Développement d'organoïdes cérébraux de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine comme outil d'évaluation de l'efficacité d'agents thérapeutiques

Léa Broca-Brisson

▶ **To cite this version:**

Léa Broca-Brisson. Développement d'organoïdes cérébraux de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine comme outil d'évaluation de l'efficacité d'agents thérapeutiques. Neurobiologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ040 . tel-04551837

HAL Id: tel-04551837
https://theses.hal.science/tel-04551837

Submitted on 18 Apr 2024

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.

THÈSE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASQ040

université PARIS-SACLAY

Développement d'organoïdes cérébraux de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine comme outil d'évaluation de l'efficacité d'agents thérapeutiques

Development of brain organoids from patients with creatine transporter deficiency as a tool for evaluating the efficacy of therapeutic agents

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 596, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques
Graduate School : Health and Drug Sciences
Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans le **Laboratoire d'Étude de l'Unité Neurovasculaire & Innovation Thérapeutique (Université Paris-Saclay, CEA, DMTS, SPI)**, sous la direction d'**Aloïse MABONDZO**, directeur de recherche CEA.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 12 septembre 2023, par

Léa BROCA-BRISSON

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Sandrine ONGERI Professeur, Université Paris-Saclay	Présidente
Olivier BRAISSANT Professeur associé, Université de Lausanne	Rapporteur & Examinateur
Martine COHEN-SALMON Directrice de Recherche, CNRS, Collège de France	Rapporteur & Examinatrice
Jean ARMENGAUD Directeur de Recherche, CEA	Examinateur
Olga CORTI Directrice de Recherche, INSERM, Institut du Cerveau	Examinatrice
Vincent DES PORTES Professeur d'université et praticien hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Développement d'organoïdes cérébraux de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine comme outil d'évaluation de l'efficacité d'agents thérapeutiques

Mots clés : Organoïdes cérébraux, Déficit en transporteur de la créatine, Physiopathologie du CTD, Biomarqueurs CTD, Neurogenèse, Synaptogenèse

Résumé : Le déficit en transporteur de la créatine (CTD) est une maladie génétique et métabolique rare dans laquelle la perte de fonctionnalité du transporteur de la créatine (CRT, SLC6A8) conduit à une absence de créatine dans le cerveau. Les patients CTD présentent un trouble neurodéveloppemental qui se manifeste par une déficience intellectuelle avec un retard de langage, ainsi que des troubles du comportement et de l'épilepsie dans certains cas. À l'heure actuelle, aucune thérapie efficace n'est disponible. L'absence de CRT fonctionnel représente un obstacle majeur à l'administration de créatine dans le cerveau et à l'amélioration du tableau clinique des patients CTD. De plus, les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires cérébraux affectés par la diminution en créatine restent encore à préciser. Les études actuelles sont basées sur l'utilisation de cultures cellulaires humaines classiques, souvent considérées comme non physiologiques, et sur des modèles animaux dont les différences inter-espèces compliquent l'extrapolation des résultats à l'être humain. Pour préciser les mécanismes affectés et identifiés de nouvelles cibles potentielles pour les traitements pharmacologiques, il est important de développer de nouveaux modèles CTD humains pertinents. L'utilisation combinée de ces différents modèles permettrait de renforcer la découverte de biomarqueurs du CTD et de fournir des données convergentes solides pour soutenir les essais cliniques.

Ce projet de thèse repose sur le développement d'organoïdes cérébraux CTD, un modèle cellulaire humain mimant le cerveau des patients CTD pour mieux appréhender le rôle de la créatine dans les dysfonctionnements cérébraux des patients atteints.

Après avoir obtenu et caractérisé ce nouveau modèle *in vitro* humain CTD, la comparaison des protéomes d'organoïdes sains vs CTD a permis d'identifier plusieurs altérations moléculaires et cellulaires en lien avec les processus de neurogenèse et de synaptogenèse, