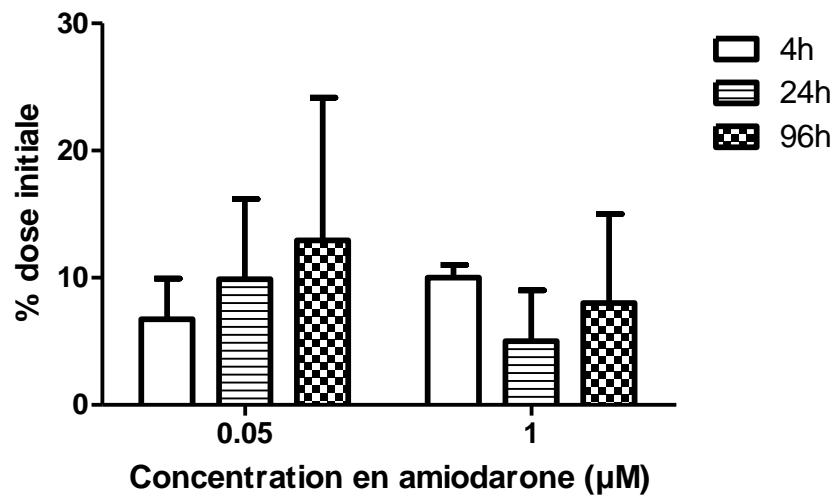


Figure 82 : Internalisation de 0.5 mg/ml de NCL chargées en amiodarone dans les cellules gliales après translocation à travers la monocouche endothéliale

Légende : cf Figure 81



**Figure 83 : Internalisation de 0.05 et 1  $\mu\text{M}$  d'amiodarone dans les cellules gliales après translocation à travers la monocouche endothéliale**

*Quantité d'amiodarone associée aux cellules gliales exprimée en % de la dose initiale en fonction des concentrations en amiodarone pour les 3 temps testés : 4, 24 et 96h*

## 4.8 Passage de la BHE par les NCL chargées en ester dodécylrique de créatine

Les optimisations du protocole de préparation des NCL décrites au §3.3.2.3 (Méthodes expérimentales) ont permis d'inclure l'ester dodécylrique de créatine dans les nanocapsules lipidiques (notées par commodité NCL-C12). Nous avons évalué leurs propriétés pour franchir la BHE. Le Tableau 25 présente les quantifications de l'ester dodécylrique de créatine dans les deux lysats cellulaires (endothélial et glial). Nous montrons que l'ester est quantifiable dans les 2 types de cellules endothéliales et gliales mais la quantité d'ester détecté dans le lysat des cellules gliales est plus élevée que dans les cellules endothéliales. Ce profil diffère de celui qui est obtenu pour le passage du même ester en solution où nous détectons plus d'ester dans le lysat endothélial comparé au lysat glial. Ceci est en faveur d'une hypothèse de translocation des NCL-C12 dans les cellules endothéliales avec libération de l'ester dodécylrique dans le compartiment basolatéral où il peut être capté par les cellules gliales. Il est intéressant de constater qu'il y a une tendance à l'augmentation de la créatine dans les cellules endothéliales, bien que non significative, alors que le contenu glial en créatine n'est pas modifié (Figure 84). De plus, nous ne détectons pas de créatine quantifiable dans les surnageants apicaux et basolatéraux. La cinétique de l'internalisation de l'ester dodécylrique et de sa conversion en créatine est donc modifiée par la présence des NCL. L'absence d'augmentation de créatine dans les surnageants semble indiquer soit que les NCL limitent l'efflux de la créatine dans les surnageants, soit que la libération de créatine est trop faible pour être détectable par nos conditions analytiques.

Cependant, dans le cas où les NCL présentaient la propriété de se transloquer de façon intègre à travers la BHE, nous montrons qu'elles seraient parfaitement à même de pénétrer dans les cellules neuronales (Figure 85 A) et de libérer dans les neurones une quantité croissante d'ester dodécylrique avec l'augmentation de la concentration en NCL-C12, correspondant toujours à 5% de la dose initiale. D'autre part, contrairement à l'ester seul qui conduit à une disparition complète de la créatine dans le compartiment intra-cellulaire, nous montrons que les NCL-C12 retardent cette disparition puisqu'en 60 minutes d'incubation, nous n'observons une diminution que d'un peu plus d'un facteur 2 (Figure 85 B).

concentration en NCL-C12 (mg.mL <sup>-1</sup> )	Cellules endothéliales (BHE) (nmoles/mg protéines)	Cellules gliales (BHE) (nmoles/mg protéines)
2	0.551 ± 0.14	2.550 ± 2.45
5	0.818 ± 0.43	2.262 ± 1.25
10	0.870 ± 0.31	1.394 ± 0.96

Tableau 23 : Quantification de l'ester dodécylque de créatine après internalisation des NCL-C12 dans les cellules endothéliales et gliales

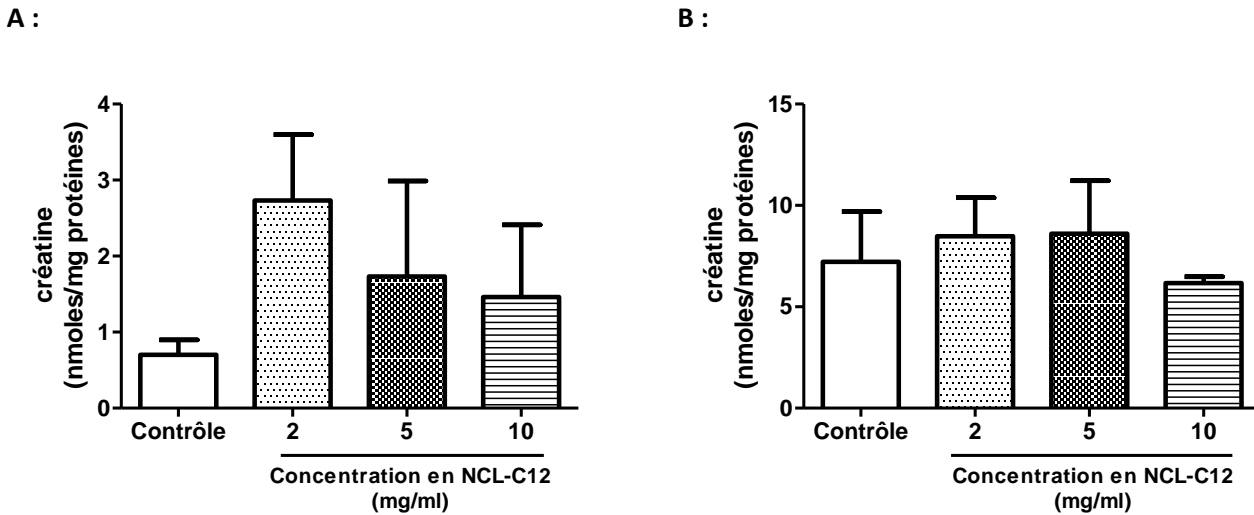
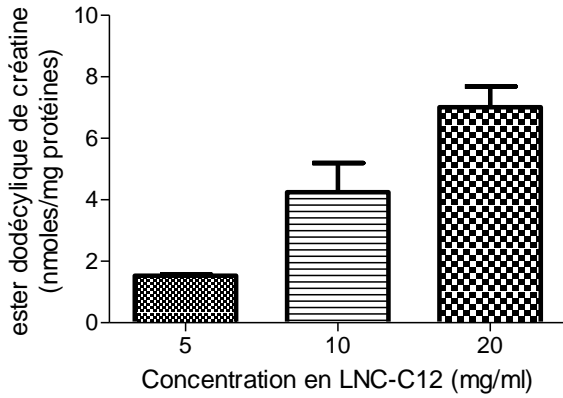
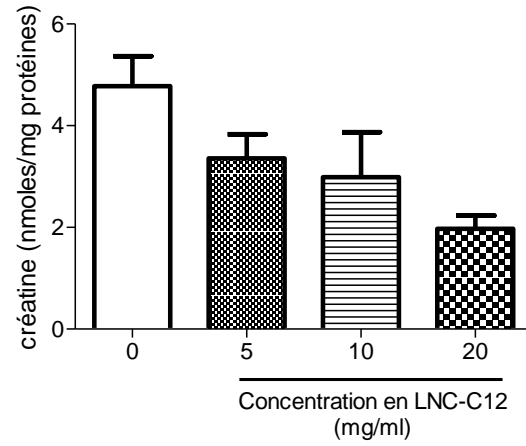


Figure 84 : Quantification de la créatine dans les lysats endothélial (A) et glial (B) après une incubation de 60 minutes avec les NCL-C12

A :



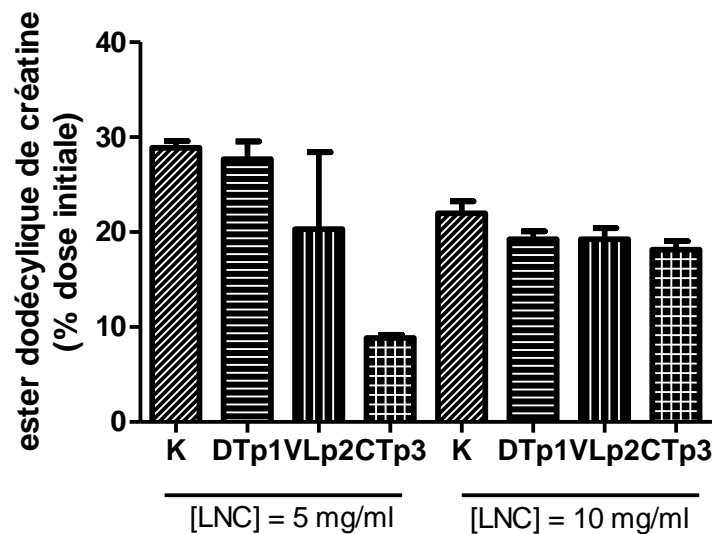
B :



**Figure 85 : Internalisation des NCL-C12 dans les neurones (Graphe A) ayant pour conséquence une diminution de la quantité de créatine intracellulaire (Graphe B)**

## 4.9 Internalisation des NCL chargées en ester dodécylique de créatine dans les fibroblastes pathologiques et conversion en créatine

La Figure 86 décrit la quantité d'ester dodécylique présente dans les fibroblastes après incubation avec les NCL-C12. Nous montrons que l'ester est détectable dans toutes les cellules contrôle aussi bien que dans les cellules pathologiques (patients DTp1, VLp2, CTp3), ce qui indique que les NCL-C12 peuvent pallier l'absence d'un transporteur de la créatine fonctionnel et qu'elles seraient un vecteur intéressant pour l'administration de l'ester de créatine dans les cellules déficitaires.



**Figure 86 : Quantification de l'ester dodécylique de créatine dans les fibroblastes humains après incubation avec les NCL-C12**

*K : sujet contrôle ; DTp1, VLp2, CTp3 : patients atteints du déficit en transporteur de la créatine.*

Lorsqu'on quantifie la créatine dans ces lysats cellulaires, nous observons une augmentation de créatine dans les cellules contrôle (K), corrélée avec l'augmentation de la dose de NCL-C12 (Figure 87).



Une augmentation est également observable dans les lysats des cellules pathologiques des 3 patients DTp1, VLp2 et CTp3, également corrélée à l'augmentation de la dose de NCL-C12 utilisée (Figure 88). Ceci indique que ces NCL-C12 sont dégradées dans la cellule et qu'elles libèrent l'ester dodécylque de créatine qui peut être pris en charge par les estérases pour être converti en créatine.

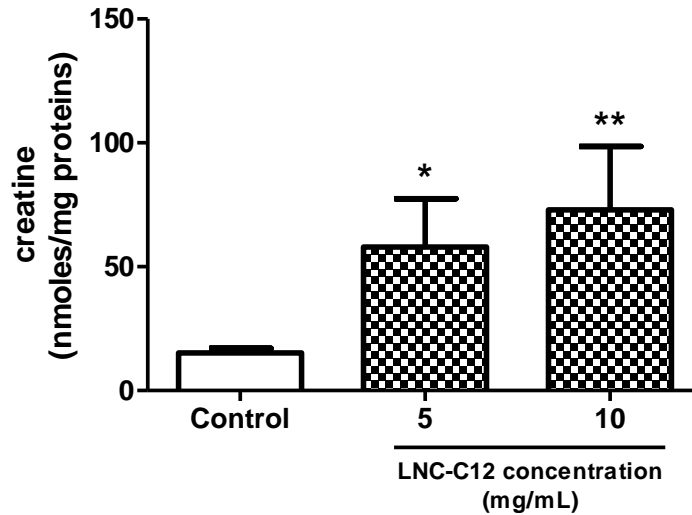


Figure 87 : Quantification de la créatine après conversion de l'ester dodécylque de créatine dans les fibroblastes du sujet contrôle

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  (ANOVA + Dunnett). Extrait de Trotier-Faurion et al., soumis à Nature Nanotechnology, février 2013

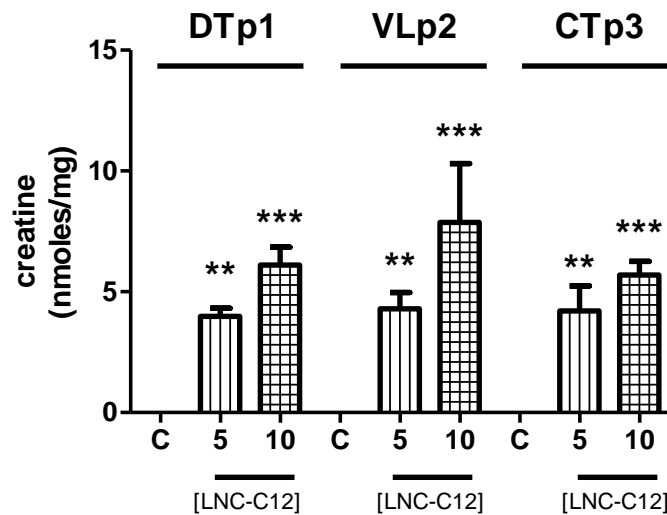


Figure 88 : Quantification de la créatine après conversion de l'ester dodécylque de créatine dans les fibroblastes des patients atteints du déficit en transporteur de la créatine après incubation de 5 et 10 mg/ml de LNC-C12

\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.0001$  (ANOVA + Dunnett). Extrait de Trotier-Faurion et al., soumis à Nature Nanotechnology, février 2013

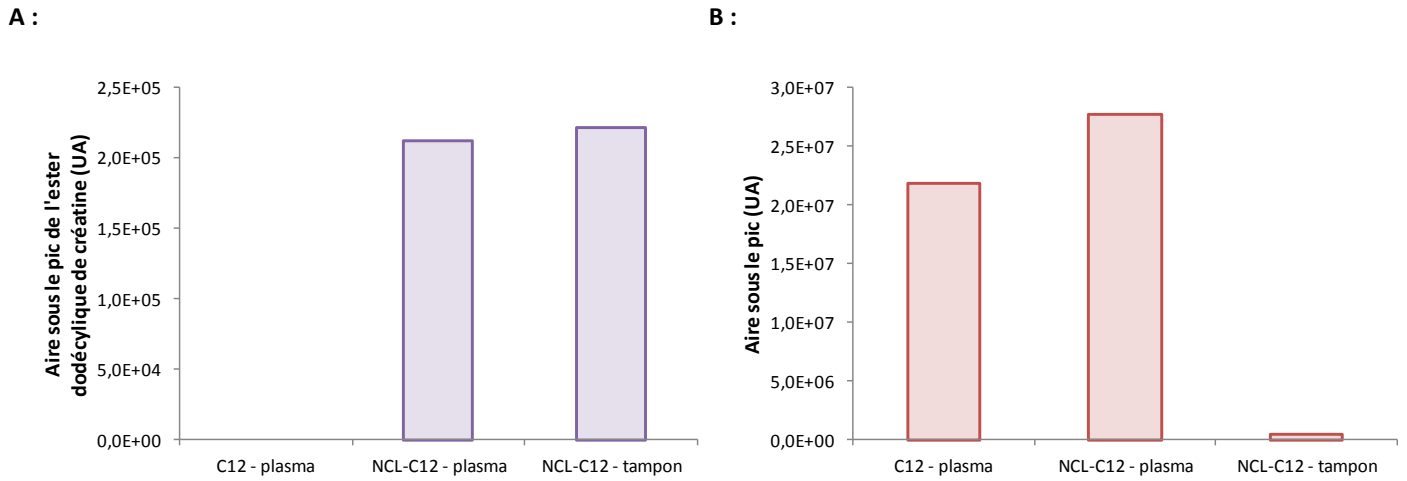
## 4.10 Stabilité en milieu biologique de l'ester dodécyclique de créatine encapsulé dans les NCL

### 4.10.1 Stabilité dans le plasma

Nous avons évalué la stabilité de l'ester associé aux NCL dans le plasma (NCL-C12 – plasma) par comparaison à la même concentration de NCL-C12 dans un tampon aqueux (NCL-C12 – tampon). Les résultats montrent que la solubilisation des NCL-C12 dans le plasma ne modifie pas le signal par rapport à la condition contrôle dans le tampon aqueux (Figure 89 A). En revanche, l'ester dodécyclique seul est totalement hydrolysé en présence de plasma. La créatine détectée pour la condition « NCL-C12 – plasma » varie peu par rapport à la condition « C12 – plasma », mais il est difficile de dissocier le signal issu de la dégradation de l'ester par les estérases de celui, déjà très élevé, du plasma seul (Figure 89 B). Nous voyons bien que ce signal de créatine est spécifique des solutions dans le plasma, puisque la créatine n'est pas détectée dans le tampon aqueux.

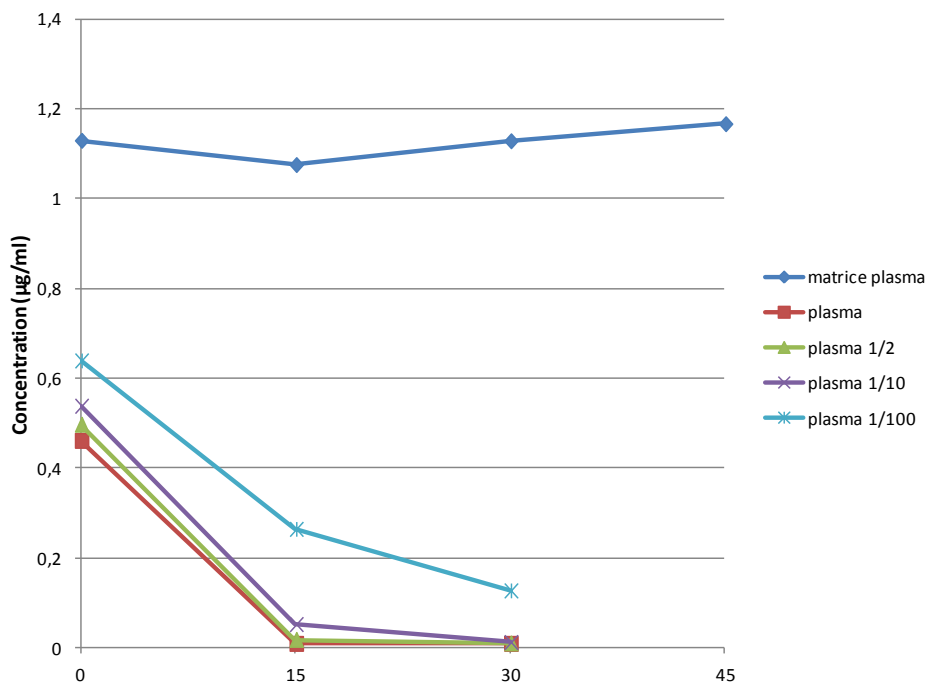
Cette expérimentation a été réalisée sans incubation, les NCL-C12 et l'ester dodécyclique de créatine étant en contact du plasma seulement quelques minutes le temps de réaliser l'extraction par les solvants organiques. Ces données confirment l'hydrolyse immédiate de l'ester en solution dans le plasma.

Nous avons réalisé les mêmes tests avec une cinétique d'incubation à 37°C afin de mimer les conditions *in vivo*. La Figure 90 nous permet de montrer la dégradation du signal de l'ester dodécyclique au cours de l'incubation des NCL-C12 dans le plasma (courbe rouge) par rapport à une incubation dans une matrice plasma, c'est-à-dire un plasma qui est déplété en protéines (courbe bleue foncée). Il est intéressant de noter que les dilutions de plasma dans un tampon aqueux (qui diminue la concentration des protéines présentes) avant l'incubation avec les NCL-C12 permettent de restaurer une partie du signal, sans toutefois atteindre les valeurs obtenues pour la matrice plasma.



**Figure 89 : Stabilité des NCL-C12 dans le plasma**

Grappe A : Détection de l'ester dodécylique de créatine ; Grappe B : Détection de la créatine ; Abscisse (A et B) : C12-plasma : C12 en solution dans le plasma, NCL-C12 – plasma : NCL-C12 en solution dans le plasma et NCL-C12-tampon : NCL-C12 en solution dans le tampon aqueux ; Ordonnée (Grappe A) : Aire sous le pic chromatographique de l'ester dodécylique de créatine ; Ordonnée (Grappe B) : Aire sous le pic chromatographique de la créatine



**Figure 90 : Dégradation des NCL-C12 dans le plasma**

Abscisse : temps en minutes ; Ordonnée : Concentration en ester dodécylique de créatine (µg/ml)

En étudiant les concentrations de créatine dans les différentes conditions, nous ne montrons pas de différence entre les conditions matrice plasma et plasma, ce qui semble indiquer que la diminution du signal d'ester de créatine n'est pas corrélée à une augmentation du signal de créatine alors que cela devrait être le cas s'il était dégradé par les estérases (Figure 91). De plus, les dilutions du plasma réalisées diminuent les concentrations en créatine ce qui prouve que le signal en créatine correspond aux concentrations endogènes présentement dans le plasma. Nous avons alors inactivé les estérases plasmatiques avec un cocktail d'inhibiteur de protéases de façon à apprécier une dégradation de l'ester due à l'action enzymatique.

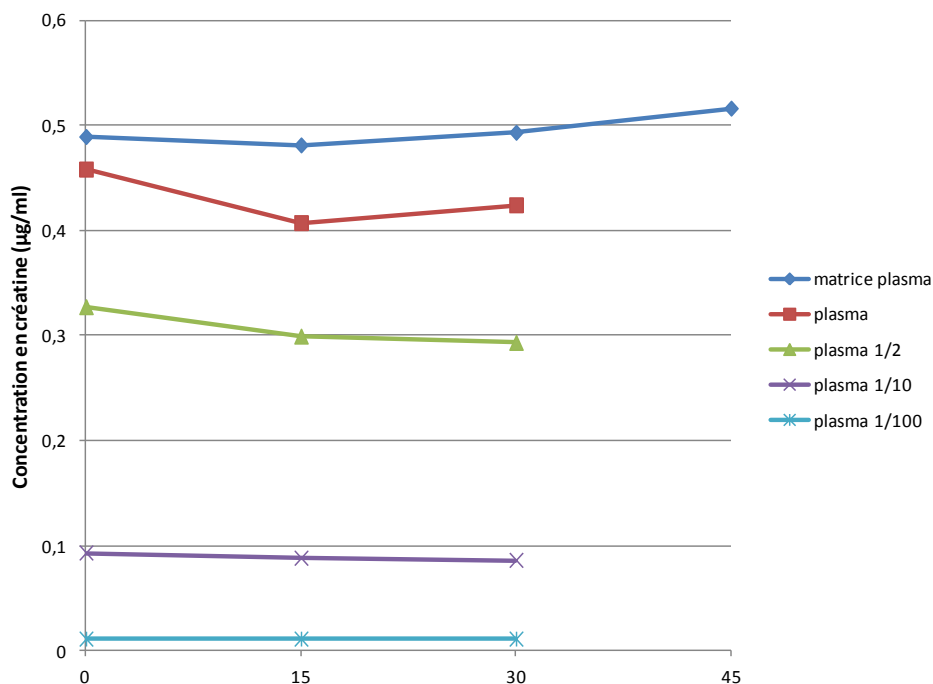


Figure 91 : Stabilité de la concentration en créatine dans le plasma lors des incubations en NCL-C12

Abcisse : temps en minutes ; Ordonnée : concentration en créatine (µg/ml)

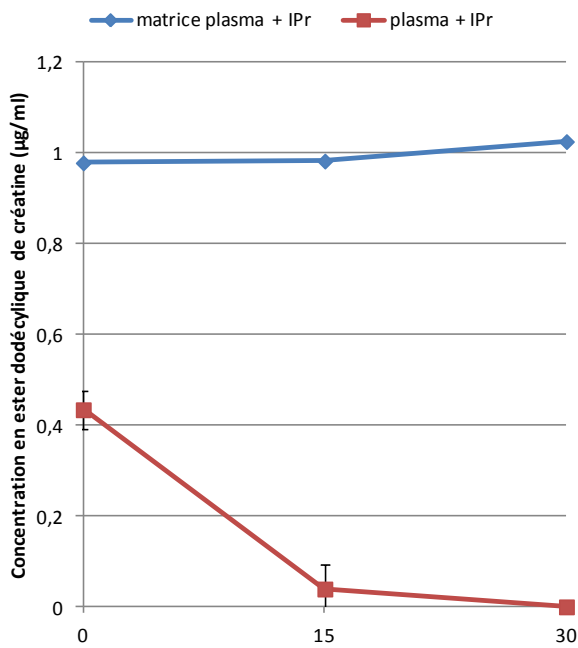
#### 4.10.2 Stabilité dans le plasma en présence d'inhibiteurs de protéases

Nous évaluons la stabilité de l'ester dodécylque de créatine lors de l'incubation des NCL-C12 dans le plasma en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Ce cocktail inhibe de façon non spécifique les enzymes y compris les estérases. Nos résultats indiquent que l'ester dodécylque de

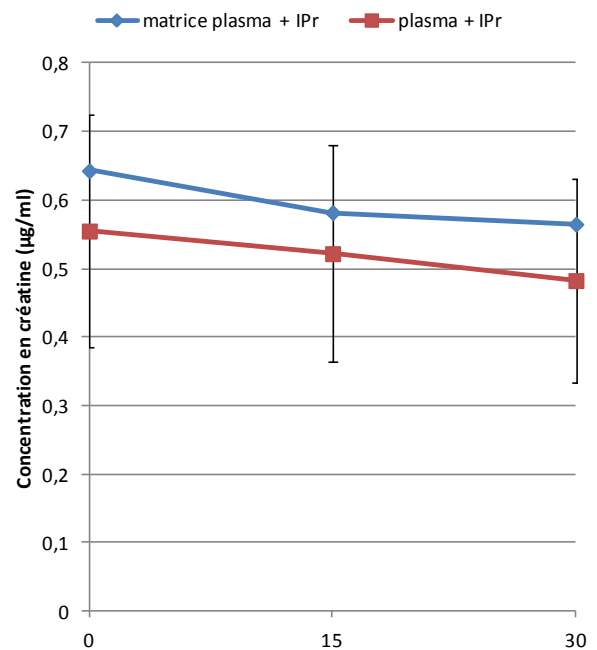
créatine n'est plus détectable dès 15 minutes d'incubation alors que la créatine n'augmente pas (Figure 92 A et B).

Nous avons alors émis l'hypothèse que les NCL-C12 ne seraient pas dégradées dans le plasma mais que nous pourrions être face à un souci de préparation des échantillons. Notre protocole comporte une étape de précipitation des protéines dans un solvant organique et nous pensons que des interactions peuvent se faire entre les NCL-C12 et les protéines présentes dans le plasma, ce qui conduirait à la co-précipitation des NCL-C12 avec les protéines plasmatiques et entraînerait un biais dans le dosage, montrant une fausse diminution de la concentration en ester dodécylque de créatine.

A :



B :



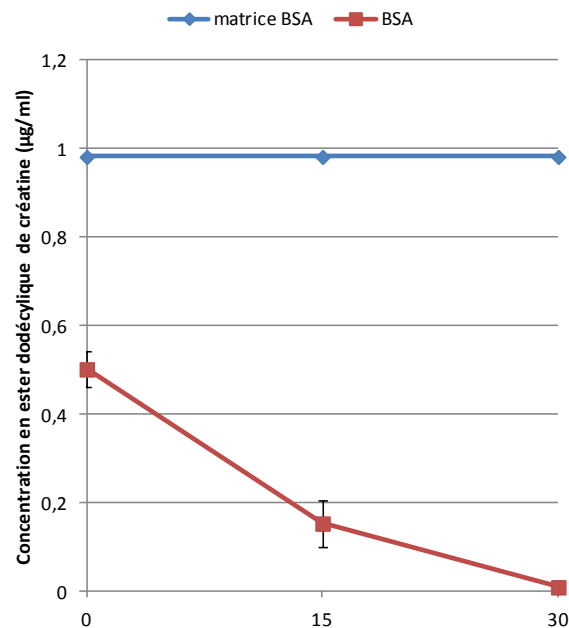
**Figure 92 : Quantification de l'ester dodécylque de créatine (A) et de la créatine (B) après incubation des LNC-C12 dans du plasma contenant des inhibiteurs de protéases**

Abcisse (A et B) : temps en minutes ; Ordonnée (A) : concentration en ester dodécylque de créatine (µg/ml) ; Ordonnée (B) : concentration en créatine (µg/ml)

### 4.10.3 Stabilité des NCL-C12 dans une solution protéique d'albumine de sérum bovin

Nous réalisons les mêmes tests d'incubation en remplaçant le plasma par une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) afin d'obtenir un système modèle simplifié.

La Figure 93 montre qu'en solution dans une solution aqueuse de BSA, les NCL-C12 conduisent également à une disparition du signal de l'ester dodécylrique. La créatine est, quant à elle, indétectable puisqu'il n'y en a pas dans la BSA. Ce système ne contenant pas d'estérase active, nous validons notre hypothèse concernant le biais expérimental lié à une interaction entre les protéines et les NCL-C12, entraînant une co-précipitation des NCL-C12 lors de la préparation des échantillons et à une disparition du signal spécifique de l'ester dodécylrique de créatine.



**Figure 93 : Dégradation de l'ester dodécylrique de créatine lors de l'incubation des NCL-C12 dans une solution d'albumine de sérum bovin (BSA)**

*Abscisse : temps en minutes ; Ordonnée : concentration en ester dodécylrique de créatine (µg/ml)*

En conclusion, il semble que la créatine, produit de clivage de l'ester par les estérases plasmatiques, ne soit pas détectable dans les échantillons de NCL-C12 incubés dans le plasma. La dégradation détectée de l'ester relève probablement d'un protocole d'extraction des échantillons inadapté,

conduisant à la co-précipitation des NCL-C12 avec des protéines plasmatiques et empêchant le dosage de l'ester.

***ARTICLE 2***

*SOU MIS A*

***NATURE NANOTECHNOLOGY***

***(LE 20 FEVRIER 2013)***







## Detailed Status Information

<b>Manuscript #</b>	<a href="#">NNANO-13020301</a>
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	20th February 13
<b>Current Stage</b>	Manuscript received
<b>Title</b>	Dodecyl Creatine Ester and Lipid Nanocapsule: A Double Strategy for the Treatment of Creatine Transporter Deficiency
<b>Manuscript Type</b>	Letter
<b>Corresponding Author</b>	Dr. Aloise MABONDZO ( <a href="mailto:aloise.mabondzo@cea.fr">aloise.mabondzo@cea.fr</a> ) (CEA)
<b>Contributing Authors</b>	Dr. Alexandra Trotier-Faurion , Miss Sophie Dézard , Dr. Catherine Passirani , Prof. Jean Pierre Benoit , Mr. Jérôme Béjaud , Dr. Frédéric Taran , Prof. Pascale delonlay , Dr. Vassili Valayannopoulos
<b>Authorship</b>	Yes
<b>Abstract</b>	Creatine transporter deficiency is characterized by mutations in the gene encoding the creatine transporter, leading to impaired transport of creatine at the cell membrane <sup>1</sup> . Perturbations in the cell's mitochondrial energy cycle explain the clinical features of deep mental retardation. Patients with this disease would thus benefit from replenishment of creatine inside the brain cells. Here, we present a therapeutic strategy based on the use of dodecyl creatine ester incorporated into biodegradable lipid nanocapsules for in vivo administration and the protection of the dodecyl creatine ester from degradation by plasma esterases. We show that these lipid nanocapsules can cross the blood-brain barrier and enter the brain endothelial cells. In human fibroblasts expressing a nonfunctional creatine transporter, all or part of the dodecyl creatine ester was released from the nanocapsules and biotransformed by esterases to creatine, thus indicating the value of this strategy in this therapeutic context.
<b>NPG Subject Categories</b>	Nanomedicine, Nanobiotechnology

Stage	Start Date	End Date	Approximate Duration
Manuscript received	20th February 13		
Manuscript under submission	20th February 13		



nature

nanotechnology

LETTERS

**Dodecyl Creatine Ester and Lipid Nanocapsule: A Double Strategy for the Treatment of Creatine Transporter Deficiency.**

Alexandra Trotier-Faurion<sup>1#</sup>, Catherine Passirani<sup>2,3★</sup>, Jérôme Béjaud<sup>2,3#</sup>, Sophie Dézard<sup>4</sup>, Vassili Valayannopoulos<sup>5</sup>, Frédéric Taran<sup>4</sup>, Pascale de Lonlay<sup>5</sup>, Jean-Pierre Benoit<sup>2,3</sup> and Aloïse Mabondzo<sup>1★</sup>

<sup>1</sup> CEA, DSV, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'ImmunoAnalyse, Equipe Pharmacologie Neurovasculaire, Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup> LUNAM – Université d'Angers, F-49933, Angers, France

<sup>3</sup> INSERM U1066 – Micro et Nanomédecines Biomimétiques, Angers, France

<sup>4</sup> CEA, DSV, iBiTec-S, Service de chimie bio-organique et de marquage, Gif sur Yvette, France

<sup>5</sup> Centre de référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme de l'Enfant et de l'Adulte, Hôpital Necker-Enfants malades, Université Paris Descartes, Paris, France

#These authors contributed equally to this work.

★e-mail: [Aloïse.Mabondzo@cea.fr](mailto:Aloïse.Mabondzo@cea.fr); [Catherine.Passirani@univ-angers.fr](mailto:Catherine.Passirani@univ-angers.fr)

### **Introductory paragraph**

Creatine transporter deficiency is characterized by mutations in the gene encoding the creatine transporter, leading to impaired transport of creatine at the cell membrane<sup>1</sup>. Perturbations in the cell's mitochondrial energy cycle explain the clinical features of deep mental retardation. Patients with this disease would thus benefit from replenishment of creatine inside the brain cells. Here, we present a therapeutic strategy based on the use of dodecyl creatine ester incorporated into biodegradable lipid nanocapsules for *in vivo* administration and the protection of the dodecyl creatine ester from degradation by plasma esterases. We show that these lipid nanocapsules can cross the blood-brain barrier and enter the brain endothelial cells. In human fibroblasts expressing a nonfunctional creatine transporter, all or part of the dodecyl creatine ester was released from the nanocapsules and biotransformed by esterases to creatine, thus indicating the value of this strategy in this therapeutic context.

Creatine metabolism deficiencies result from either an enzymatic defect of creatine biosynthesis (AGAT and GAMT deficiencies, recessive autosomal transmission) or a defect in the transport of creatine through cell membranes (X-linked creatine deficiency caused by mutations in the SLC6A8 gene)<sup>1</sup>. In both cases, patients suffer from severe backwardness with language delay, extrapyramidal syndrome, behavioural disorders and sometimes epileptic seizures<sup>2, 3, 4</sup>. Therapies based on creatine supplementation or on creatine precursors L-arginine and L-glycine significantly improve creatine biosynthesis deficiencies, in terms of both clinical and biochemical findings. However, in 4- to 6-year follow-up of patients there was no clinical progress or increase in intracerebral creatine levels<sup>5</sup>. Patients are thus in a clinical situation where the absence of a functional creatine transporter at the blood-brain barrier (BBB) and in the brain parenchyma cells, particularly in neurons and astrocytes, prevents the entry and diffusion of creatine in the central nervous system<sup>6, 7</sup>. This severely impairs cerebral functions. An evaluation of new therapeutic strategies for this cerebral metabolic disorder is now therefore necessary. We previously reported that dodecyl creatine ester would be a good drug candidate to develop as a therapeutic option for patients suffering from creatine transporter deficiency. However, dodecyl creatine ester is degraded by plasma esterases in all biological fluids. An efficient delivery system that targets it to the brain parenchyma has yet to be developed. By overcoming creatine transporter deficiency at the BBB, it would enable the delivery of dodecyl creatine ester inside brain cells thus restoring the creatine pool and improving neuronal functions. Lipid nanocapsules (LNCs) have already been described as a promising approach to the specific delivery of lipophilic therapeutic agents<sup>8-10</sup>, especially into the brain. Prepared according to a solvent-free process, these spherical LNCs made of biocompatible materials exhibit good stability in suspension. Their surface contains polyethylene glycol, which affects the vascular residence time of the nanocapsules, providing stealth properties.

Unpublished findings from our laboratory demonstrate that such LNCs cross the BBB in an *in vitro* cell-based rat model. However, several investigations showed that the high susceptibility of dodecyl creatine ester to hydrolysis in aqueous media at high temperatures (above 37°C) rendered it unsuitable for the standard LNC preparation process. Transcutol® was used to dissolve the dodecyl creatine ester at ambient temperature and the mixture was added in the last heating step. Transcutol® has interesting surfactant properties<sup>11</sup> and is thus incorporated in the shell of LNCs (tensioactive measurements, data not shown). The LNCs produced (LNC-C12) have properties suitable for IV injection (size:  $48.31 \pm 1.77$  nm; polydispersity index:  $0.07 \pm 0.01$ ; zeta potential:  $-0.17$  mV; [LNC-C12] theoretical concentration:  $260$  mg.mL<sup>-1</sup>; theoretical concentration of dodecyl creatine ester:  $300$  µg.mL<sup>-1</sup>).

We first studied the translocation of LNC-C12 across an *in vitro* cell-based rat BBB model<sup>12</sup> and the delivery of dodecyl creatine ester in endothelial and astroglial cells. Then, we established whether, in the pathological context of creatine transporter deficiency, entry of LNC-C12 is possible and would result in an increase of the creatine pool in the cells.

Here we show that the LNC-C12 were incorporated into brain endothelial cells since we found  $0.55 \pm 0.14$ ,  $0.82 \pm 0.43$  and  $0.87 \pm 0.31$  nmoles per mg of protein of dodecyl creatine ester in the endothelial cell lysates after a 60-minute incubation with LNC-C12 2, 5 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). No difference was detected between the 3 concentrations of LNC-C12. Some LNC-C12 was also able to diffuse through the BBB model and enter the glial cells (Table 1) since almost 2 nmoles per mg of protein of dodecyl creatine ester was found in the cell lysates for the 3 concentrations. An interesting point is that even dodecyl creatine ester alone is also able to cross the BBB, but ester levels are almost 2-fold higher in endothelial cells than in glial cells when treated with LNC-C12, whereas the reverse is true with the ester alone. This suggests that the LNCs would favour the passage to the brain.

Not all of the tested conditions increased Lucifer yellow permeability, an internal standard of BBB integrity, as its values were below the limit range of  $5 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  ( $0.48 \pm 0.10$  ;  $0.41 \pm 0.02$  ;  $0.82 \pm 0.57$  for 2, 5 and 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  LNC-C12, respectively, compared with the vehicle alone:  $0.39 \pm 0.17$ ), suggesting that the LNC-C12 did not compromise the integrity of the *in vitro* cell-based rat BBB model and that the cell monolayer is intact.

When we looked at the creatine content in the cells, we showed that 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  LNC-C12 induced a significant increase of creatine content in the brain endothelial cell lysate ( $p < 0.05$ , Figure 1a). However, this was not the same for the higher concentrations. No significant change was observed in the glial lysate creatine pool (Figure 1b). We detected an increase, albeit not quantifiable, of creatine in the apical and basolateral supernatants. This indicates that, as we tested the LNC-C12 in a non-pathological BBB model expressing a functional SLC6A8, creatine produced by the enzymatic conversion of dodecyl creatine ester could have been excreted in extracellular media. This is why we studied internalization of LNC-C12 in a pathological human fibroblast model.

Moreover, what was of huge interest was the comparison of potential creatine excretion with LNC-C12 and with dodecyl creatine ester alone. Incubation with 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  dodecyl creatine ester completely depleted the brain endothelial creatine pool and greatly reduced glial creatine content, correlated with efflux of creatine into the apical compartment. This suggested two hypotheses: first, the LNC-C12 crosses the BBB using a different pathway than the dodecyl creatine ester alone and, second, the kinetics of delivery of the ester are delayed when using LNC-C12 compared with dodecyl ester alone. We thus enhanced an interesting property of these devices on the inhibition of the efflux of creatine outside the cells.

To confirm the relevance of our strategy, since our interest resided in developing a new pharmacological strategy to treat creatine transporter deficiency, we evaluated



the release of dodecyl creatine ester and its conversion to creatine in human fibroblasts lacking functional creatine transporter. First, we demonstrated that LNC-C12 was equivalently incorporated in fibroblasts from both control subject K ( $28.9 \pm 0.68$  and  $22.0 \pm 1.27\%$  of initial quantity) and patients with creatine transporter deficiency: DTp1 ( $27.7 \pm 1.85$  and  $19.2 \pm 0.86\%$ ), VLp2 ( $20.3 \pm 8.12$  and  $19.3 \pm 1.18\%$ ) and CTp3 ( $8.85 \pm 0.34$  and  $18.2 \pm 0.89\%$ ) at concentrations of 5 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively. This indicates that LNC-C12 did not depend on creatine transporter to enter the cells. A significant increase in creatine content was detected in both non-pathological and pathological fibroblasts (Figures 2 and 3). This led to the assumption that, once the LNC-C12 entered the fibroblasts, all or part of the dodecyl creatine ester released was biotransformed to creatine by esterases, which points to the great potential of this system in this particular therapeutic context. The same positive results were obtained with the dodecyl creatine ester alone, but it cannot be used in human therapy due to its degradation in the plasma.

These results suggest that our dodecyl creatine ester delivery system seems to be of particular interest in the pathological context of creatine transporter deficiency. Addition of Transcutol® to the formulation is the only way to solubilize the dodecyl creatine ester, which has an amphiphilic chemical structure. We assume that both Transcutol® and dodecyl creatine ester are incorporated into the shell and not the core of the LNCs.

LNC-C12 crosses the BBB and delivers dodecyl creatine ester to the brain parenchyma, even in the context of a nonfunctional creatine transporter. Although it did not increase the intracellular creatine pool in nonpathological brain cells, LNC-C12 limited the efflux of creatine outside these cells compared with the dodecyl creatine ester alone. In contrast, in human fibroblasts from patients with creatine transporter deficiency, LNC-C12 increased levels of creatine, the essential energy compound. We strongly believe that LNC-C12 should be further investigated in *in*

*in vivo* models to assess the protection of dodecyl creatine ester from esterases. This formulation would be of particular interest in a two-step therapeutic strategy: first, the LNC-C12 would cross the BBB and could be delivered itself or just release dodecyl creatine ester into the brain parenchyma. In both cases, LNC-C12 or dodecyl creatine ester would penetrate neuronal cells and increase their creatine content, thus restoring neuronal functions in creatine transporter deficiency.

## Methods

### Dodecyl creatine ester synthesis:

Dodecyl creatine ester was synthesized according to process patented in July 2012. Briefly, the first step consists of an activation of the electrophilicity of the carbonyl moiety of creatinine by double protection of the cyclic guanidine (carbamate derivative). Then, in the presence of dodecanol, the creatinine ring opened spontaneously. A carbamate deprotection generated dodecyl creatine ester (Trotier-Faurion et al., submitted for publication).

### Preparation of lipid nanocapsules

LNCs were prepared according to Heurtault et al.<sup>13</sup> with a minor modification derived from Roger et al. 2011<sup>11</sup>, consisting of the solubilization of 300 µg of dodecyl creatine ester in Transcutol® added at the last heating step.

## *In vitro* studies

### Blood-brain barrier translocation of LNC-C12

The *in vitro* cell-based BBB model consisted of a co-culture of primary rat endothelial and astroglial cells. Primary rat astroglial cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$

cells/well in 1500  $\mu\text{L}$  on a 12-well plate. The astroglial culture medium was a mixture of  $\alpha$ -MEM/F-12 supplemented with 5% FBS, 1% human serum, 1% penicillin/streptomycin/neomycin and 0.4% FGF. 24 hours later, Transwell inserts (Costar; pore size 0.4  $\mu\text{m}$ ; diameter 12 mm; surface area 1.12  $\text{cm}^2$ ) were placed inside the wells and primary rat endothelial cells were plated on the upper layer at a density of  $8 \times 10^4$  cells/insert in 500  $\mu\text{L}$  EBM-2 basal medium supplemented with the EGM-2MV kit (Lonza). The chambers containing endothelial cells and astroglial cells were considered as the apical and basolateral compartments, respectively. The plates were incubated at 37°C in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  and the BBB model formed confluent monolayers within 12 days<sup>12, 14</sup>.

After 12 days, the integrity of this BBB model was assessed. The apical and basolateral media were replaced by specific transport buffer (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.8 mM glucose and 5 mM HEPES) in which LNC-C12 was dissolved at 2, 5 and 10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . After 60 min of incubation, supernatants were diluted 5-fold in acetonitrile-5% formic acid and cells were scraped in a mixture of 20% water/76% acetonitrile/4% formic acid. After centrifugation (13000 g, 10 min, +4°C), HPLC-MS/MS was used to detect the dodecyl creatine ester in each compartment and in endothelial and astroglial cell lysates.

The integrity of the cell-based BBB models was demonstrated by measuring the flux of [ $^{14}\text{C}$ ]-sucrose, [ $^3\text{H}$ ]-vinblastine and [ $^3\text{H}$ ]-propranolol through the monolayer. Transwells with rat endothelial cell monolayers were transferred to new 12-well plates. A specific transport buffer was added: 500  $\mu\text{L}$  to the apical compartment and 1500  $\mu\text{L}$  to the basolateral compartment. After 60-min incubation at 37°C of 0.1  $\mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-labeled sucrose, 1  $\mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1}$  [ $^3\text{H}$ ]-propranolol in the apical compartment and 0.1  $\mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1}$  [ $^3\text{H}$ ]-vinblastine in the apical and basolateral compartment, supernatants from both apical and basolateral compartments were collected. The amount of tracer that passed through the endothelial monolayer was

determined by scintillation counting and the permeability ( $P_{app}$ ) of each compound was assessed using the formula (A):

$$P_{app} X_{A \rightarrow B} = \frac{[X_{basolateral}] \times V_B}{T \times S \times [X_0]}$$

*X* is the compound for which the permeability is assessed,  $[X_{basolateral}]$  the concentration of the compound *X* in the basolateral compartment at the end of the incubation,  $V_B$  the total volume of the basolateral compartment (1.5 mL), *T* the time of the incubation, *S* the transwell surface area and  $[X_0]$  the concentration of compound *X* at  $T_0$ .

Validated BBB models have sucrose permeability below  $8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , propranolol permeability above  $16 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  and vinblastine permeability ratio above 2.

The Lucifer yellow permeability test was used to study the effect of LNC-C12 on BBB integrity. LY was diluted in transport buffer to a final concentration of 100  $\mu\text{M}$  and added to the apical compartment during LNC-C12 incubation. Fluorescence leakage was determined for LY with 485 nm excitation and 530 nm emission using a fluorescence plate reader. The Lucifer yellow permeability (LY  $P_{app}$ ) was then calculated: a value below  $5.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  indicates that the LNC-C12 did not damage BBB integrity.

#### Uptake of LNC-C12 in fibroblasts

Human fibroblasts were obtained from skin biopsy specimens, a gift from the Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme at the Necker Hospital in Paris. Three patients with cerebral creatine deficiency caused by lack of creatine transporter and 1 control (K) were studied. All of the mutations were previously described in Valayannopoulos et al., 2013<sup>15</sup>: p.Asn336del c.1006\_1008delAAC (patient 1, DTp1) and p.(Gly499del) c.1497\_1500delGAG (patient 2, VLp2) as P3 and P4, respectively, or in Valayannopoulos et al., 2012<sup>16</sup>: p.(G414del) c.1221\_1223delTTC (patient 3, CTp3) as P2. The fibroblasts were plated out at 30 000 cells per well in 6-well plates in a DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1%

penicillin/streptomycin/neomycin, 1% sodium pyruvate and 1% L-glutamine. They were cultured for 6 days by replacing the medium every 2 to 3 days. The incubation of LNC-C12 consisted in replacing the medium by HBSS in which the compound was diluted to 2, 5 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>. After one hour at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, the supernatant was diluted 5-fold in acetonitrile-5% formic acid and cells were scraped in 20% water/76% acetonitrile/4% formic acid. After centrifugation (13000g, 10 min, +4°C), an HPLC-MS/MS was performed on supernatants to detect creatine and dodecyl creatine ester in the cell lysates.

#### HPLC-MS/MS identification of dodecyl creatine ester

Liquid chromatography (Shimadzu HPLC system LC 20AD) with a 2.0 × 150 mm Uptisphere Diol HPLC column (UP6OH, Interchim) was used for elution of dodecyl creatine ester and creatine. The mobile phase was isocratic at 40/60 (detection of creatine) or 20/80 (detection of dodecyl creatine ester) A/B where solvent A was H<sub>2</sub>O containing 0.1% formic acid and solvent B was acetonitrile containing 0.1% formic acid; the flow rate was 0.4 mL/min. Analyte (10 µL) was injected onto the column placed in an oven at 40°C. The total run time was 6 min.

Tandem mass spectrometry (Finnigan TSQ Quantum Discovery with Xcalibur and LC Quan softwares, Thermo) in positive electrospray mode was used for detection. Spray voltage was 3.0 kV and sheath and auxiliary gas pressures were 50 and 20 (arbitrary units), respectively. The in-source CID energy was fixed at 12 V and capillary temperature was 350°C. Tube lens (creatine: 100; dodecyl ester: 110) and collision energy (creatine: 10; dodecyl ester: 25) values were optimized for each compound. Multiple reaction monitoring was used for the detection of the ion transitions: 132.156 → 90.185 (creatine) or 300.285 → 90.125 (dodecyl creatine ester). The standard curves showed linearity for creatine over a range of 0.05-10 µg.mL<sup>-1</sup> and of 0.01-5 µg.mL<sup>-1</sup> for dodecyl creatine ester. Creatine fatty esters and creatine

concentrations and amounts were determined in each compartment and in endothelial cells, astroglial cells and fibroblast lysates. The amount of creatine fatty esters and the amount of creatine were standardized to the amount of protein in each lysate.

## References

1. Stockler, S., Schutz, P.W. & Salomons, G.S. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* 46, 149-166 (2007).
2. Schulze, A. Creatine deficiency syndromes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 244, 143-150 (2003).
3. deGrauw, T.J. *et al.* The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* 244, 45-48 (2003).
4. Poo-Arguelles, P. *et al.* X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* 29, 220-223 (2006).
5. van de Kamp, J.M. *et al.* Long-term follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* 35, 141-149 (2012).
6. Ohtsuki, S. *et al.* The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1327-1335 (2002).
7. Braissant, O., Henry, H., Beard, E. & Uldry, J. Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* 40, 1315-1324 (2011).
8. Lamprecht, A., Bouligand, Y. & Benoit, J.P. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J Control Release* 84, 59-68 (2002).
9. Laine, A.L. *et al.* Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm* 81, 690-693 (2012).
10. Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P. & Benoit, J.P. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 379, 201-209 (2009).
11. Roger, E., Lagarce, F. & Benoit, J.P. Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. *Eur J Pharm Biopharm* 79, 181-188 (2011).
12. Lacombe, O. *et al.* In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm* 8, 651-663 (2011).
13. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E. & Benoit, J.P. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 19, 875-880 (2002).
14. Brun, E., Carriere, M. & Mabondzo, A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials* 33, 886-896 (2012).
15. Valayannopoulos, V. *et al.* Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab Dis* 36, 103-112 (2013).

16. Valayannopoulos, V. *et al.* Treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* 35, 151-157 (2012).

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Fondation Jérôme Lejeune. The authors thank Mickaël Kempf for his LC-MS/MS support and the patients included in this study.

### **Author contributions**

AM, PdL, VV, CP and JPB designed the research and ATF, JB and SD performed the research and analyzed the data. ATF, AM, CP, JP, PdL, VV co-wrote the paper.

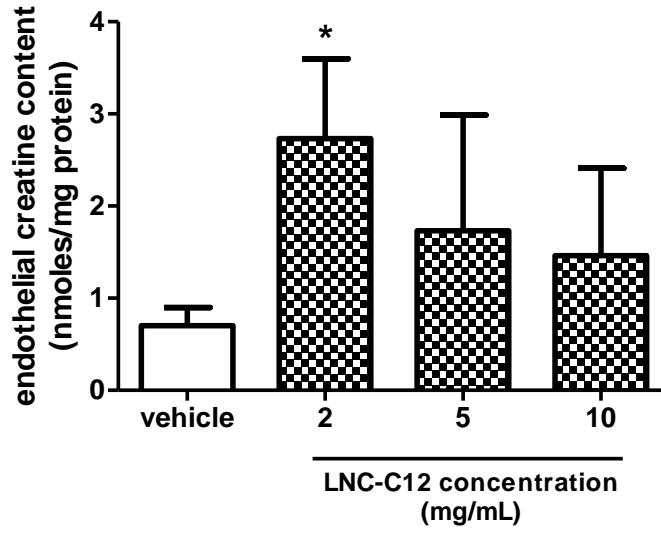
**Table 36:**

concentration en NCL-C12 (mg.mL <sup>-1</sup> )	Cellules endothéliales (BHE) (nmoles/mg protein)	Cellules gliales (BHE) (nmoles/mg protein)
2	0.551 ± 0.14	2.550 ± 2.45
5	0.818 ± 0.43	2.262 ± 1.25
10	0.870 ± 0.31	1.394 ± 0.96



Figure 1:

a)



b)

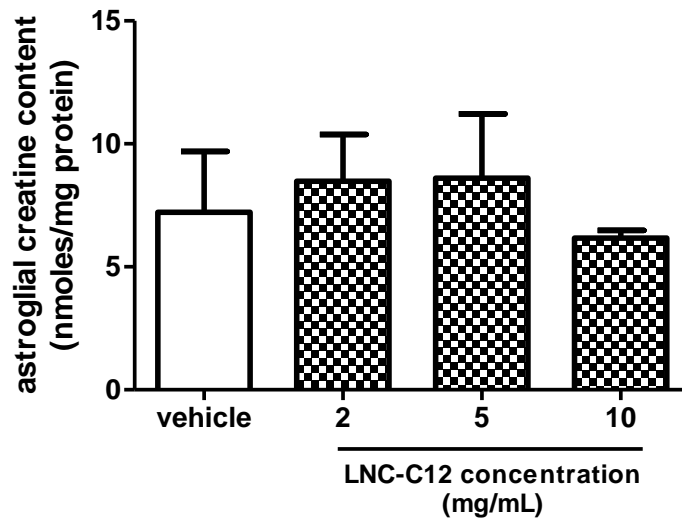


Figure 2:

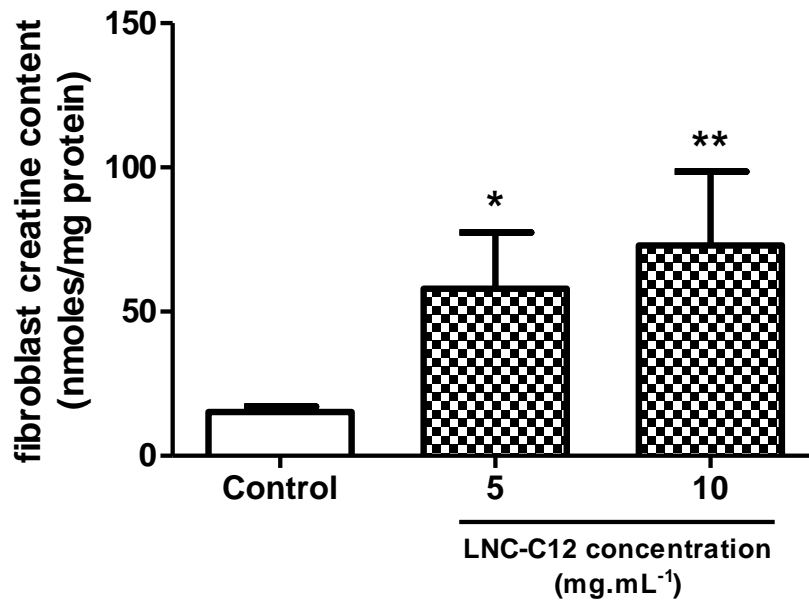
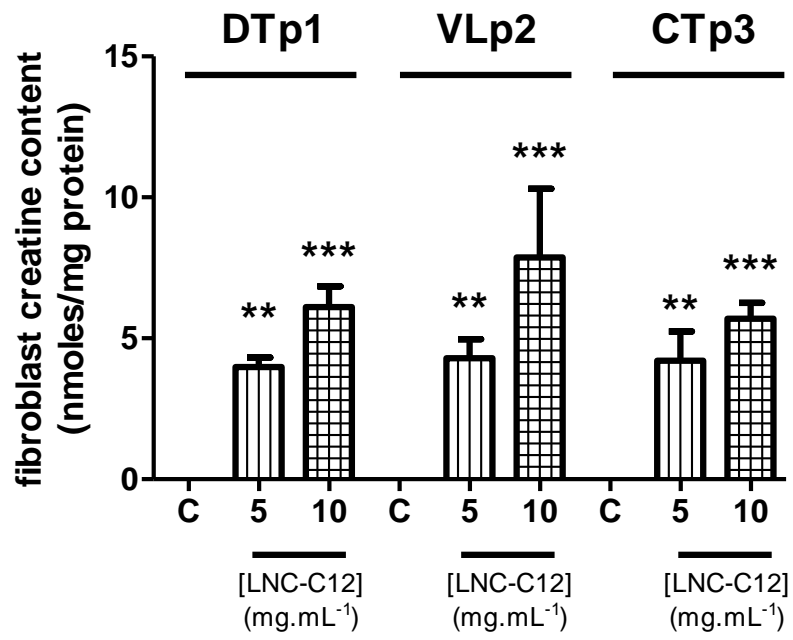


Figure 3:



## Table legends

**Table 1: Uptake of dodecyl creatine ester associated with LNC, in BBB endothelial cells and BBB glial cells, during translocation of LNC-C12 throughout the BBB.**

This table indicates the amount of dodecyl creatine ester as nmoles per mg protein quantified in BBB endothelial cell lysate and BBB glial cell lysate. No statistical significance was observed in the detection of dodecyl creatine ester after a 60-min incubation with 2, 5 or 10 mg.mL<sup>-1</sup> LNC-C12.

## Figure legends

**Figure 1: Creatine content in the BBB endothelial cell lysate (a) and astroglial cell lysate (b).** This graph indicates the amount of creatine as nmoles per mg protein quantified in BBB endothelial cell and astroglial lysates after a 60-min incubation with 2, 5 or 10 mg.mL<sup>-1</sup> LNC-C12 compared with the vehicle alone. \*:  $p < 0.05$  (ANOVA + Dunnett's post-test).

**Figure 2: Creatine content in human fibroblasts of control subject.** A 60-min incubation of 5 or 10 mg.mL<sup>-1</sup> LNC-C12 led to a significant increase compared with the vehicle alone (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; Anova + Dunnett's post-test) in creatine content in fibroblasts of the control subject.

**Figure 3: Significant increase of creatine content in human fibroblasts showing SLC6A8 deficiency.** A 60-min incubation of 5 or 10 mg.mL<sup>-1</sup> of LNC-C12 ([LNC-C12]: concentration of LNC-C12 in mg.mL<sup>-1</sup>) led to a significant increase compared with the control C (\*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; Anova + Dunnett's post-test) in creatine content in fibroblasts of patients with nonfunctional creatine transporter.

***CHAPITRE 5***  
***DISCUSSION***  
***PERSPECTIVES***  
***CONCLUSION GENERALE***

---



Le déficit en transporteur de la créatine est une maladie orpheline altérant le développement neurocognitif, due à une absence de créatine au niveau cérébral<sup>47</sup>. La créatine étant un dérivé d'acide aminé très polaire, connue pour ne pas passer la barrière hémato-encéphalique, elle nécessite la présence fonctionnelle du transporteur spécifique afin de permettre sa translocation dans le parenchyme cérébral<sup>43, 280-282</sup>. Dans le contexte pathologique du déficit en transporteur de la créatine, les mutations sur le gène codant pour ce transporteur conduisent à sa perte de fonctionnalité. Ceci annule donc la translocation de la créatine depuis la circulation sanguine vers le parenchyme cérébral à travers la BHE. Le déficit fonctionnel du transporteur supprime également les communications inter-cellulaires, notamment entre les cellules cérébrales responsables de la synthèse *in situ* (cellules gliales, neurones). Or, il est établi aujourd'hui que les deux mécanismes, transport depuis le plasma et synthèse intra-cérébrale sont impliqués dans l'approvisionnement du cerveau en créatine<sup>43</sup>.

L'objectif de cette thèse visait donc à développer des molécules prodrogues de la créatine permettant son internalisation cellulaire en l'absence d'un transporteur fonctionnel de la créatine, afin de proposer une thérapie palliant le déficit de ce transporteur de la créatine, aujourd'hui diagnostiqué mais non traité.

Un des rationnels communément établis en chimie thérapeutique est que l'augmentation de la lipophilie des molécules favorise la diffusion passive à travers les membranes cellulaires<sup>283</sup>.

Il est donc nécessaire de disposer de prodrogues lipophiles de créatine qui permettraient de libérer la créatine dans les cellules cibles. Ces prodrogues ne sont pas accessibles sur le marché, pourtant il en existe une série de brevets. La créatine présente deux fonctions caractéristiques exploitables pour le couplage : une guanidine et un acide carboxylique, ce qui permet de créer facilement des amides ou des esters de créatine respectivement. Ainsi, la préparation d'amides de créatine est décrite dans 3 brevets récents : WO 2008/101310, US2011/0269986 et WO 2009/143630. Le premier décrit des prodrogues de la créatine avec une liaison amide entre la créatine et un acide gras à chaîne saturée constitué de 3 à 21 carbones. Cette synthèse se déroule en deux étapes. La première consiste à faire réagir un acide gras avec un composé halogéné. Puis l'acide gras halogéné réagit dans le dichlorométhane avec la créatine en présence de pyridine comme catalyseur pour former l'amide de créatine. Dans ce brevet, aucune activité biologique n'est indiquée.

Trois ans plus tard, le brevet US 2011/0269986 décrit une autre façon de préparer des amides de créatine et présente des activités neuroprotectrices de ces composés. Ceux-ci sont préparés par guanidinylation de peptides sarcosine dans un solvant organique polaire à une température



inférieure à 50°C pour de meilleurs rendements. Différentes structures d'acides aminés de créatine sont obtenues et ces composés sont stables dans le plasma jusqu'à 3 heures. Leurs propriétés neuroprotectrices contre l'ischémie focale cérébrale ont été évaluées par des tests comportementaux chez le rat.

Enfin, des prodrogues constituées de créatine associée à des motifs sucrés via une liaison amide sont décrites dans le brevet WO 2009/143630. La réaction en trois étapes consiste en premier lieu à protéger les fonctions amines primaires et secondaires de la créatine. Puis la créatine protégée réagit avec un imino sucre dans le dichlorométhane en présence de dicyclohexylcarbodiimine qui active l'acide carboxylique de la créatine protégée. La dernière étape consiste à acidifier avec de l'acide trifluoro-acétique afin de déprotéger la molécule synthétisée et de stabiliser la fonction guanidine.

Trois brevets revendiquent également la préparation d'esters de créatine. Deux d'entre eux (US 2003/0212130 et US 2005/6897334) décrivent la synthèse d'esters gras de créatine par réaction de la créatine hydratée ou anhydre avec divers alcools dans une atmosphère acide. De nombreux esters gras ainsi que des structures à plusieurs motifs créatine liés par des liaisons esters sont décrits. Indépendamment, le brevet US 2005/00449428 décrit une synthèse directe des esters par réaction de la fonction acide carboxylique de la créatine anhydre avec un alcool gras en milieu acide et en présence d'un catalyseur  $\text{SOCl}_2$ . Le partenaire alcool est alors utilisé comme solvant. Ces molécules sont présentées comme ayant des propriétés anti-inflammatoires (US 2003/0212130). En effet, l'augmentation de la créatine dans la cellule permettrait l'inhibition de la production ou de la libération de médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines. Du fait de sa faible absorption, le monohydrate de créatine ne serait pas efficace mais un couplage ester à des molécules lipophiles permettrait d'augmenter sa perméabilité cellulaire. La prodrogue une fois internalisée serait clivée par des estérases et libérerait l'agent anti-inflammatoire : la créatine. Toutefois, il semble que seul l'ester éthylique ait été réellement synthétisé. Cependant, un seul résultat de test biologique montre l'intérêt thérapeutique de cet ester éthylique de créatine : suite à une stimulation des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales par le lipopolysaccharide bactérien, la libération des prostaglandines E2 est diminuée en présence de l'ester.

Les esters gras de créatine peuvent également être obtenus en utilisant comme précurseur de réaction non pas la créatine mais le créatinol où la fonction acide carboxylique est remplacée par une fonction hydroxyle. Selon le brevet WO 2009/076741, ce créatinol réagit dans une première étape avec un composé halogéné puis avec l'acide gras dans du dichlorométhane en présence d'un catalyseur acide pour former les esters de créatine.

Nous avons choisi de synthétiser des prodrogues de la créatine en greffant sur son squelette chimique des molécules lipophiles. Cet axe d'étude a fait l'objet d'une collaboration étroite avec Sophie Dézard et le Dr Frédéric Taran du Service de Chimie Bio organique et de Marquage (CEA-DSV). Nous avons sélectionné l'option du couplage par une liaison covalente de type ester entre l'acide carboxylique de la créatine et l'hydroxyle d'un alcool gras avec perte d'une molécule d'eau. En effet, les esters sont facilement hydrolysables dans les cellules par les estérases présentes naturellement. Ils libèreraient alors la créatine et un alcool gras à chaîne aliphatique variable. Les acides gras sont connus pour participer à la structure des membranes cellulaires et pour présenter des propriétés neurophysiologiques<sup>284-286</sup> : coupler la créatine à un composé endogène limite la probabilité que le produit de dégradation associé à la créatine lors du clivage présente une quelconque toxicité. Le couplage ester a été réalisé suivant une réaction classique d'estérification en chimie organique. Dans un premier temps, nous avons reproduit sans succès le brevet US 2005/6897334 pour obtenir les molécules à chaîne carbonée moyenne ou longue (au-delà du butyle).

Nous avons alors choisi de réaliser une préparation de ces esters selon un protocole novateur avec un choix original du réactif initial de la synthèse. Au cours des essais, nous avons constaté que lors de la réaction de la créatine di-protégée avec les alcools gras à longue chaîne en milieu acide, nous n'obtenions pas les produits voulus mais au contraire la créatinine par cyclisation de la créatine en milieu acide. Nous avons alors réalisé le couplage à partir de la créatinine dont le carbonyle est activé par protection des amines primaire et secondaire du motif guanidine. L'hydroxyle de l'alcool gras réalise alors une attaque nucléophile sur ce carbonyle activé conduisant à la liaison ester et la production d'une librairie de molécules d'esters gras de créatine.

L'estimation des paramètres physico-chimiques des molécules de cette chimiothèque nous permet de considérer qu'elles présentent des propriétés de candidats médicaments intéressantes, tout au moins sur le plan physico-chimique. En effet, la modification apportée sur le squelette chimique de la créatine diminue le nombre de donneurs et accepteurs d'hydrogène, ainsi que la surface polaire (puisque la fonction acide carboxylique est maintenant masquée), tout en augmentant de façon importante la lipophilicité des molécules.

Les molécules de la chimiothèque peuvent être classées en trois catégories : des esters de créatine à courte chaîne (éthyle, butyle) faiblement lipophiles, des esters à chaîne moyenne (octyle, nonyle) à lipophilie moyenne et des esters à longues chaînes (dodécyle, octadécyle) à forte lipophilie. Ces développements chimiques ont été réalisés en lien étroit avec la biologie, ce qui explique que nous n'ayons pas développé de structure au-delà de l'octadécyle. En effet, le dérivé octadécylique

présentait déjà un logP théorique limite au regard des recommandations en chimie thérapeutique et, d'autre part, en raison de ses capacités limitées de dissolution dans les milieux aqueux. En effet, les molécules très lipophiles peu solubles dans les milieux aqueux seront mal absorbées *in vivo*, ce qui limite leur utilisation comme agent thérapeutique.

Au cours de la mise en place des méthodes analytiques d'identification des esters, nous avons montré la faible solubilité des esters à moyenne et longue chaîne carbonée dans les solvants organiques ainsi que leur très faible stabilité dans les milieux biologiques où une dégradation spontanée et non enzymatique peut avoir lieu. Ceci a été décrit précédemment dans Katseres et al. et Giese et al.<sup>275, 277</sup>. Les esters ne sont pas stables dans des tampons à pH physiologiques (demi-vie estimée de l'ester éthylique de créatine de 56 secondes à pH=7.4). En diminuant le pH, on augmente la durée de vie de l'ester éthylique et ceci jusqu'à 22 jours à pH=1. A pH physiologique, le carboxylate de l'ester est beaucoup plus électrophile que celui de la créatine pour deux raisons : tout d'abord la liaison ester fait que ce carboxylate n'est plus chargé négativement à ce pH contrairement à la créatine<sup>277</sup>, d'autre part, il existe une liaison hydrogène entre l'atome de carbone de la guanidine et l'atome d'oxygène du carbonyle mais beaucoup moins forte que celle de la créatine<sup>275</sup>. Cela permet de favoriser l'attaque nucléophile de la guanidine et de conduire à la recyclisation du composé en créatinine, en libérant une molécule d'eau et l'alcool gras. A pH plus acide, la guanidine est protonnée et cela limite l'attaque nucléophile, stabilisant l'ester en solution. Nos expérimentations confirment que la dilution des échantillons dans un solvant organique acidifié (acétonitrile + acide formique) permet de maintenir la stabilité des esters de créatine en solution.

#### *Passage cérébral des esters de créatine :*

La chimiothèque synthétisée a été évaluée pour ses propriétés pharmacologiques sur des modèles *in vitro*.

Nous démontrons que les esters de créatine lipophiles (octyle, nonyle, dodécyle et octadécyle) peuvent être internalisés non seulement dans les cellules endothéliales mais également dans les cellules gliales du modèle *in vitro* de BHE, ce qui traduit leur capacité à franchir la BHE pour gagner le système nerveux central. Des quatre, le meilleur candidat pour l'internalisation semble être l'ester dodécylique. Au contraire, les esters faiblement lipophiles (éthyle, butyle) ne présentent pas cette propriété. Seule la proportion d'ester ayant traversé les cellules endothéliales peut être internalisé dans les cellules gliales, il est donc logique d'obtenir la même classification dans les deux types cellulaires. D'une certaine manière, ce résultat nous a surpris car il signifiait que les esters n'avaient pas été hydrolysés par les estérases cellulaires endothéliales et qu'ils pouvaient être libérés intègres

du côté du parenchyme cérébral. Nous avons alors émis deux hypothèses conjointes: la première repose sur l'activité estérasique dans les cellules endothéliales qui n'est pas à son maximum d'activité à 60 minutes, ce qui conduit probablement au clivage partiel de l'ester. Cette libération de créatine est alors probablement trop faible pour induire une augmentation détectable par nos conditions analytiques, au regard des quantités de créatine endogène présentes dans les cellules. De plus, cela sous-entend que la cinétique de franchissement de la BHE est plus rapide que la cinétique de clivage de l'ester.

Lorsque nous avons quantifié la créatine, nous avons observé qu'il n'y avait pas d'augmentation de celle-ci ni dans les lysats cellulaires (endothéliaux ou gliaux) ni dans le compartiment basolatéral. En revanche, une faible augmentation était détectable dans le surnageant apical, qui pourrait traduire un clivage partiel de l'ester suivi de l'excrétion de cette créatine puisque nous avons démontré qu'à faibles concentrations, le passage de la créatine se réalisait du sang vers le cerveau et vice versa. Les expériences que nous avons menées sur le modèle *in vitro* de BHE ne nous ont pas permis de mettre en évidence un transport actif de la créatine dans les cellules endothéliales dans nos conditions expérimentales pour des concentrations de 0.5 à 50  $\mu\text{M}$ , du même ordre de grandeur que le  $K_m$  de 16  $\mu\text{M}$  proposé par Ohtsuki et al. <sup>43</sup> pour le transporteur. Au contraire, il semble que, pour des concentrations de l'ordre de 10 ou 100 fois supérieures au  $K_m$ , soit 100 et 2000  $\mu\text{M}$ , nous soyons en présence d'un efflux de la créatine, les constantes de perméabilité étant plus importantes dans le sens cerveau-sang que sang-cerveau. D'autre part, l'impact de l'inhibiteur spécifique, l'acide guanidinopropionique, sur la diminution des constantes de perméabilité tend à montrer que le transporteur de la créatine est mis en jeu dans le passage de fortes concentrations de créatine du sang vers le cerveau mais également du cerveau vers le sang. Ceci suggère donc une double localisation du transporteur de la créatine, sur les faces luminale et abluminale des cellules endothéliales de la BHE. La littérature propose à l'heure actuelle une localisation luminale et abluminale du transporteur de la créatine <sup>79</sup> mais aucun mécanisme n'est évoqué pour expliquer comment la créatine est libérée des cellules.

Loike et al. décrit que des cellules maintenues pendant 24h dans un milieu avec une concentration de créatine égale à la concentration plasmatique (20-30  $\mu\text{M}$ ), conduisent à une diminution de 50% de l'incorporation cellulaire de créatine par rapport à des cellules cultivées en l'absence de créatine <sup>287</sup>. Cela représente la même capacité d'inhibition qu'une dose de 5 mM d'acide guanidinopropionique. Lorsque la concentration de créatine est de 5 mM, cette diminution atteint 80%. Ces auteurs décrivent que le transfert de ces cellules « nourries » en créatine dans du milieu sans créatine, que l'on supplémente au bout d'un temps défini par de la créatine, ne permet pas la restauration de

l'internalisation à 8h et qu'il faut attendre un minimum de 24h pour restaurer une fonction de transport de la créatine. D'autre part, il semble que la créatine extracellulaire joue peu de rôle sur les transferts transmembranaires de créatine et que ce soit au contraire la créatine intracellulaire qui joue le rôle de régulateur sur le nombre de transporteurs à la membrane ou le turnover de la protéine<sup>287</sup>. Cette étude a été menée sur une lignée myoblastique L6 humaine incapable de biosynthèse de la créatine. A la lumière de ces observations, nous supposons que l'absence de transport caractérisé comme actif en présence de concentrations faibles de créatine n'exclut pas la présence réelle d'un transporteur fonctionnel. En revanche, si le transport est stimulé par un signal de créatine intracellulaire probablement diminué, notre temps expérimental de 2h est trop court pour que nous puissions l'observer. De plus, nos cellules étant capables de biosynthétiser la créatine, il n'est pas sûr que nous soyons en mesure de détecter un tel transport.

Les travaux de Loike et al. suggéraient que la régulation négative du transport par la créatine avait pour but d'empêcher l'accumulation d'une concentration intracellulaire excessive dans les cellules<sup>287</sup>. Ceci était probablement vrai pour les myoblastes mais, au niveau central, il a été démontré que le transport de la créatine n'était pas limité. Toutefois, aucune preuve n'appuie à ce jour un stockage indéfini de la créatine dans les cellules.

Il est possible d'imaginer que si le transporteur de la créatine est exprimé et fonctionnel aux deux pôles de la cellule endothéliale, sa fonction et son Km soient différents, principalement en raison de la différence de concentration de créatine entre le plasma (272  $\mu$ M) et le cerveau (10 mM). Il est peut-être également possible que la créatine soit prise en charge dans notre modèle par d'autres systèmes de transport non caractérisés de type transporteurs d'acides aminés. Enfin, il est très difficile de comparer nos données à celles de Loike et al. car notre système situe les cellules à l'interface de deux compartiments, ce qui définit des échanges plus complexes entre les surnageants et le milieu intracellulaire.

Quoi qu'il en soit, ces études mécanistiques ont été réalisées en marge de l'objectif de l'étude puisque les esters de créatine de par leur structure ne peuvent pas être reconnus par le transporteur de la créatine puisque la fonction carboxylique est camouflée<sup>20</sup>. La présence ou l'absence du transporteur n'influera pas sur les résultats d'internalisation des esters mais elle pourra jouer sur le devenir de la créatine issue du clivage, notamment en termes d'efflux tel qu'on l'observe expérimentalement.

*Intérêt thérapeutique de l'ester dodécylrique de la créatine :*

La relation structure-activité étudiée par l'internalisation des esters de créatine dans les cellules neuronales confirme que l'ester dodécylrique de créatine présente les meilleures caractéristiques physico-chimiques pour le franchissement des membranes cellulaires et nous avons confirmé que ce passage ne nécessitait pas la fonctionnalité du transporteur de la créatine. En effet, l'ester dodécylrique est capable de pénétrer dans des fibroblastes issus des 3 patients atteints du déficit en transporteur de la créatine. Nous estimons donc que le mécanisme de passage de ces esters à travers les membranes cellulaires se fait par diffusion passive ou par le biais d'autres transporteurs non identifiés. Lorsqu'on étudie la conversion de l'ester en créatine dans les cellules pathologiques dont le transporteur de la créatine n'est plus fonctionnel, nous observons une apparition de créatine dans les lysats des cellules fibroblastiques, ce qui signifie que l'ester a été clivé par les estérases cellulaires. Nous validons ainsi l'intérêt thérapeutique de l'ester dodécylrique de créatine dans le traitement du déficit en transporteur de la créatine.

Les experts en chimie thérapeutique s'accordent aussi pour dire qu'il faut éviter les liaisons esters dans le développement de composés pour la chimie médicinale car ce sont des liaisons fragiles en biologie puisqu'un grand nombre d'enzymes peuvent hydrolyser ces esters. Leur durée de vie dans l'organisme est donc très limitée. Il est admis que s'ils ne subissent pas d'hydrolyse enzymatique, les esters administrés *per os* sont intacts jusqu'à ce qu'ils arrivent au niveau de l'intestin grêle, le pH de la salive ainsi que celui de l'estomac étant acides contrairement à celui de l'intestin<sup>275</sup>. Mais ils ne sont pas stables dans le plasma et donc ne gagneront aucune cible cellulaire sans être dégradés.

Nous avons en effet constaté que notre candidat préférentiel, l'ester dodécylrique de créatine ne pouvait pas être administré *in vivo* puisqu'il est 1) immédiatement hydrolysé de façon non enzymatique en créatinine par l'incubation à 37°C et pH physiologique et 2) immédiatement clivé par les estérases plasmatiques pour libérer la créatine.

Ceci a été pris en considération en parallèle de l'étude d'optimisation pharmacologique des esters de la créatine et nous avons imaginé une stratégie reposant sur l'utilisation d'un système nanoparticulaire, les nanocapsules lipidiques (ou NCL), qui présentent alors un double intérêt. Elles permettent de protéger la structure chimique mais elles peuvent également faire l'objet de modifications chimiques à façon afin d'augmenter leur furtivité dans l'organisme et leur ciblage des cellules cibles. La préparation de ces formulations de NCL a reposé sur une collaboration étroite avec

les Pr Jean-Pierre Benoit et Catherine Passirani et avec Jérôme Béjaud (INSERM U1066 – Micro et Nanomédecines Biomimétiques / LUNAM – Université d'Angers).

*NCL et passage de la BHE in vitro :*

Dans un premier temps, nous avons réalisé la preuve de concept du passage de la BHE par les NCL. Pour cela, nous avons exploité une première génération de NCL chargées en fluorochrome DiD. Ces NCL ont été principalement exploitées pour la mise en place des protocoles expérimentaux : validation du passage spontané des NCL à travers les pores (0.2 µm) des membranes semi-perméables utilisées pour ensemercer les cellules endothéliales, expérimentations réalisées sans agitation pour faciliter les interactions avec les cellules, et menées dans le milieu de culture préférentiellement à un tampon aqueux. Les premières expériences menées sur ces NCL-DiD présentant un greffage avec un anticorps reconnaissant le récepteur à la transferrine (OX26) n'ont pas révélé de capacité à franchir notre modèle *in vitro* de BHE. Nous nous sommes donc tournés vers une stratégie de ciblage encore peu exploitée à l'heure actuelle, via le récepteur à l'insuline. Dans le même temps, était publiée la toute première étude, et à ce jour la seule, exploitant le ciblage du récepteur à l'insuline pour le passage intra-cérébral de nanoparticules d'albumine de sérum humain (NP HSA) encapsulant du lopéramide, un agent anti-nociceptif. Les travaux d'Ulbrich et al. montrent ainsi une augmentation significative de l'effet antidouleur du lopéramide *in vivo* chez la souris lorsqu'il est encapsulé dans des NP HSA portant à leur surface l'insuline liée de façon covalente<sup>238</sup>. Des données comparables sont obtenues si on lie à la surface des NP HSA l'anticorps spécifique du récepteur à l'insuline le 29B4. Ils ont également démontré que l'internalisation des NP HSA lopéramide mettait bien en jeu le récepteur à l'insuline permettant l'endocytose puis la transcytose des nanoparticules.

Nous avons tout d'abord envisagé un couplage des NCL avec un anticorps reconnaissant le récepteur à l'insuline. Toutefois, un bref calcul nous a permis de constater que le couplage avec la protéine insuline directement reviendrait 1600 fois moins cher pour la préparation d'une seule formulation, ce qui ne serait pas négligeable si l'on imagine une transposition industrielle du processus de préparation. En parallèle, le DiD a été remplacé par une molécule marqueur (l'amiodarone) qui était beaucoup plus adaptée à l'étude du passage de la BHE parce que facilement identifiable par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Une seconde génération de NCL-amiodarone (NCL, NCL-Peg et NCL-PegIns) a donc été développée suivant un protocole existant au laboratoire<sup>267</sup>. Elle nous a permis de valider les propriétés intéressantes des NCL en termes d'internalisation dans les cellules endothéliales de la BHE et de

translocation dans le parenchyme cérébral. Toutefois, dans le modèle de BHE *in vitro*, nous n'avons pas pu bien mettre en évidence l'intérêt de la pégylation et du ciblage actif dans le franchissement de la BHE : bien que les NCL-Peg et NCL-PegIns soient plus internalisées plus rapidement, les NCL non pégylées présentent aussi des propriétés intéressantes en termes de passage cérébral. Deux raisons peuvent expliquer cela : tout d'abord, le système est beaucoup plus simple que l'organisme et les NCL ne peuvent pas activer la reconnaissance par le système réticulo-endothélial, ce qui conduit *in vivo* à l'extraction des NCL non pégylées du plasma et donc à l'absence d'interaction avec les cellules cibles. De plus, il est probable que, pendant l'expérience, les protéines du milieu de culture puissent recouvrir les NCL et favoriser leur internalisation cellulaire via d'autres interactions ligand-récepteur, comme par exemple le récepteur aux lipoprotéines (LRP) qui reconnaît les apolipoprotéines et peut favoriser l'entrée dans les cellules<sup>288</sup>. Les différences d'internalisation endothéliale sur les temps de cinétique précoces semblent indiquer que l'entrée des NCL est un phénomène plus lent que celle des NCL-Peg et NCL-PegIns. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la quantité maximale de nanoparticules internalisée à 96h ne diffère pas entre les trois formulations.

*NCL pour protéger et vectoriser l'ester dodécylrique de créatine :*

Dans un second temps, nous avons exploité les NCL comme formulation galénique pour l'administration des esters de créatine. Dans le contexte pathologique du déficit en transporteur de la créatine, il n'est pas intéressant d'encapsuler la créatine dans ces nanovecteurs puisqu'elle ne pourrait pas exercer son action thérapeutique au niveau cérébral en raison de l'absence de transporteur fonctionnel à la membrane neuronale.

Nos données indiquent que ces NCL-C12 semblent présenter la capacité de franchir la BHE dans un modèle *in vitro* : nous retrouvons notamment de l'ester dodécylrique dans les cellules endothéliales et gliales après incubation avec les NCL-C12 et le profil de répartition entre les cellules endothéliales et les cellules gliales est en faveur de ces dernières, contrairement à l'ester seul. L'encapsulation de l'ester dodécylrique de créatine et sa libération dans le cerveau permettent un processus en deux étapes. Tout d'abord, l'administration des NCL-C12 chez le patient protégerait la molécule active d'une dégradation dans la circulation plasmatique et permettrait de franchir la BHE puis de libérer l'ester dodécylrique dans le parenchyme cérébral. Dans un second temps, l'ester ainsi libéré pourrait franchir par diffusion passive les membranes neuronales des patients atteints du déficit en transporteur (comme l'indiquent les expériences menées sur les fibroblastes de patients) et être clivé en créatine dans les cellules afin de conduire son action thérapeutique.



Au cours des tests de stabilité dans le plasma, nous observons la disparition complète du signal de l'ester dodécylrique en solution, en quelques minutes, contrairement à l'association NCL-C12 pour laquelle le signal est maintenu, signe qu'il n'y a donc pas eu de dégradation de l'ester. La formulation par nanocapsules lipidiques permettrait donc de protéger la structure chimique de l'ester dodécylrique de créatine, ce qui limiterait sa dégradation dans les fluides biologiques. Une fois dans la circulation plasmatique, il semble que ces NCL s'entourent de protéines puisque nos essais de stabilité dans le plasma montrent une absence d'augmentation des concentrations de créatine avec l'augmentation des durées d'incubation, ce qui serait un bon indicateur secondaire du maintien de l'intégrité de l'ester dodécylrique de créatine dans les NCL-C12. Toutefois, en raison d'un protocole de préparation d'échantillon qui reste à optimiser, nous ne pouvons valider l'absence de clivage.

Afin d'encapsuler l'ester dodécylrique de créatine dans les NCL, nous avons modifié le mode de préparation en ajoutant dans la composition du Transcutol®, seul constituant permettant de solubiliser l'ester à froid et de l'ajouter au dernier cycle et seule possibilité pour l'encapsuler dans les NCL sans conduire à sa dégradation totale. Sachant que le Transcutol® s'intègre dans la capsule formée par les tensioactifs plutôt que dans le cœur lipophile des NCL, nous pouvons supposer que l'ester s'incorpore également dans la capsule. Néanmoins, nous pouvons considérer que le signal d'ester dodécylrique obtenu lors des quantifications de NCL-C12 non purifiées provient bien de l'ester associé aux NCL et non pas libre, car les NCL sont en solution aqueuse et l'ester dodécylrique n'étant pas stable en solution, il serait dégradé s'il était présent sous sa forme libre.

D'après nos résultats expérimentaux, il ressort que les NCL-C12 sont des outils exploitables pour imaginer une stratégie thérapeutique du déficit en transporteur de la créatine reposant sur l'administration d'ester dodécylrique de créatine protégé dans une nanocapsule lipidique.

En **perspectives**, il serait profitable de réaliser une optimisation du procédé de synthèse chimique : augmenter les rendements obtenus par un recyclage des sous-produits ainsi qu'améliorer les conditions de purification des esters de créatine.

D'autre part, il serait intéressant de compléter ces données par une étude *in vivo*. Nous avons validé la faisabilité d'une telle étude car les résultats des tests de capture macrophagique, d'activation du complément et de dosage des endotoxines montrent que les NCL ne présentent pas de propension à induire une réponse immunitaire inappropriée. Elles sont donc tout à fait exploitables pour l'administration chez l'animal.

Toutefois, il reste cependant à bien caractériser la position de l'ester dodécylique dans la structure des NCL. En effet, l'acquisition de propriétés de furtivité par le greffage de poly-éthylène glycols (PEG) en surface est fondamentale pour l'administration *in vivo*. Il reste donc à produire ces formulations en trouvant les conditions optimales pour ne pas extraire l'ester des NCL en réalisant les post-insertions de PEG. Ces expérimentations *in vivo* pourraient exploiter un modèle de souris transgénique déficiente en transporteur de la créatine développé très récemment par l'équipe de Vorhees ; ce modèle permettrait une validation pré-clinique de la formulation NCL-C12<sup>182</sup>.

En outre, nous pourrions imaginer d'autres stratégies de couplage chimique à la créatine. Plutôt qu'augmenter la lipophilie de la molécule, il serait envisageable de réaliser un ciblage actif de la molécule par une reconnaissance ligand-récepteur. Ainsi, nous pouvons coupler un ligand de type glucose par une liaison covalente de type ester. Le glucose reconnaît ses récepteurs spécifiques, la famille des récepteurs au glucose (GLUT), exprimés par les cellules neuronales. Il serait alors intéressant d'évaluer la pénétration cérébrale et le ciblage neuronal de cet ester de glucose. Cette molécule présente l'avantage de pouvoir être marquée au Fluor 18 afin d'être un outil traceur exploitable en imagerie médicale. Cela pourrait permettre, par exemple, la validation clinique de l'intérêt de l'ester glucosé de créatine dans le traitement du déficit en transporteur de la créatine ainsi que le suivi du traitement des patients.

Enfin, nous pourrions développer d'autres approches pour protéger la structure chimique de l'ester sans avoir recours à l'encapsulation dans un nanovecteur comme, par exemple, l'utilisation d'un contre-ion qui interagirait avec la guanidine et permettrait la formation spontanée de micelles (auto-structuration de la molécule).

**Somme toute**, cette thèse se positionne dans le cadre du développement de médicaments à visée pédiatrique. En effet, le déficit en transporteur de la créatine se diagnostique dans l'enfance et il est possible d'imaginer qu'un traitement conduisant à l'augmentation de la créatine cérébrale permettrait de réverser les troubles neuro-cognitifs. Il est donc important de savoir qu'il existe, depuis 2006, des lignes directrices particulières concernant le développement de médicaments pédiatriques, régies par le Règlement Européen sur les Médicaments Pédiatriques (EC 1901/2006) et complétées par la Recommandation ICHE E1 (3) LEEM : « les enfants en sont pas des adultes en miniature » (Dr Jacqz-Aigrain, Enjeux médicaux, janvier 2010). Le Plan d'Investigation Pédiatrique déposé auprès de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) doit ainsi faire état du développement d'une formulation galénique stable et d'usage aisé avec une absence de solvants au

cours des préparations <sup>289</sup>. Un exemple malheureux est celui de l'élixir sulfanilamide, utilisé comme anti-streptococcique et formulé avec du diéthylène glycol, qui causa le décès de plus de 100 enfants en 1937. Nous avons développé une formulation galénique (NCL) dont la préparation ne nécessite aucun solvant ou composé toxique. Les constituants de ces NCL sont biocompatibles et autorisés par la « Food and Drug Administration ». De plus, l'utilisation des solvants en synthèse chimique est très contrôlée et les esters de créatine finaux en sont exempts lorsqu'ils sont purifiés par LC-MS. Ces formulations de NCL sont d'utilisation facile car nous pourrions tout à fait imaginer une administration *per os* chez les patients <sup>259</sup>.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---



1. Beard, E.; Braissant, O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* **2010**, *115*, 297-313.
2. Fiske, C. H.; Subbarow, Y. The Nature of the "Inorganic Phosphate" in Voluntary Muscle. *Science* **1927**, *65*, 401-3.
3. Harris, R. C.; Soderlund, K.; Hultman, E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)* **1992**, *83*, 367-74.
4. Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. Creatine metabolism and the urea cycle. *Mol Genet Metab* **2010**, *100* Suppl 1, S49-52.
5. Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* **2000**, *80*, 1107-213.
6. da Silva, R. P.; Nissim, I.; Brosnan, M. E.; Brosnan, J. T. Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**, *296*, E256-61.
7. Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr* **2007**, *27*, 241-61.
8. Braissant, O.; Henry, H.; Loup, M.; Eilers, B.; Bachmann, C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* **2001**, *86*, 193-201.
9. Lee, H.; Kim, J. H.; Chae, Y. J.; Ogawa, H.; Lee, M. H.; Gerton, G. L. Creatine synthesis and transport systems in the male rat reproductive tract. *Biol Reprod* **1998**, *58*, 1437-44.
10. Wada, T.; Shimbo, H.; Osaka, H. A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes. *Amino Acids* **2012**, *43*, 993-7.
11. Brosnan, M. E.; Brosnan, J. T. Renal arginine metabolism. *J Nutr* **2004**, *134*, 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S.
12. Stead, L. M.; Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E.; Vance, D. E.; Jacobs, R. L. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr* **2006**, *83*, 5-10.
13. Edison, E. E.; Brosnan, M. E.; Meyer, C.; Brosnan, J. T. Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* **2007**, *293*, F1799-804.
14. Guthmiller, P.; Van Pilsum, J. F.; Boen, J. R.; McGuire, D. M. Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 17556-60.
15. Lee, H.; Ogawa, H.; Fujioka, M.; Gerton, G. L. Guanidinoacetate methyltransferase in the mouse: extensive expression in Sertoli cells of testis and in microvilli of caput epididymis. *Biol Reprod* **1994**, *50*, 152-62.
16. Walker, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1979**, *50*, 177-242.
17. Ireland, Z.; Dickinson, H.; Snow, R.; Walker, D. W. Maternal creatine: does it reach the fetus and improve survival after an acute hypoxic episode in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*)? *Am J Obstet Gynecol* **2008**, *198*, 431 e1-6.
18. Cannata, D. J.; Ireland, Z.; Dickinson, H.; Snow, R. J.; Russell, A. P.; West, J. M.; Walker, D. W. Maternal creatine supplementation from mid-pregnancy protects the diaphragm of the newborn spiny mouse from intrapartum hypoxia-induced damage. *Pediatr Res* **2010**, *68*, 393-8.
19. Moller, A.; Hamprecht, B. Creatine transport in cultured cells of rat and mouse brain. *J Neurochem* **1989**, *52*, 544-50.
20. Guimbal, C.; Kilimann, M. W. A Na(+)-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney. cDNA cloning and functional expression. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 8418-21.
21. Dai, W.; Vinnakota, S.; Qian, X.; Kunze, D. L.; Sarkar, H. K. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Arch Biochem Biophys* **1999**, *361*, 75-84.

22. Nash, S. R.; Giros, B.; Kingsmore, S. F.; Rochelle, J. M.; Suter, S. T.; Gregor, P.; Seldin, M. F.; Caron, M. G. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels* **1994**, *2*, 165-74.
23. Snow, R. J.; Murphy, R. M. Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol Cell Biochem* **2001**, *224*, 169-81.
24. Guerrero-Ontiveros, M. L.; Wallimann, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* **1998**, *184*, 427-37.
25. Gregor, P.; Nash, S. R.; Caron, M. G.; Seldin, M. F.; Warren, S. T. Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD. *Genomics* **1995**, *25*, 332-3.
26. Sandoval, N.; Bauer, D.; Brenner, V.; Coy, J. F.; Drescher, B.; Kioschis, P.; Korn, B.; Nyakatura, G.; Poustka, A.; Reichwald, K.; Rosenthal, A.; Platzer, M. The genomic organization of a human creatine transporter (CRTR) gene located in Xq28. *Genomics* **1996**, *35*, 383-5.
27. Iyer, G. S.; Krahe, R.; Goodwin, L. A.; Doggett, N. A.; Siciliano, M. J.; Funanage, V. L.; Proujansky, R. Identification of a testis-expressed creatine transporter gene at 16p11.2 and confirmation of the X-linked locus to Xq28. *Genomics* **1996**, *34*, 143-6.
28. Peral, M. J.; Garcia-Delgado, M.; Calonge, M. L.; Duran, J. M.; De La Horra, M. C.; Wallimann, T.; Speer, O.; Ilundain, A. Human, rat and chicken small intestinal Na<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> -creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J Physiol* **2002**, *545*, 133-44.
29. Mak, C. S.; Waldvogel, H. J.; Dodd, J. R.; Gilbert, R. T.; Lowe, M. T.; Birch, N. P.; Faull, R. L.; Christie, D. L. Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. *Neuroscience* **2009**, *163*, 571-85.
30. Xu, W.; Liu, L.; Gorman, P. A.; Sheer, D.; Emson, P. C. Assignment of the human creatine transporter type 2 (SLC6A10) to chromosome band 16p11.2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **1997**, *76*, 19.
31. Bayou, N.; M'Rad, R.; Belhaj, A.; Daoud, H.; Zemni, R.; Briault, S.; Helayem, M. B.; Ben Jemaa, L.; Chaabouni, H. The creatine transporter gene paralogous at 16p11.2 is expressed in human brain. *Comp Funct Genomics* **2008**, 609684.
32. Eichler, E. E.; Lu, F.; Shen, Y.; Antonacci, R.; Jurecic, V.; Doggett, N. A.; Moyzis, R. K.; Baldini, A.; Gibbs, R. A.; Nelson, D. L. Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum Mol Genet* **1996**, *5*, 899-912.
33. Grunau, C.; Hindermann, W.; Rosenthal, A. Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes. *Hum Mol Genet* **2000**, *9*, 2651-63.
34. Chen, N. H.; Reith, M. E.; Quick, M. W. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* **2004**, *447*, 519-31.
35. Gether, U.; Andersen, P. H.; Larsson, O. M.; Schousboe, A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, *27*, 375-83.
36. Kristensen, A. S.; Andersen, J.; Jorgensen, T. N.; Sorensen, L.; Eriksen, J.; Loland, C. J.; Stromgaard, K.; Gether, U. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev* **2011**, *63*, 585-640.
37. Dodd, J. R.; Christie, D. L. Selective amino acid substitutions convert the creatine transporter to a gamma-aminobutyric acid transporter. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 15528-33.
38. Sora, I.; Richman, J.; Santoro, G.; Wei, H.; Wang, Y.; Vanderah, T.; Horvath, R.; Nguyen, M.; Waite, S.; Roeske, W. R.; et al. The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *204*, 419-27.
39. Speer, O.; Neukomm, L. J.; Murphy, R. M.; Zanolta, E.; Schlattner, U.; Henry, H.; Snow, R. J.; Wallimann, T. Creatine transporters: a reappraisal. *Mol Cell Biochem* **2004**, *256-257*, 407-24.

40. Betsalel, O. T.; Pop, A.; Rosenberg, E. H.; Fernandez-Ojeda, M.; Jakobs, C.; Salomons, G. S. Detection of variants in SLC6A8 and functional analysis of unclassified missense variants. *Mol Genet Metab* **2012**, 105, 596-601.
41. Tosco, M.; Faelli, A.; Sironi, C.; Gastaldi, G.; Orsenigo, M. N. A creatine transporter is operative at the brush border level of the rat jejunal enterocyte. *J Membr Biol* **2004**, 202, 85-95.
42. Garcia-Delgado, M.; Peral, M. J.; Cano, M.; Calonge, M. L.; Ilundain, A. A. Creatine transport in brush-border membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *J Am Soc Nephrol* **2001**, 12, 1819-25.
43. Ohtsuki, S.; Tachikawa, M.; Takanaga, H.; Shimizu, H.; Watanabe, M.; Hosoya, K.; Terasaki, T. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**, 22, 1327-35.
44. van de Kamp, J. M.; Jakobs, C.; Gibson, K. M.; Salomons, G. S. New insights into creatine transporter deficiency: the importance of recycling creatine in the brain. *J Inherit Metab Dis* **2012**, 36, 155-6.
45. Tachikawa, M.; Ikeda, S.; Fujinawa, J.; Hirose, S.; Akanuma, S.; Hosoya, K. gamma-Aminobutyric acid transporter 2 mediates the hepatic uptake of guanidinoacetate, the creatine biosynthetic precursor, in rats. *PLoS One* **2012**, 7, e32557.
46. Wallimann, T.; Tokarska-Schlattner, M.; Schlattner, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* **2011**, 40, 1271-96.
47. Stockler, S.; Schutz, P. W.; Salomons, G. S. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* **2007**, 46, 149-66.
48. Braissant, O.; Henry, H. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. *J Inherit Metab Dis* **2008**, 31, 230-9.
49. Braissant, O.; Henry, H.; Villard, A. M.; Zurich, M. G.; Loup, M.; Eilers, B.; Parlascino, G.; Matter, E.; Boulat, O.; Honegger, P.; Bachmann, C. Ammonium-induced impairment of axonal growth is prevented through glial creatine. *J Neurosci* **2002**, 22, 9810-20.
50. Braissant, O.; Bachmann, C.; Henry, H. Expression and function of AGAT, GAMT and CT1 in the mammalian brain. *Subcell Biochem* **2007**, 46, 67-81.
51. Tachikawa, M.; Fukaya, M.; Terasaki, T.; Ohtsuki, S.; Watanabe, M. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glial relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci* **2004**, 20, 144-60.
52. Schmidt, A.; Marescau, B.; Boehm, E. A.; Renema, W. K.; Peco, R.; Das, A.; Steinfeld, R.; Chan, S.; Wallis, J.; Davidoff, M.; Ullrich, K.; Waldschutz, R.; Heerschap, A.; De Deyn, P. P.; Neubauer, S.; Isbrandt, D. Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. *Hum Mol Genet* **2004**, 13, 905-21.
53. Nakashima, T.; Tomi, M.; Tachikawa, M.; Watanabe, M.; Terasaki, T.; Hosoya, K. Evidence for creatine biosynthesis in Muller glia. *Glia* **2005**, 52, 47-52.
54. Dringen, R.; Verleysdonk, S.; Hamprecht, B.; Willker, W.; Leibfritz, D.; Brand, A. Metabolism of glycine in primary astroglial cells: Synthesis of creatine, serine, and glutathione. *Journal of Neurochemistry* **1998**, 70, 835-840.
55. Tachikawa, M.; Fujinawa, J.; Takahashi, M.; Kasai, Y.; Fukaya, M.; Sakai, K.; Yamazaki, M.; Tomi, M.; Watanabe, M.; Sakimura, K.; Terasaki, T.; Hosoya, K. Expression and possible role of creatine transporter in the brain and at the blood-cerebrospinal fluid barrier as a transporting protein of guanidinoacetate, an endogenous convulsant. *J Neurochem* **2008**, 107, 768-78.
56. Tachikawa, M.; Kasai, Y.; Takahashi, M.; Fujinawa, J.; Kitaichi, K.; Terasaki, T.; Hosoya, K. The blood-cerebrospinal fluid barrier is a major pathway of cerebral creatinine clearance: involvement of transporter-mediated process. *J Neurochem* **2008**, 107, 432-42.
57. Braissant, O.; Beard, E.; Torrent, C.; Henry, H. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol Dis* **2010**, 37, 423-33.



- 
58. Braissant, O.; Gotoh, T.; Loup, M.; Mori, M.; Bachmann, C. L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* **1999**, *70*, 231-41.
59. Carducci, C.; Santagata, S.; Adriano, E.; Artiola, C.; Thellung, S.; Gatta, E.; Robello, M.; Florio, T.; Antonozzi, I.; Leuzzi, V.; Balestrino, M. In vitro study of uptake and synthesis of creatine and its precursors by cerebellar granule cells and astrocytes suggests some hypotheses on the physiopathology of the inherited disorders of creatine metabolism. *BMC Neurosci* **2012**, *13*, 41.
60. Braissant, O.; Henry, H.; Beard, E.; Uldry, J. Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* **2011**, *40*, 1315-24.
61. Longo, N.; Ardon, O.; Vanzo, R.; Schwartz, E.; Pasquali, M. Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **2011**, *157*, 72-8.
62. Veech, R. L.; Lawson, J. W.; Cornell, N. W.; Krebs, H. A. Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem* **1979**, *254*, 6538-47.
63. Nioka, S.; Argov, Z.; Dobson, G. P.; Forster, R. E.; Subramanian, H. V.; Veech, R. L.; Chance, B. Substrate regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in hypercapnic rabbit muscle. *J Appl Physiol* **1992**, *72*, 521-8.
64. Wallimann, T.; Hemmer, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* **1994**, *133-134*, 193-220.
65. Wallimann, T.; Wyss, M.; Brdiczka, D.; Nicolay, K.; Eppenberger, H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **1992**, *281* ( Pt 1), 21-40.
66. Iyengar, M. R. Creatine kinase as an intracellular regulator. *J Muscle Res Cell Motil* **1984**, *5*, 527-34.
67. Iyengar, M. R.; Fluellen, C. E.; Iyengar, C. Creatine kinase from the bovine myometrium: purification and characterization. *J Muscle Res Cell Motil* **1982**, *3*, 231-46.
68. Brewster, L. M.; Coronel, C. M.; Sluiter, W.; Clark, J. F.; van Montfrans, G. A. Ethnic differences in tissue creatine kinase activity: an observational study. *PLoS One* **7**, e32471.
69. Dolder, M.; Walzel, B.; Speer, O.; Schlattner, U.; Wallimann, T. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 17760-6.
70. O'Gorman, E.; Beutner, G.; Dolder, M.; Koretsky, A. P.; Brdiczka, D.; Wallimann, T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* **1997**, *414*, 253-7.
71. Adhietty, P. J.; Beal, M. F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med* **2008**, *10*, 275-90.
72. Meyer, L. E.; Machado, L. B.; Santiago, A. P.; da-Silva, W. S.; De Felice, F. G.; Holub, O.; Oliveira, M. F.; Galina, A. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 37361-71.
73. Rawson, E. S.; Persky, A. M.; Price, T. B.; Clarkson, P. M. Effects of repeated creatine supplementation on muscle, plasma, and urine creatine levels. *J Strength Cond Res* **2004**, *18*, 162-7.
74. Hultman, E.; Soderlund, K.; Timmons, J. A.; Cederblad, G.; Greenhaff, P. L. Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* **1996**, *81*, 232-7.
75. Gualano, B.; Roschel, H.; Lancha-Jr, A. H.; Brightbill, C. E.; Rawson, E. S. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids* **2012**, *43*, 519-29.
76. Persky, A. M.; Rawson, E. S. Safety of creatine supplementation. *Subcell Biochem* **2007**, *46*, 275-89.
77. Murphy, R. M.; Stephenson, D. G.; Lamb, G. D. Effect of creatine on contractile force and sensitivity in mechanically skinned single fibers from rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, *287*, C1589-95.

78. Vannas-Sulonen, K.; Sipila, I.; Vannas, A.; Simell, O.; Rapola, J. Gyrate atrophy of the choroid and retina. A five-year follow-up of creatine supplementation. *Ophthalmology* **1985**, *92*, 1719-27.
79. Braissant, O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Inherit Metab Dis* **2012**, *35*, 655-64.
80. Bizzi, A.; Bugiani, M.; Salomons, G. S.; Hunneman, D. H.; Moroni, I.; Estienne, M.; Danesi, U.; Jakobs, C.; Uziel, G. X-linked creatine deficiency syndrome: a novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8. *Ann Neurol* **2002**, *52*, 227-31.
81. Almeida, L. S.; Salomons, G. S.; Hogenboom, F.; Jakobs, C.; Schoffelmeeer, A. N. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* **2006**, *60*, 118-23.
82. De Deyn, P. P.; Marescau, B.; Macdonald, R. L. Guanidino compounds that are increased in hyperargininemia inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. *Epilepsy Res* **1991**, *8*, 134-41.
83. Neu, A.; Neuhoff, H.; Trube, G.; Fehr, S.; Ullrich, K.; Roeper, J.; Isbrandt, D. Activation of GABA(A) receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiol Dis* **2002**, *11*, 298-307.
84. Cupello, A.; Balestrino, M.; Gatta, E.; Pellistri, F.; Siano, S.; Robello, M. Activation of cerebellar granule cells GABA(A) receptors by guanidinoacetate. *Neuroscience* **2008**, *152*, 65-9.
85. Galbraith, R. A.; Furukawa, M.; Li, M. Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. *Brain Res* **2006**, *1101*, 85-91.
86. Peral, M. J.; Vazquez-Carretero, M. D.; Ilundain, A. A. Na(+)/Cl(-)/creatine transporter activity and expression in rat brain synaptosomes. *Neuroscience* **2010**, *165*, 53-60.
87. Watanabe, A.; Kato, N.; Kato, T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. *Neurosci Res* **2002**, *42*, 279-85.
88. McMorris, T.; Mielcarz, G.; Harris, R. C.; Swain, J. P.; Howard, A. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn* **2007**, *14*, 517-28.
89. Rae, C.; Digney, A. L.; McEwan, S. R.; Bates, T. C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proc Biol Sci* **2003**, *270*, 2147-50.
90. Sestili, P.; Martinelli, C.; Colombo, E.; Barbieri, E.; Potenza, L.; Sartini, S.; Fimognari, C. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids* **40**, 1385-96.
91. Saraiva, A. L.; Ferreira, A. P.; Silva, L. F.; Hoffmann, M. S.; Dutra, F. D.; Furian, A. F.; Oliveira, M. S.; Figuera, M. R.; Royes, L. F. Creatine reduces oxidative stress markers but does not protect against seizure susceptibility after severe traumatic brain injury. *Brain Res Bull* **2011**, *87*, 180-6.
92. Kolling, J.; Wyse, A. T. Creatine prevents the inhibition of energy metabolism and lipid peroxidation in rats subjected to GAA administration. *Metab Brain Dis* **2010**, *25*, 331-8.
93. Holtzman, D.; Togliatti, A.; Khait, I.; Jensen, F. Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr Res* **1998**, *44*, 410-4.
94. Semenova, N. A.; Sidorin, S. V.; Akhadov, T. A.; Semenova, J. B.; Petraikin, A. V.; Fufaeva, E. V.; Karlosh, A. N. Effect of cell therapy on metabolite content in brain structures of children with consequences of severe brain injury: 1H magnetic resonance spectroscopy study. *Bull Exp Biol Med* **2011**, *151*, 532-5.
95. Sakellaris, G.; Nasis, G.; Kotsiou, M.; Tamiolaki, M.; Charissis, G.; Evangelidou, A. Prevention of traumatic headache, dizziness and fatigue with creatine administration. A pilot study. *Acta Paediatr* **2008**, *97*, 31-4.
96. Perasso, L.; Lunardi, G. L.; Risso, F.; Pohvozcheva, A. V.; Leko, M. V.; Gandolfo, C.; Florio, T.; Cupello, A.; Burov, S. V.; Balestrino, M. Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochem Res* **2008**, *33*, 765-75.
97. Li, T.; Wang, N.; Zhao, M. Neuroprotective effect of phosphocreatine on focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 168756.

98. Gualano, B.; Artioli, G. G.; Poortmans, J. R.; Lancha Junior, A. H. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids* **2010**, *38*, 31-44.
99. Gualano, B.; V, D. E. S. P.; Roschel, H.; Artioli, G. G.; Neves, M., Jr.; De Sa Pinto, A. L.; Da Silva, M. E.; Cunha, M. R.; Otaduy, M. C.; Leite Cda, C.; Ferreira, J. C.; Pereira, R. M.; Brum, P. C.; Bonfa, E.; Lancha, A. H., Jr. Creatine in type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Med Sci Sports Exerc* **2011**, *43*, 770-8.
100. Kristensen, C. A.; Askenasy, N.; Jain, R. K.; Koretsky, A. P. Creatine and cyclocreatine treatment of human colon adenocarcinoma xenografts: <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopic studies. *Br J Cancer* **1999**, *79*, 278-85.
101. Korzun, W. J. Oral creatine supplements lower plasma homocysteine concentrations in humans. *Clin Lab Sci* **2004**, *17*, 102-6.
102. Wyss, M.; Schulze, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* **2002**, *112*, 243-60.
103. Nomura, A.; Zhang, M.; Sakamoto, T.; Ishii, Y.; Morishima, Y.; Mochizuki, M.; Kimura, T.; Uchida, Y.; Sekizawa, K. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol* **2003**, *139*, 715-20.
104. Brewer, G. J.; Wallimann, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* **2000**, *74*, 1968-78.
105. Genius, J.; Geiger, J.; Bender, A.; Moller, H. J.; Klopstock, T.; Rujescu, D. Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. *PLoS One* **2012**, *7*, e30554.
106. Malcon, C.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res* **2000**, *860*, 195-8.
107. Fukuzako, H. Neurochemical investigation of the schizophrenic brain by in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *World J Biol Psychiatry* **2001**, *2*, 70-82.
108. Allen, P. J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev* **2012**, *36*, 1442-62.
109. Ipser, J. C.; Syal, S.; Bentley, J.; Adnams, C. M.; Steyn, B.; Stein, D. J. <sup>1</sup>H-MRS in autism spectrum disorders: a systematic meta-analysis. *Metab Brain Dis* **2012**, *27*, 275-87.
110. Nilsen, L. H.; Melo, T. M.; Saether, O.; Witter, M. P.; Sonnewald, U. Altered neurochemical profile in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's disease: a longitudinal in vivo <sup>1</sup>H MRS study. *J Neurochem* **2012**, *123*, 532-41.
111. Li, B. S.; Wang, H.; Gonen, O. Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging* **2003**, *21*, 923-8.
112. Czeh, B.; Michaelis, T.; Watanabe, T.; Frahm, J.; de Biurrun, G.; van Kampen, M.; Bartolomucci, A.; Fuchs, E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 12796-801.
113. Yue, Q.; Liu, M.; Nie, X.; Wu, Q.; Li, J.; Zhang, W.; Huang, X.; Gong, Q. Quantitative 3.0T MR spectroscopy reveals decreased creatine concentration in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with social anxiety disorder. *PLoS One* **2012**, *7*, e48105.
114. Hoerst, M.; Weber-Fahr, W.; Tunc-Skarka, N.; Ruf, M.; Bohus, M.; Schmahl, C.; Ende, G. Metabolic alterations in the amygdala in borderline personality disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry* **67**, 399-405.
115. New, A. S.; Hazlett, E. A.; Newmark, R. E.; Zhang, J.; Triebwasser, J.; Meyerson, D.; Lazarus, S.; Trisdorfer, R.; Goldstein, K. E.; Goodman, M.; Koenigsberg, H. W.; Flory, J. D.; Siever, L. J.; Buchsbaum, M. S. Laboratory induced aggression: a positron emission tomography study of aggressive individuals with borderline personality disorder. *Biol Psychiatry* **2009**, *66*, 1107-14.
116. Gemar, M. C.; Segal, Z. V.; Mayberg, H. S.; Goldapple, K.; Carney, C. Changes in regional cerebral blood flow following mood challenge in drug-free, remitted patients with unipolar depression. *Depress Anxiety* **2007**, *24*, 597-601.

117. Roitman, S.; Green, T.; Osher, Y.; Karni, N.; Levine, J. Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study. *Bipolar Disord* **2007**, *9*, 754-8.
118. Alger, J. R.; Frank, J. A.; Bizzi, A.; Fulham, M. J.; DeSouza, B. X.; Duhaney, M. O.; Inscoc, S. W.; Black, J. L.; van Zijl, P. C.; Moonen, C. T.; et al. Metabolism of human gliomas: assessment with H-1 MR spectroscopy and F-18 fluorodeoxyglucose PET. *Radiology* **1990**, *177*, 633-41.
119. Penet, M. F.; Gadiya, M. M.; Krishnamachary, B.; Nimmagadda, S.; Pomper, M. G.; Artemov, D.; Bhujwalla, Z. M. Metabolic signatures imaged in cancer-induced cachexia. *Cancer Res* **71**, 6948-56.
120. Chaturvedi, R. K.; Beal, M. F. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* **2008**, *1147*, 395-412.
121. Gallant, M.; Rak, M.; Szeghalmi, A.; Del Bigio, M. R.; Westaway, D.; Yang, J.; Julian, R.; Gough, K. M. Focally elevated creatine detected in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice and Alzheimer disease brain tissue. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 5-8.
122. Burklen, T. S.; Schlattner, U.; Homayouni, R.; Gough, K.; Rak, M.; Szeghalmi, A.; Wallimann, T. The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol* **2006**, *2006*, 35936.
123. Matthews, R. T.; Ferrante, R. J.; Klivenyi, P.; Yang, L.; Klein, A. M.; Mueller, G.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* **1999**, *157*, 142-9.
124. Investigators, N. N.-P. A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin Neuropharmacol* **2008**, *31*, 141-50.
125. Investigators, N. N.-P. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology* **2006**, *66*, 664-71.
126. Hass, C. J.; Collins, M. A.; Juncos, J. L. Resistance training with creatine monohydrate improves upper-body strength in patients with Parkinson disease: a randomized trial. *Neurorehabil Neural Repair* **2007**, *21*, 107-15.
127. Caramanos, Z.; Narayanan, S.; Arnold, D. L. 1H-MRS quantification of tNA and tCr in patients with multiple sclerosis: a meta-analytic review. *Brain* **2005**, *128*, 2483-506.
128. Vrenken, H.; Barkhof, F.; Uitdehaag, B. M.; Castelijns, J. A.; Polman, C. H.; Pouwels, P. J. MR spectroscopic evidence for glial increase but not for neuro-axonal damage in MS normal-appearing white matter. *Magn Reson Med* **2005**, *53*, 256-66.
129. Klivenyi, P.; Ferrante, R. J.; Matthews, R. T.; Bogdanov, M. B.; Klein, A. M.; Andreassen, O. A.; Mueller, G.; Wermer, M.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* **1999**, *5*, 347-50.
130. Atassi, N.; Ratai, E. M.; Greenblatt, D. J.; Pulley, D.; Zhao, Y.; Bombardier, J.; Wallace, S.; Eckenrode, J.; Cudkowicz, M.; Dibernardo, A. A phase I, pharmacokinetic, dosage escalation study of creatine monohydrate in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **2010**, *11*, 508-13.
131. Beal, M. F.; Ferrante, R. J. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* **2004**, *5*, 373-84.
132. Ferrante, R. J.; Andreassen, O. A.; Jenkins, B. G.; Dedeoglu, A.; Kuemmerle, S.; Kubilus, J. K.; Kaddurah-Daouk, R.; Hersch, S. M.; Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* **2000**, *20*, 4389-97.
133. Dedeoglu, A.; Kubilus, J. K.; Yang, L.; Ferrante, R. J.; Hersch, S. M.; Beal, M. F.; Ferrante, R. J. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* **2003**, *85*, 1359-67.
134. Yang, L.; Calingasan, N. Y.; Wille, E. J.; Cormier, K.; Smith, K.; Ferrante, R. J.; Beal, M. F. Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. *J Neurochem* **2009**, *109*, 1427-39.

135. Matthews, R. T.; Yang, L.; Jenkins, B. G.; Ferrante, R. J.; Rosen, B. R.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* **1998**, *18*, 156-63.
136. Hersch, S. M.; Gevorkian, S.; Marder, K.; Moskowitz, C.; Feigin, A.; Cox, M.; Como, P.; Zimmerman, C.; Lin, M.; Zhang, L.; Ulug, A. M.; Beal, M. F.; Matson, W.; Bogdanov, M.; Ebbel, E.; Zaleta, A.; Kaneko, Y.; Jenkins, B.; Hevelone, N.; Zhang, H.; Yu, H.; Schoenfeld, D.; Ferrante, R.; Rosas, H. D. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. *Neurology* **2006**, *66*, 250-2.
137. Jager, R.; Purpura, M.; Shao, A.; Inoue, T.; Kreider, R. B. Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino Acids* **2011**, *40*, 1369-83.
138. Buford, T. W.; Kreider, R. B.; Stout, J. R.; Greenwood, M.; Campbell, B.; Spano, M.; Ziegenfuss, T.; Lopez, H.; Landis, J.; Antonio, J. International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise. *J Int Soc Sports Nutr* **2007**, *4*, 6.
139. Pischel, I.; Gastner, T. Creatine--its chemical synthesis, chemistry, and legal status. *Subcell Biochem* **2007**, *46*, 291-307.
140. Gualano, B.; de Salles Painelli, V.; Roschel, H.; Lugaresi, R.; Dorea, E.; Artioli, G. G.; Lima, F. R.; da Silva, M. E.; Cunha, M. R.; Seguro, A. C.; Shimizu, M. H.; Otaduy, M. C.; Sapienza, M. T.; da Costa Leite, C.; Bonfa, E.; Lancha Junior, A. H. Creatine supplementation does not impair kidney function in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Appl Physiol* **2010**, *111*, 749-56.
141. Poortmans, J. R.; Kumps, A.; Duez, P.; Fofonka, A.; Carpentier, A.; Francaux, M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Med Sci Sports Exerc* **2005**, *37*, 1717-20.
142. Stockler, S.; Holzbach, U.; Hanefeld, F.; Marquardt, I.; Helms, G.; Requart, M.; Hanicke, W.; Frahm, J. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* **1994**, *36*, 409-13.
143. Item, C. B.; Stockler-Ipsiroglu, S.; Stromberger, C.; Muhl, A.; Alessandri, M. G.; Bianchi, M. C.; Tosetti, M.; Fornai, F.; Cioni, G. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* **2001**, *69*, 1127-33.
144. Stockler, S.; Isbrandt, D.; Hanefeld, F.; Schmidt, B.; von Figura, K. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet* **1996**, *58*, 914-22.
145. Schulze, A.; Battini, R. Pre-symptomatic treatment of creatine biosynthesis defects. *Subcell Biochem* **2007**, *46*, 167-81.
146. Salomons, G. S.; van Dooren, S. J.; Verhoeven, N. M.; Cecil, K. M.; Ball, W. S.; Degrauw, T. J.; Jakobs, C. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* **2001**, *68*, 1497-500.
147. Mancini, G. M.; Catsman-Berrevoets, C. E.; de Coo, I. F.; Aarsen, F. K.; Kamphoven, J. H.; Huijmans, J. G.; Duran, M.; van der Knaap, M. S.; Jakobs, C.; Salomons, G. S. Two novel mutations in SLC6A8 cause creatine transporter defect and distinctive X-linked mental retardation in two unrelated Dutch families. *Am J Med Genet A* **2005**, *132A*, 288-95.
148. Kleefstra, T.; Rosenberg, E. H.; Salomons, G. S.; Stroink, H.; van Bokhoven, H.; Hamel, B. C.; de Vries, B. B. Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency caused by an SLC6A8 mutation. *Clin Genet* **2005**, *68*, 379-81.
149. Hahn, K. A.; Salomons, G. S.; Tackels-Horne, D.; Wood, T. C.; Taylor, H. A.; Schroer, R. J.; Lubs, H. A.; Jakobs, C.; Olson, R. L.; Holden, K. R.; Stevenson, R. E.; Schwartz, C. E. X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28. *Am J Hum Genet* **2002**, *70*, 1349-56.

150. Roschel, H.; Gualano, B.; Marquezi, M.; Costa, A.; Lancha, A. H., Jr. Creatine supplementation spares muscle glycogen during high intensity intermittent exercise in rats. *J Int Soc Sports Nutr* **2010**, *7*, 6.
151. Wyss, M.; Wallimann, T. Creatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle. *Mol Cell Biochem* **1994**, *133-134*, 51-66.
152. Stockler, S.; Hanefeld, F.; Frahm, J. Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *Lancet* **1996**, *348*, 789-90.
153. Sijens, P. E.; Verbruggen, K. T.; Oudkerk, M.; van Spronsen, F. J.; Soorani-Lunsing, R. J. 1H MR spectroscopy of the brain in Cr transporter defect. *Mol Genet Metab* **2005**, *86*, 421-2.
154. van de Kamp, J. M.; Mancini, G. M.; Pouwels, P. J.; Betsalel, O. T.; van Dooren, S. J.; de Koning, I.; Steenweg, M. E.; Jakobs, C.; van der Knaap, M. S.; Salomons, G. S. Clinical features and X-inactivation in females heterozygous for creatine transporter defect. *Clin Genet* **2011**, *79*, 264-72.
155. Nasrallah, F.; Feki, M.; Kaabachi, N. Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol* **2010**, *42*, 163-71.
156. Valayannopoulos, V.; Boddaert, N.; Chabli, A.; Barbier, V.; Desguerre, I.; Philippe, A.; Afenjar, A.; Mazuca, M.; Cheillan, D.; Munnich, A.; de Keyzer, Y.; Jakobs, C.; Salomons, G. S.; de Lonlay, P. Treatment by oral creatine, L-arginine and L-glycine in six severely affected patients with creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* **2012**, *35*, 151-7.
157. Betsalel, O. T.; Rosenberg, E. H.; Almeida, L. S.; Kleefstra, T.; Schwartz, C. E.; Valayannopoulos, V.; Abdul-Rahman, O.; Poplawski, N.; Vilarinho, L.; Wolf, P.; den Dunnen, J. T.; Jakobs, C.; Salomons, G. S. Characterization of novel SLC6A8 variants with the use of splice-site analysis tools and implementation of a newly developed LOVD database. *Eur J Hum Genet* **2011**, *19*, 56-63.
158. Chelly, J.; Mandel, J. L. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* **2001**, *2*, 669-80.
159. Rosenberg, E. H.; Almeida, L. S.; Kleefstra, T.; deGrauw, R. S.; Yntema, H. G.; Bahi, N.; Moraine, C.; Ropers, H. H.; Fryns, J. P.; deGrauw, T. J.; Jakobs, C.; Salomons, G. S. High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* **2004**, *75*, 97-105.
160. Clark, A. J.; Rosenberg, E. H.; Almeida, L. S.; Wood, T. C.; Jakobs, C.; Stevenson, R. E.; Schwartz, C. E.; Salomons, G. S. X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* **2006**, *119*, 604-10.
161. Braissant, O. Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* **2010**, *100 Suppl 1*, S3-S12.
162. Valle, D.; Walser, M.; Brusilow, S.; Kaiser-Kupfer, M. I.; Takki, K. Gyrate atrophy of the choroid and retina. Biochemical considerations and experience with an arginine-restricted diet. *Ophthalmology* **1981**, *88*, 325-30.
163. Bianchi, M. C.; Tosetti, M.; Fornai, F.; Alessandri, M. G.; Cipriani, P.; De Vito, G.; Canapicchi, R. Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann Neurol* **2000**, *47*, 511-3.
164. Cecil, K. M.; Salomons, G. S.; Ball, W. S., Jr.; Wong, B.; Chuck, G.; Verhoeven, N. M.; Jakobs, C.; DeGrauw, T. J. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect? *Ann Neurol* **2001**, *49*, 401-4.
165. Salomons, G. S.; van Dooren, S. J.; Verhoeven, N. M.; Marsden, D.; Schwartz, C.; Cecil, K. M.; DeGrauw, T. J.; Jakobs, C. X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis* **2003**, *26*, 309-18.
166. Anselm, I. A.; Alkuraya, F. S.; Salomons, G. S.; Jakobs, C.; Fulton, A. B.; Mazumdar, M.; Rivkin, M.; Frye, R.; Poussaint, T. Y.; Marsden, D. X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis* **2006**, *29*, 214-9.

167. Poo-Arguelles, P.; Arias, A.; Vilaseca, M. A.; Ribes, A.; Artuch, R.; Sans-Fito, A.; Moreno, A.; Jakobs, C.; Salomons, G. X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* **2006**, *29*, 220-3.
168. Arias, A.; Corbella, M.; Fons, C.; Sempere, A.; Garcia-Villoria, J.; Ormazabal, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Vilaseca, M. A.; Campistol, J.; Briones, P.; Pampols, T.; Salomons, G. S.; Ribes, A.; Artuch, R. Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin Biochem* **2007**, *40*, 1328-31.
169. Stromberger, C.; Bodamer, O. A.; Stockler-Ipsiroglu, S. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis* **2003**, *26*, 299-308.
170. van de Kamp, J. M.; Pouwels, P. J.; Aarsen, F. K.; ten Hoopen, L. W.; Knol, D. L.; de Klerk, J. B.; de Coo, I. F.; Huijmans, J. G.; Jakobs, C.; van der Knaap, M. S.; Salomons, G. S.; Mancini, G. M. Long-term follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* **2012**, *35*, 141-9.
171. Fons, C.; Sempere, A.; Arias, A.; Lopez-Sala, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Mas, A.; Vilaseca, M. A.; Salomons, G. S.; Ribes, A.; Artuch, R.; Campistol, J. Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* **2008**, *31*, 724-8.
172. Chilosi, A.; Leuzzi, V.; Battini, R.; Tosetti, M.; Ferretti, G.; Comparini, A.; Casarano, M.; Moretti, E.; Alessandri, M. G.; Bianchi, M. C.; Cioni, G. Treatment with L-arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect. *Neurocase* **2008**, *14*, 151-61.
173. Mercimek-Mahmutoglu, S.; Connolly, M. B.; Poskitt, K. J.; Horvath, G. A.; Lowry, N.; Salomons, G. S.; Casey, B.; Sinclair, G.; Davis, C.; Jakobs, C.; Stockler-Ipsiroglu, S. Treatment of intractable epilepsy in a female with SLC6A8 deficiency. *Mol Genet Metab* **2010**, *101*, 409-12.
174. Lunardi, G.; Parodi, A.; Perasso, L.; Pohvozcheva, A. V.; Scarrone, S.; Adriano, E.; Florio, T.; Gandolfo, C.; Cupello, A.; Burov, S. V.; Balestrino, M. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience* **2006**, *142*, 991-7.
175. Perasso, L.; Adriano, E.; Ruggeri, P.; Burov, S. V.; Gandolfo, C.; Balestrino, M. In vivo neuroprotection by a creatine-derived compound: phosphocreatine-Mg-complex acetate. *Brain Res* **2009**, *1285*, 158-63.
176. Adriano, E.; Garbati, P.; Damonte, G.; Salis, A.; Armirotti, A.; Balestrino, M. Searching for a therapy of creatine transporter deficiency: some effects of creatine ethyl ester in brain slices in vitro. *Neuroscience* **2011**, *199*, 386-93.
177. Fons, C.; Arias, A.; Sempere, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Mas, A.; Lopez-Sala, A.; Garcia-Villoria, J.; Vilaseca, M. A.; Ozaez, L.; Lluch, M.; Artuch, R.; Campistol, J.; Ribes, A. Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency. *Mol Genet Metab* **2010**, *99*, 296-9.
178. Ravera, S.; Adriano, E.; Balestrino, M.; Panfoli, I. Creatine ethyl ester: a new substrate for creatine kinase. *Mol Biol (Mosk)* **2012**, *46*, 162-5.
179. La Du, B. Plasma esterase activity and the metabolism of drugs with ester groups. *Ann N Y Acad Sci* **1971**, *179*, 684-94.
180. Ling, J.; Kritikos, M.; Tiplady, B. Cognitive effects of creatine ethyl ester supplementation. *Behav Pharmacol* **2009**, *20*, 673-9.
181. Burov, S.; Leko, M.; Dorosh, M.; Dobrodumov, A.; Veselkina, O. Creatinyl amino acids: new hybrid compounds with neuroprotective activity. *J Pept Sci* **2011**, *17*, 620-6.
182. Skelton, M. R.; Schaefer, T. L.; Graham, D. L.; Degrauw, T. J.; Clark, J. F.; Williams, M. T.; Vorhees, C. V. Creatine transporter (CrT; Slc6a8) knockout mice as a model of human CrT deficiency. *PLoS One* **2011**, *6*, e16187.
183. Kurosawa, Y.; Degrauw, T. J.; Lindquist, D. M.; Blanco, V. M.; Pyne-Geithman, G. J.; Daikoku, T.; Chambers, J. B.; Benoit, S. C.; Clark, J. F. Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J Clin Invest* **2012**, *122*, 2837-46.
184. Cipolla, M. J. Cerebral circulation. **2009**.

185. Guibert, R.; Fonta, C.; Plouraboue, F. Cerebral blood flow modeling in primate cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* **2010**, *30*, 1860-73.
186. Ladecola, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **2004**, *5*, 347-60.
187. Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease* **2010**, *37*, 13-25.
188. Tilling, T.; Korte, D.; Hoheisel, D.; Galla, H. J. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem* **1998**, *71*, 1151-7.
189. Robert, A. M.; Robert, L. Extracellular matrix and blood-brain barrier function. *Pathologie Biologie* **1998**, *46*, 535-542.
190. Dityatev, A.; Seidenbecher, C. I.; Schachner, M. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci* **2010**, *33*, 503-12.
191. Omidj, Y.; Barar, J. Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors. *Bioimpacts* **2012**, *2*, 5-22.
192. Giacomini, K. M.; Huang, S.-M.; Tweedie, D. J.; Benet, L. Z.; Brouwer, K. L. R.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K. M.; Hoffmaster, K. A.; Ishikawa, T.; Keppler, D.; Kim, R. B.; Lee, C. A.; Niemi, M.; Polli, J. W.; Sugiyama, Y.; Swaan, P. W.; Ware, J. A.; Wright, S. H.; Yee, S. W.; Zamek-Gliszczynski, M. J.; Zhang, L. Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, *9*, 215-36.
193. Dauchy, S.; Dutheil, F.; Weaver, R. J.; Chassoux, F.; Dumas-Duport, C.; Couraud, P. O.; Scherrmann, J. M.; De Waziers, I.; Decleves, X. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem* **2008**, *107*, 1518-28.
194. Jacob, A.; Decleves, X.; Scherrmann, J. M. [Recent advances in quantitative proteomics as a sensitive tool to quantify drug transporters and drug metabolizing enzymes at the human blood-brain barrier]. *Biol Aujourdhui* **2012**, *206*, 177-83.
195. Decleves, X.; Jacob, A.; Yousif, S.; Shawahna, R.; Potin, S.; Scherrmann, J. M. Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab* **2011**, *12*, 732-41.
196. Ghosh, C.; Gonzalez-Martinez, J.; Hossain, M.; Cucullo, L.; Fazio, V.; Janigro, D.; Marchi, N. Pattern of P450 expression at the human blood-brain barrier: roles of epileptic condition and laminar flow. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1408-17.
197. Shawahna, R.; Uchida, Y.; Decleves, X.; Ohtsuki, S.; Yousif, S.; Dauchy, S.; Jacob, A.; Chassoux, F.; Dumas-Duport, C.; Couraud, P. O.; Terasaki, T.; Scherrmann, J. M. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm* **2011**, *8*, 1332-41.
198. Wolburg, H.; Noell, S.; Mack, A.; Wolburg-Buchholz, K.; Fallier-Becker, P. Brain endothelial cells and the gliovascular complex. *Cell Tissue Res* **2009**, *335*, 75-96.
199. Liebner, S.; Czupalla, C. J.; Wolburg, H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* **2011**, *55*, 467-76.
200. Correale, J.; Villa, A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem Res* **2009**, *34*, 2067-77.
201. Abbott, N. J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **2006**, *7*, 41-53.
202. Hawkins, B. T.; Davis, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **2005**, *57*, 173-85.
203. Nico, B.; Ribatti, D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab* **2012**, *13*, 50-60.
204. Liu, S.; Agalliu, D.; Yu, C.; Fisher, M. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr Pharm Des* **2012**, *18*, 3653-62.



205. Cardoso, F. L.; Brites, D.; Brito, M. A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* **2010**, *64*, 328-63.
206. Neuwelt, E. A.; Bauer, B.; Fahlke, C.; Fricker, G.; Iadecola, C.; Janigro, D.; Leybaert, L.; Molnar, Z.; O'Donnell, M. E.; Povlishock, J. T.; Saunders, N. R.; Sharp, F.; Stanimirovic, D.; Watts, R. J.; Drewes, L. R. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci* **2011**, *12*, 169-82.
207. Pardridge, W. M. Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug Discov Today* **2001**, *6*, 1-2.
208. Deer, T. R.; Smith, H. S.; Burton, A. W.; Pope, J. E.; Doleys, D. M.; Levy, R. M.; Staats, P. S.; Wallace, M. S.; Webster, L. R.; Rauck, R. L.; Cousins, M. Comprehensive consensus based guidelines on intrathecal drug delivery systems in the treatment of pain caused by cancer pain. *Pain Physician* **2011**, *14*, E283-312.
209. Ammar, A.; Ughratdar, I.; Sivakumar, G.; Vloeberghs, M. H. Intrathecal baclofen therapy--how we do it. *J Neurosurg Pediatr* **2012**, *10*, 439-44.
210. Ramachandran, A.; Klein, R. Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES) After Combination Chemotherapy for Lymphoma. *Am J Ther* **2012**.
211. Hanson, L. R.; Frey, W. H., 2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci* **2008**, *9* Suppl 3, S5.
212. Neuwelt, E. A.; Hill, S. A.; Frenkel, E. P. Osmotic blood-brain barrier modification and combination chemotherapy: concurrent tumor regression in areas of barrier opening and progression in brain regions distant to barrier opening. *Neurosurgery* **1984**, *15*, 362-6.
213. McDannold, N.; Vykhodtseva, N.; Raymond, S.; Jolesz, F. A.; Hynynen, K. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol* **2005**, *31*, 1527-37.
214. Vykhodtseva, N.; McDannold, N.; Hynynen, K. Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics* **2008**, *48*, 279-96.
215. Marty, B.; Larrat, B.; Van Landeghem, M.; Robic, C.; Robert, P.; Port, M.; Le Bihan, D.; Pernot, M.; Tanter, M.; Lethimonnier, F.; Meriaux, S. Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* **2012**, *32*, 1948-58.
216. Su, Y.; Lee, S. H.; Sinko, P. J. Inhibition of efflux transporter ABCG2/BCRP does not restore mitoxantrone sensitivity in irinotecan-selected human leukemia CPT-K5 cells: evidence for multifactorial multidrug resistance. *Eur J Pharm Sci* **2006**, *29*, 102-10.
217. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* **2005**, *2*, 3-14.
218. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier and neurotherapeutics. *NeuroRx* **2005**, *2*, 1-2.
219. Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Oldendorf, W. H.; Hill, M. A. Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. *Am J Physiol* **1982**, *243*, C161-8.
220. Chen, Y.; Liu, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *64*, 640-65.
221. Adenot, M.; Merida, P.; Lahana, R. Applications of a blood-brain barrier technology platform to predict CNS penetration of various chemotherapeutic agents. 2. Cationic peptide vectors for brain delivery. *Chemotherapy* **2007**, *53*, 73-6.
222. Qin, Y.; Chen, H.; Zhang, Q.; Wang, X.; Yuan, W.; Kuai, R.; Tang, J.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Liu, J.; He, Q. Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. *Int J Pharm* **2011**, *420*, 304-12.
223. Paris-Robidas, S.; Emond, V.; Tremblay, C.; Soulet, D.; Calon, F. In vivo labeling of brain capillary endothelial cells after intravenous injection of monoclonal antibodies targeting the transferrin receptor. *Mol Pharmacol* **2011**, *80*, 32-9.

224. Aktas, Y.; Yemisci, M.; Andrieux, K.; Gursoy, R. N.; Alonso, M. J.; Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quinoa, E.; Riguera, R.; Sargon, M. F.; Celik, H. H.; Demir, A. S.; Hincal, A. A.; Dalkara, T.; Capan, Y.; Couvreur, P. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1503-11.
225. De Meyts, P.; Whittaker, J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 769-83.
226. Wu, D.; Yang, J.; Pardridge, W. M. Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *J Clin Invest* **1997**, *100*, 1804-12.
227. Boado, R. J.; Zhang, Y.; Pardridge, W. M. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng* **2007**, *96*, 381-91.
228. Stojanov, K.; Zuhorn, I. S.; Dierckx, R. A.; de Vries, E. F. Imaging of cells and nanoparticles: implications for drug delivery to the brain. *Pharm Res* **2012**, *29*, 3213-34.
229. Seigneuric, R.; Markey, L.; Nuyten, D. S.; Dubernet, C.; Evelo, C. T.; Finot, E.; Garrido, C. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. *Curr Mol Med* **2010**, *10*, 640-52.
230. Yadav, S. C.; Kumari, A.; Yadav, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides* **2010**, *32*, 173-87.
231. Wong, H. L.; Chattopadhyay, N.; Wu, X. Y.; Bendayan, R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *62*, 503-17.
232. Pandita, D.; Ahuja, A.; Lather, V.; Benjamin, B.; Dutta, T.; Velpandian, T.; Khar, R. K. Development of lipid-based nanoparticles for enhancing the oral bioavailability of paclitaxel. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12*, 712-22.
233. Wen, Z.; Yan, Z.; He, R.; Pang, Z.; Guo, L.; Qian, Y.; Jiang, X.; Fang, L. Brain targeting and toxicity study of odorranalectin-conjugated nanoparticles following intranasal administration. *Drug Deliv* **2011**, *18*, 555-61.
234. Mistry, A.; Stolnik, S.; Illum, L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm* **2009**, *379*, 146-57.
235. Zhang, X.; Chen, G.; Wen, L.; Yang, F.; Shao, A. L.; Li, X.; Long, W.; Mu, L. Novel multiple agents loaded PLGA nanoparticles for brain delivery via inner ear administration: In vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Sci* **2013**, *48*, 595-603.
236. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **2000**, *65*, 271-84.
237. Ulbrich, K.; Hekmatara, T.; Herbert, E.; Kreuter, J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *71*, 251-6.
238. Ulbrich, K.; Knobloch, T.; Kreuter, J. Targeting the insulin receptor: nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *J Drug Target* **2011**, *19*, 125-32.
239. Huynh, N. T.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J. P. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* **2009**, *379*, 201-9.
240. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J. E.; Benoit, J. P. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* **2002**, *19*, 875-80.
241. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Venier-Julienne, M. C.; Proust, J. E.; Phan-Tan-Luu, R.; Benoit, J. P. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* **2003**, *18*, 55-61.
242. Perrier, T.; Saulnier, P.; Fouchet, F.; Lautram, N.; Benoit, J. P. Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms. *Int J Pharm* **2010**, *396*, 204-9.
243. Beduneau, A.; Saulnier, P.; Hindre, F.; Clavreul, A.; Leroux, J. C.; Benoit, J. P. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4978-90.

244. Beduneau, A.; Saulnier, P.; Benoit, J. P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4947-67.
245. Beduneau, A.; Hindre, F.; Clavreul, A.; Leroux, J. C.; Saulnier, P.; Benoit, J. P. Brain targeting using novel lipid nanovectors. *J Control Release* **2008**, *126*, 44-9.
246. Laine, A. L.; Huynh, N. T.; Clavreul, A.; Balzeau, J.; Bejaud, J.; Vessieres, A.; Benoit, J. P.; Eyer, J.; Passirani, C. Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm* **2012**, *81*, 690-3.
247. Hureauux, J.; Lagarce, F.; Gagnadoux, F.; Clavreul, A.; Benoit, J. P.; Urban, T. The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals. *Int J Pharm* **2009**, *379*, 266-9.
248. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Simard, P.; Leroux, J. C.; Benoit, J. P. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* **2006**, *78*, 620-8.
249. Hureauux, J.; Lagarce, F.; Gagnadoux, F.; Rousselet, M. C.; Moal, V.; Urban, T.; Benoit, J. P. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice. *Pharm Res* **2010**, *27*, 421-30.
250. Roger, E.; Lagarce, F.; Benoit, J. P. Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, *79*, 181-8.
251. Weyland, M.; Manero, F.; Paillard, A.; Gree, D.; Viault, G.; Jarnet, D.; Menei, P.; Juin, P.; Chourpa, I.; Benoit, J. P.; Gree, R.; Garcion, E. Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J Control Release* **2011**, *151*, 74-82.
252. Ramadan, A.; Lagarce, F.; Tessier-Marteau, A.; Thomas, O.; Legras, P.; Macchi, L.; Saulnier, P.; Benoit, J. P. Oral fondaparinux: use of lipid nanocapsules as nanocarriers and in vivo pharmacokinetic study. *Int J Nanomedicine* **2011**, *6*, 2941-51.
253. David, S.; Resnier, P.; Guillot, A.; Pitard, B.; Benoit, J. P.; Passirani, C. siRNA LNCs--a novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration. *Eur J Pharm Biopharm* **2012**, *81*, 448-52.
254. Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoit, J. P.; Passirani, C. Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* **2010**, *31*, 321-9.
255. Anton, N.; Saulnier, P.; Gaillard, C.; Porcher, E.; Vrignaud, S.; Benoit, J. P. Aqueous-core lipid nanocapsules for encapsulating fragile hydrophilic and/or lipophilic molecules. *Langmuir* **2009**, *25*, 11413-9.
256. Anton, N.; Mojzisoava, H.; Porcher, E.; Benoit, J. P.; Saulnier, P. Reverse micelle-loaded lipid nano-emulsions: new technology for nano-encapsulation of hydrophilic materials. *Int J Pharm* **2010**, *398*, 204-9.
257. Vrignaud, S.; Hureauux, J.; Wack, S.; Benoit, J. P.; Saulnier, P. Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. *Int J Pharm* **2012**, *436*, 194-200.
258. Vrignaud, S.; Anton, N.; Gayet, P.; Benoit, J. P.; Saulnier, P. Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: a novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, *79*, 197-204.
259. Roger, E.; Lagarce, F.; Benoit, J. P. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm* **2009**, *379*, 260-5.
260. Hureauux, J.; Lagarce, F.; Gagnadoux, F.; Vecellio, L.; Clavreul, A.; Roger, E.; Kempf, M.; Racineux, J. L.; Diot, P.; Benoit, J. P.; Urban, T. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, *73*, 239-46.
261. Paillard, A.; Hindre, F.; Vignes-Colombeix, C.; Benoit, J. P.; Garcion, E. The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7542-54.

262. Roger, E.; Lagarce, F.; Garcion, E.; Benoit, J. P. Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **2010**, *40*, 422-9.
263. Garcion, E.; Lamprecht, A.; Heurtault, B.; Paillard, A.; Aubert-Pouessel, A.; Denizot, B.; Menei, P.; Benoit, J. P. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5*, 1710-22.
264. Lamprecht, A.; Benoit, J. P. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release* **2006**, *112*, 208-13.
265. Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. ATOMIC PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS FOR 3 DIMENSIONAL STRUCTURE DIRECTED QUANTITATIVE STRUCTURE - ACTIVITY RELATIONSHIPS .4. ADDITIONAL PARAMETERS FOR HYDROPHOBIC AND DISPERSIVE INTERACTIONS AND THEIR APPLICATION FOR AN AUTOMATED SUPERPOSITION OF CERTAIN NATURALLY-OCCURRING NUCLEOSIDE ANTIBIOTICS. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1989**, *29*, 163-172.
266. Klopman, G.; Li, J. Y.; Wang, S. M.; Dimayuga, M. COMPUTER AUTOMATED LOG P CALCULATIONS BASED ON AN EXTENDED GROUP-CONTRIBUTION APPROACH. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1994**, *34*, 752-781.
267. Lamprecht, A.; Bouligand, Y.; Benoit, J. P. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J Control Release* **2002**, *84*, 59-68.
268. Lacombe, O.; Videau, O.; Chevillon, D.; Guyot, A. C.; Contreras, C.; Blondel, S.; Nicolas, L.; Ghetas, A.; Benech, H.; Thevenot, E.; Pruvost, A.; Bolze, S.; Krzaczkowski, L.; Prevost, C.; Mabondzo, A. In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm* **2011**, *8*, 651-63.
269. Hembury, A.; Mabondzo, A. Endothelin-1 reduces p-glycoprotein transport activity in an in vitro model of human adult blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **2008**, *28*, 915-21.
270. Valayannopoulos, V.; Bakouh, N.; Mazzuca, M.; Nonnenmacher, L.; Hubert, L.; Makaci, F. L.; Chabli, A.; Salomons, G. S.; Mellot-Draznieks, C.; Brule, E.; de Lonlay, P.; Toulhoat, H.; Munnich, A.; Planelles, G.; de Keyzer, Y. Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab Dis* **2013**, *36*, 103-12.
271. Anderson, J.; Byrne, T.; Woelfel, K. J.; Meany, J. E.; Spyridis, G. T.; Pocker, Y. THE HYDROLYSIS OF P-NITROPHENYL ACETATE - A VERSATILE REACTION TO STUDY ENZYME-KINETICS. *Journal of Chemical Education* **1994**, *71*, 715-718.
272. Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* **2005**, *2*, 541-53.
273. Schulze, A. Creatine deficiency syndromes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2003**, *244*, 143-150.
274. deGrauw, T. J.; Cecil, K. M.; Byars, A. W.; Salomons, G. S.; Ball, W. S.; Jakobs, C. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* **2003**, *244*, 45-8.
275. Katseres, N. S.; Reading, D. W.; Shayya, L.; DiCesare, J. C.; Purser, G. H. Non-enzymatic hydrolysis of creatine ethyl ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *386*, 363-367.
276. Katseres, N. S.; Reading, D. W.; Shayya, L.; DiCesare, J.; Purser, G. H. Hydrolysis of creatine ethyl ester. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2009**, 237.
277. Giese, M. W.; Lecher, C. S. Non-enzymatic cyclization of creatine ethyl ester to creatinine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *388*, 252-255.
278. Brun, E.; Carriere, M.; Mabondzo, A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33*, 886-96.

279. Valayannopoulos, V.; Bakouh, N.; Mazzuca, M.; Nonnenmacher, L.; Hubert, L.; Makaci, F. L.; Chabli, A.; Salomons, G. S.; Mellot-Draznieks, C.; Brule, E.; de Lonlay, P.; Toulhoat, H.; Munnich, A.; Planelles, G.; de Keyzer, Y. Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab Dis* **2012**, *36*, 103-12.
280. Dechent, P.; Pouwels, P. J.; Wilken, B.; Hanefeld, F.; Frahm, J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* **1999**, *277*, R698-704.
281. Ipsiroglu, O. S.; Stromberger, C.; Ilas, J.; Hoger, H.; Muhl, A.; Stockler-Ipsiroglu, S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. *Life Sci* **2001**, *69*, 1805-15.
282. Perasso, L.; Cupello, A.; Lunardi, G. L.; Principato, C.; Gandolfo, C.; Balestrino, M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. *Brain Res* **2003**, *974*, 37-42.
283. Habgood, M. D.; Begley, D. J.; Abbott, N. J. Determinants of passive drug entry into the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* **2000**, *20*, 231-53.
284. Pifferi, F.; Jouin, M.; Alessandri, J. M.; Haedke, U.; Roux, F.; Perriere, N.; Denis, I.; Lavialle, M.; Guesnet, P. n-3 Fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood-brain barrier. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2007**, *77*, 279-86.
285. Pifferi, F.; Jouin, M.; Alessandri, J. M.; Roux, F.; Perriere, N.; Langelier, B.; Lavialle, M.; Cunnane, S.; Guesnet, P. n-3 long-chain fatty acids and regulation of glucose transport in two models of rat brain endothelial cells. *Neurochem Int* **2010**, *56*, 703-10.
286. Vinot, N.; Jouin, M.; Lhomme-Duchadeuil, A.; Guesnet, P.; Alessandri, J. M.; Aujard, F.; Pifferi, F. Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. *PLoS One* **2011**, *6*, e20491.
287. Loike, J. D.; Zalutsky, D. L.; Kaback, E.; Miranda, A. F.; Silverstein, S. C. Extracellular creatine regulates creatine transport in rat and human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 807-11.
288. van Rooy, I.; Mastrobattista, E.; Storm, G.; Hennink, W. E.; Schiffelers, R. M. Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain. *J Control Release* **2011**, *150*, 30-6.
289. Brasseur, D. [Better medicines for children]. *Rev Med Brux* **2006**, *27* Spec No, Sp25-8.

***ANNEXES***

---



***ANNEXE 1***  
***MATERIELS ET EQUIPEMENTS***

---





# 1. Equipements

Une partie des équipements est décrite dans le corps du manuscrit et ne figure pas ici.

	<b>Equipements</b>	<b>Référence produit</b>	<b>Fournisseur/Distributeur</b>
<b>Culture cellulaire</b>	Agitateur	444-0350	Grant / VWR
	Autoclave	-	OSI (Lequeux)
	Bain marie	SUB	Grant
	Balance	MC5	Sartorius
	Balance	AC211S	Sartorius
	Boîtes de congélation, cryobox	479-3200	Nalgène / VWR
	Caméra	-	PixelINK
	Centrifugeuse	GR4i centrifuge	Jouan
	Compteur radioactif	LKB Rackbeta 1214	Perkin Elmer
	Etuve	-	Jouan
	Fluorimètre Spectra Max GeminiXS	3214	Molecular Devices
	Four à stérilisation	-	Prolabo
	Incubateur	9040-0012CB150	Binder
	Logiciel caméra	PL-A662	Explora Nova
	Logiciel compteur radioactif	Genterm	Perkin Elmer
	Logiciel Epoch	Gen5	Biotek
	Logiciel Fluorimètre	Spectramax	Molecular Devices
	Microscope	CKX41	Olympus
	Poste de sécurité microbiologique	MSC12	Jouan
	Spectrophotomètre Epoch	-	Biotek
<b>Biologie moléculaire</b>	Thermocycler	C1000 + CFX96	BioRad
	Centrifugeuse	5415 R	Eppendorf
	Hotte Biocap DNA/RNA	-	Erlab / VWR
	Hotte Captair Flex	SD321	Erlab / VWR
	Logiciel biorad	CFX manager 2.0	Biorad
	Logiciel nanodrop	2000	ThermoFischer Scientific
	Nanodrop	2000c	ThermoScientific
	Precellys®24	-	Bertin Technologies
	Plaque chauffante	BTD	Grant
	Plaque chauffante	QBD1	Grant
<b>Chimie analytique</b>	Centrifugeuse megafuge 40R	-	ThermoScientific
	Tubovap LV Evaporator	-	Zymark

## 2. Consommables

	Consommables	Référence produit	Fournisseur/Distributeur	
<b>Culture cellulaire</b>	Boîtes de Pétri stériles	CLS430167	Corning / Sigma	
	Cellule de Malassez	720-0149	VWR	
	Combitips	613-3532	Eppendorf / VWR	
	Cônes à filtre 10 REACH ART	A2473-1CS	Corning / Sigma	
	Cônes à filtre 1000E ART	A3223-1CS	Corning / Sigma	
	Cônes à filtre 1-200 µl Isotip	CLS4810	Corning / Sigma	
	Cônes P1000 stérilisés	96.01702.6.02	TreffLab	
	Cônes P200	4804	Corning / Sigma	
	Cryotubes	479-6847	Nunc / VWR	
	Eppendorf safe lock 1,5 et 2,0 ml autoclavés	033290 et 033297	Eppendorf / Dutscher	
	Filtres à seringue stérile membrane en CA 0,20 µm, 25 mm	028928	Nalgène / Dutscher	
	Flacons 15 ml stériles	734-0451	BD / VWR	
	Flacons 50 ml stériles	734-0448	BD / VWR	
	Flasques stériles 75 cm <sup>2</sup> bouchons ventilés	658175	Greiner bio-one / Dutscher	
	Gazes stériles	030234ST	Dutscher	
	Inserts pour plaques 12 puits	CLS3401	Costar / Sigma	
	Pinces stérilisées à l'autoclave	232-2123 et 232-2166	VWR	
	Pipettes stériles 10 ml	CLS4488	Costar / Sigma	
	Pipettes stériles 25 ml	CLS4489	Costar / Sigma	
	Pipettes stériles 5 ml	CLS4487	Costar / Sigma	
	Plaque 96 puits	3596	Costar / Sigma	
	Plaque 96 puits pour lecture d'absorbance	655101	Greiner bio-one / Dutscher	
	Plaques 12 puits	665180	Greiner bio-one / Dutscher	
	Plaques 24 puits	662160	Greiner bio-one / Dutscher	
	Plaques 96 puits pour lecture de fluorescence	3991	Corning	
	Scalpels stériles	233-5529 et 233-5513	Swann-Morton / VWR	
	Seringues stériles 20 ml	80349611	Normjekt / VWR	
	Système de filtration bottle-up vacuum 150 ml (pore de 0,22 µm)	CLS431153	Corning / Sigma	
	Système de filtration bottle-up vacuum 250 ml à 1000 ml (pore de 0,22 µm)	CLS431096 à 98	Corning / Sigma	
	Tamis cellulaire stérile 40 µm	734-0002	BD / VWR	
	Tubes à scintillation	-	Perkin Elmer	
	Vials en verre ambré 2 ml	723984	Interchim	
	Vials en verre ambré 4 ml	27001-U	Supelco	
<b>Biologie moléculaire</b>	Aiguilles 21 gauges	612-0133	Terumo / VWR	
	Cônes 2 µl	4801	Corning / Sigma	
	Cônes de P10 à filtre	CLS4807-960EA	Costar / Sigma	
	Cônes de P1000 à filtre	A3223-1CS	ART / Sigma	
	Cônes Isotip 1-200µl à filtre	CLS4810-960EA	Corning / Sigma	
	Flacons de 15 mL stériles	227270	Cellstar / VWR	
	Flacons de 50 mL stériles	227261	Cellstar / VWR	
	Flat cap strips	TCS 0803	Bio Rad	
	Pipettes stériles de 10 mL	CLS4488	Costar / Sigma	
	Pipettes stériles de 25 mL	CLS4489	Costar / Sigma	
	Pipettes stériles de 5 mL	CLS4487	Costar / Sigma	
	Plaques PCR Hard shell 96 well WHT/CLR	HSP9601	Bio Rad	
	seringues 1 ml	612-0106	Terumo / VWR	
	Tubes DNA low bind	22431005	Eppendorf	
	Tubes Eppendorf 0.5 ml	Z666521-250EA	Eppendorf / Sigma	
	Tubes Eppendorf autoclavés 1.5 et 2 ml	T9661-1000EA	Eppendorf / Sigma	
	Tubes Precellys kit	CK14	Bertin Technologies	
	<b>Chimie analytique</b>	Vials d'injection en PP 0.3 ml	548-0440	VWR
		Bouchons à septum pour vials screw cap PP blue 9 mm	548-0088	VWR
Tubes de 5 ml à hémolyse en PP		212-1836	VWR	
Combitips		-	Eppendorf	
Cônes P1000 Diamond Tipak		F171500	Gilson	
Cônes P200 Diamond Towerpack		F167103	Gilson	
<b>Formulation</b>	Colonne PD10 Sephadex G25M	17-0851-01	GE Healthcare	

### 3. Réactifs

	Réactifs	Référence produit	Fournisseur/Distributeur
Culture cellulaire	0,25% trypsine-EDTA	25200	Gibco / Invitrogen
	14C-créatine	0176	ARC
	14C-sucrose	NEC100X250UC	Perkin Elmer
	3H-propra	NET515250UC	Perkin Elmer
	3H-vinbla	NET1176250UC	Perkin Elmer
	4-nitrophényl acétate	N8130	Sigma Aldrich
	Acide 3-guanidinopropionique	G6878	Sigma Aldrich
	Acide 4-guanidinobutyrique	51018	Fluka
	Acide borique	B9645-500G	Sigma Aldrich
	Amiodarone	A8423	Sigma Aldrich
	B27	17504-044	Gibco / Invitrogen
	Bleu trypan	93595	Sigma Aldrich
	Borax sodium tetraborate decahydrate	S9640-500G	Sigma Aldrich
	BSA	A7906	Sigma Aldrich
	CaCl <sub>2</sub>	1.02083.0250	Merck
	ciclosporine	30024	Fluka
	Collagénase dispase	10269638001	Roche applied science
	Collagène IV	C5533	Sigma Aldrich
	Créatine monohydrate	27900	Fluka
	Cyclocréatine (2-imino-1-imidazolidineacetic acid)	377627	Sigma Aldrich
	Cytosine-bêta-D-arabinose (AraC)	C6645	Sigma Aldrich
	DMEM	41966-029	Gibco / Invitrogen
	DMSO	D4540	Sigma Aldrich
	DMSO	D2650	Sigma Aldrich
	DNase	D5025	Sigma Aldrich
	Dnase type I recombinante	4536282001	Roche applied science
	Eau distillée	15230-071	Gibco / Invitrogen
	Ebm-2 + kits egm-2 mv single quotes	CC-3202/6	Lonza
	Esterase from porcine liver	E3019	Sigma Aldrich
	F-12	21765-029	Gibco / Invitrogen
	Fgf	01-106	Millipore
	Fibronectine	F1141	Sigma Aldrich
	Glucose	G8270	Sigma Aldrich
	HBSS	14185-045	Gibco / Invitrogen
	HBSS 1X sans CaCl <sub>2</sub> et sans MgCl <sub>2</sub>	14170-088	Gibco / Invitrogen
	Hepes	H3537	Sigma Aldrich
	Hepes en poudre	H7006	Sigma Aldrich
	Inhibiteur de trypsine	T9003	Sigma Aldrich
	KCl	1.04936.0500	Merck
	L-glutamine	25030-032	Life Technologies / Invitrogen
	Lucifer yellow CH dilithium salt	L0259	Sigma Aldrich
	MEM-a	22561-021	Gibco / Invitrogen
	MgCl <sub>2</sub>	25108.295	VWR
	MTT	M5655	Sigma Aldrich
	NaCl	27788.297	VWR
	NaHCO <sub>3</sub>	S8875	Sigma Aldrich
	Neurobasal	21103-049	Gibco / Invitrogen
	PBS sans CaCl <sub>2</sub> et sans MgCl <sub>2</sub>	14190-094	Gibco / Invitrogen
	Poly-D-lysine 50 µg/mL	P7280	Sigma Aldrich
	Poly-L-lysine	P8920	Sigma Aldrich
	PSN	15640-055	Gibco / Invitrogen
	Puromycine	P8833	Sigma Aldrich
	Pyruvate de sodium	P5280	Sigma Aldrich
	Scintillant Bio Fluor Plus	6NE9809	Perkin Elmer
	Lipopolysaccharide issu d'Escherichia coli (LPS)	L2630	Sigma Aldrich
Sérum de cheval	26050	Gibco / Invitrogen	
Sérum humain	H4522	Sigma Aldrich	
Solution de neutralisation de la trypsine (TNS)	CC-5002	Lonza	
SVF	14-801E	Lonza	
TLCK	90182	Sigma Aldrich	
Trypsine/EDTA	CC-5012	Lonza	
Trypsine/EDTA 0,05%	25300-054	Gibco / Invitrogen	

## Annexes

<b>Biologie moléculaire</b>	2 Mercaptoéthanol	M3148-25ML	Sigma-Aldrich / Sigma	
	Amorces utilisées	cf tableau	SABioscience / Qiagen	
	Ethanol absolu	20.821.296	Normapur / VWR	
	Plaques Contrôle qualité ARN	PARN-999D	SABioscience / Qiagen	
	QIAshredder	79656	Qiagen	
	RNase away	7002	Molecular Bioproduct	
	RNase-Free DNase Set	79254	Qiagen	
	RNeasy Mini kit	74106	Qiagen	
	RPE buffer	1018013	Qiagen	
	RT <sup>2</sup> first strand kit	330401	SABioscience / Qiagen	
	RT <sup>2</sup> sybr green qPCR mastermix	330503	SABioscience / Qiagen	
	UltraPURE Distilled Water DNase RNase Free	10977-035	Gibco / Invitrogen	
	<b>Chimie analytique</b>	Acétonitrile	412392000	Carlo Erba
		Acide formique	20318.297	AnalaR Normapur Prolabo VWR
Eau distillée		15230	Gibco	
Eau déionisée		-	Aquadem	
Méthanol		20864.320	HiperSolv Chromanorm Prolabo VWR	
<b>Formulation</b>	Labrafac® CC	-	Gattefossé SAS	
	Labrafil® M1944CS	-	Gattefossé SAS	
	Transcutol® HP	-	Gattefossé SAS	
	Solutol® HS15	-	BASF	
	Lipoid® 75-3, Lipoid GmbH	-	BASF	
	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyéthylène glycol)-2000] ou DSPE-mPEG2000-Maléimide	-	Avanti Polar Lipids / Coger	
	NaCl	S5886	Sigma Aldrich	
	HEPES Sodium salt	H7005	Sigma Aldrich	
	EDTA	EDS	Sigma Aldrich	
	Sepharose CL4B	CL4B200	Sigma Aldrich	
	Amiodarone hydrochloride	A8423	Sigma Aldrich	
	Insuline	91077C	Sigma Aldrich	
	Réactif de Traut (2-iminothiolane)	W9987F	Thermo Scientific	
	DiD ou 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate	D307	Invitrogen	
	Kit de dosage Micro BCA	W9987F	Thermo Scientific	
	Cellules THP-1 (monocytes humains)	-	ATCC	
	SHN (Serum Humain Normal)	-	Etablissement du sang, CHU d'Angers	
	Erythrocytes de moutons	-	Eurobio	
	Hémolysine (Anticorps spécifique dirigé contre les érythrocytes de mouton)	-	Eurobio	
	Kit de dosage LAL des endotoxines	88282	Thermo Scientific	

## ***ANNEXE 2***

# ***PRINCIPE DE LA CHROMATOGRPHIE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM***

---



---

## Principe de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est une technique analytique sensible et spécifique qui permet d'identifier et/ou quantifier des composés dans un mélange complexe. Elle associe les capacités physico-chimiques séparatives de la chromatographie liquide à l'analyse moléculaire par la spectrométrie de masse (Figure 94).

La chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) ou ultra haute performance (UPLC) repose sur la séparation d'un mélange de composés à l'aide d'une phase mobile circulant dans une colonne chromatographique constituée d'une phase stationnaire. En fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile, les analytes sont plus ou moins retenus et sont donc élués suivant une durée caractéristique, le temps de rétention, qui correspond au temps auquel les analytes sont détectés en sortie de colonne chromatographique.

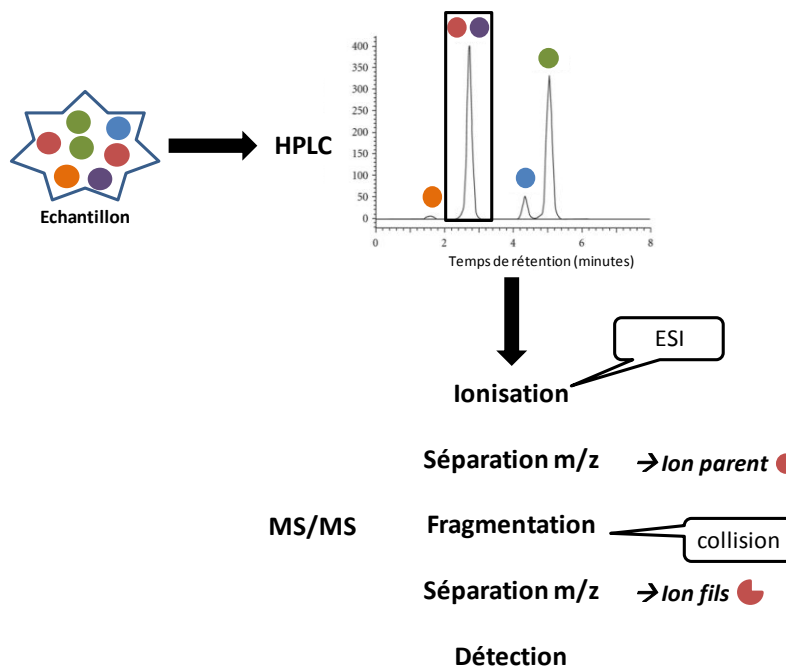
Le liquide contenant le(s) analyte(s) entre ensuite dans le spectromètre de masse où il passe tout d'abord au niveau de la source d'ionisation. Dans notre cas, un électrospray ou électronébuliseur (ESI) vaporise cette phase liquide en microgouttelettes dans un champ électrique intense. Chargées positivement ou négativement selon le mode choisi, ces dernières disparaîtront sous l'effet de l'évaporation libérant ainsi des molécules protonées ou déprotonées.

L'analyseur quadripolaire détecte les ions lors de leur déplacement dans un champ électrodynamique et les sépare en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). L'association de plusieurs quadripôles permet de fragmenter les ions et d'analyser les ions produits. Ceci s'appelle l'analyse par spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS. Ainsi, un triple quadripôle résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires en série séparés par une cellule de collision constituée d'un quadripôle plus court. Dans le cas d'une analyse en tandem, ce dernier est alimenté par un gaz inerte, l'argon, afin de pouvoir provoquer des collisions entre molécules à analyser et molécules de gaz. Dans notre contexte, nous avons exploité l'analyse MS/MS selon le mode Multiple Reaction Monitoring ou MRM. L'ion à étudier, dit parent, est sélectionné dans le premier analyseur à l'aide de son ratio  $m/z$ . Il entre dans la cellule de collision où il est fragmenté en différents ions fils. En effet, l'énergie cinétique est convertie en énergie interne lors des collisions successives. La dissociation se réalisera lorsque son énergie interne sera devenue supérieure à l'énergie d'activation nécessaire à la fragmentation de l'ion. Un seul ou deux ions fragments, généralement les plus



intenses, sont choisis pour être détectés par le second analyseur. Ce mode d'analyse présente une double sélectivité, grâce au suivi de la transition entre l'ion parent et l'ion fils et permet d'augmenter le rapport signal sur bruit par diminution du bruit de fond électronique. Ce mode est particulièrement adapté pour la quantification d'analytes.

Dans un dernier temps, le détecteur transforme les ions en signal électrique qui est ensuite amplifié et intégré par un système de traitement informatique.



**Figure 94 : Principe de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem**

*L'échantillon contient plusieurs composés dont l'analyte d'intérêt (en rouge) qui sont séparés par HPLC. Le temps de rétention seul ne permet pas d'isoler la substance en cas de co-élution avec une autre molécule (analyte violet). La spectrométrie de masse en tandem permet de séparer les ions formés par les composés en sortie du pic d'intérêt HPLC. L'ion parent de l'analyte est spécifiquement fragmenté en ion fils dans la cellule de collision. L'analyte est détecté par une transition de masse spécifique entre l'ion parent et l'ion fils.*

## ***ANNEXE 3***

### ***COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES***

---



## **COMMUNICATIONS ECRITES**

### **Brevet**

Dézard S., Taran F., **Trotier-Faurion A.**, Mabondzo A. EP12352002 (30 juillet 2012)  
*Method for preparing creatine fatty esters, creatine fatty esters thus prepared and uses thereof.*

### **Publications internationales dans des journeaux à comité de lecture :**

**Trotier-Faurion A.**, Dézard S., Taran F., Valayannopoulos V, de Lonlay P. and Mabondzo A.  
*Synthesis and biological evaluation of new creatine fatty esters revealed dodecyl creatine ester as a promising drug candidate for the treatment of the creatine transporter deficiency.* Soumise le 11 février au *Journal of Medicinal Chemistry*

**Trotier-Faurion A.**, Passirani C., Béjaud J., Dézard S., Valayannopoulos V., de Lonlay P., Benoit J.-P., Mabondzo A. *Dodecyl Creatine Ester and Lipid Nanocapsule: A Double Strategy for the treatment of creatine transporter deficiency.* Soumise le 20 février 2013 à *Nature Nanotechnology*

### **Communications par affiche**

**Trotier-Faurion A.**, Dézard S., Béjaud J., Kempf M., Guyot A.-C., Passirani C., Benoit J-P., Taran F., Valayannopoulos V., de Lonlay P. and Mabondzo A. *Chemical optimization of new creatine derivatives to treat the cerebral creatine deficiency.* Congrès de la Société du Cerveau et des Maladies cérébrovasculaires, 12 février 2013

**Trotier-Faurion A.**, Dézard S., Béjaud J., Kempf M., Guyot A.-C., Passirani C., Benoit J-P., Taran F., Valayannopoulos V., de Lonlay P. and Mabondzo A. *Chemical optimization of new creatine derivatives to treat the cerebral creatine deficiency.* Journées jeunes chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, 7 et 8 février 2013 → **Prix poster : invitation aux Rencontres Internationales de la Société de Chimie Thérapeutique (RICT 2013)**

**Trotier-Faurion A.**, Dézard S., Béjaud J., Kempf M., Passirani C., Benoit J-P., Taran F., Mabondzo A. *Chemical optimization of creatine derivatives as a new therapy for the cerebral creatine transporter deficiency syndrome,* Journées de l'Ecole Doctorale 425 - Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué, mai 2012 → **Prix du meilleur poster.**

**Trotier-Faurion A.**, Dorfmüller G., Videau O., Benech H., Bulteau C., Delalande O., Chiron C., Mabondzo A. - *Ontogenesis of cytochromes P450 in human glial cells,* Cold Spring Harbour Laboratory congress, Juillet 2010

## **COMMUNICATIONS ORALES**

*Evaluation de nouvelles stratégies d'optimisation pharmacologique des dérivés de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine.*

Congrès de la Société d'Etude des Interfaces Sang-Cerveau, Paris, 26 octobre 2012

*Evaluation de nouvelles stratégies d'optimisation pharmacologique des dérivés de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine.*

Journées des doctorants de l'iBiTec-S, Gif sur Yvette, 29 mai 2012

*Nanovectorisation vers le système nerveux central.*

Conférence chez Sanofi-Aventis, Chilly-Mazarin, 17 janvier 2012

# Optimisation pharmacologique des dérivés de la créatine pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine

**Alexandra TROTIER-FAURION (Docteur en Pharmacie)**

*Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Renouvelables (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (iBiTec-S), Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI), Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM), 91191 Gif sur Yvette, France*

Le déficit en transporteur de la créatine est une maladie rare neurologique dans laquelle la perte de fonctionnalité du transporteur de la créatine (SLC6A8) conduit à une absence de créatine au niveau cérébral et à des retards de développement majeurs chez les enfants. A l'heure actuelle, aucune thérapie efficace n'est disponible.

Une approche thérapeutique potentielle est le développement de molécules prodrogues de la créatine plus lipophiles qui franchiront les membranes cellulaires de façon passive et la recherche d'une formulation galénique susceptible d'emmener la prodrogue vers les cellules cibles d'intérêt, les neurones. Ainsi, dans cette thèse, nous proposons une nouvelle voie de synthèse originale d'esters de la créatine à longue chaîne aliphatique. Ces composés présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes : nous montrons qu'il existe une relation de structure-activité entre la taille de la chaîne aliphatique (et donc la lipophilie) et la capacité de la molécule à être internalisée dans les cellules endothéliales cérébrales, astrocytaires et neuronales, constituant l'unité neurovasculaire. Il ressort de nos observations expérimentales que l'ester dodécyclique de créatine est le meilleur candidat médicament. De plus, après avoir été internalisé dans les fibroblastes des patients présentant un déficit fonctionnel du transporteur de la créatine, l'ester dodécyclique subit une conversion par les estérases cellulaires, libérant ainsi la créatine dans le compartiment intracellulaire.

La formulation galénique permettant de protéger ces esters de créatine jusqu'au cerveau repose, elle, sur la nanovectorisation, par encapsulation de l'ester dodécyclique de créatine dans des NanoCapsules Lipidiques. L'avantage de cette formulation est de permettre également un ciblage actif vers la Barrière Hémato-Encéphalique, obstacle majeur dans le développement de thérapies ciblant le Système Nerveux Central. Nos observations expérimentales mettent en exergue cette double stratégie thérapeutique pour le traitement du déficit en transporteur de la créatine.

Ce travail a été soutenu financièrement par la Fondation Lejeune.

## **Mots-clés :**

Barrière hémato-encéphalique, Maladies métaboliques rares, Traitement du Déficit en transporteur de la créatine, Esters de créatine, Formulation galénique, Nanovectorisation, NanoCapsules Lipidiques

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

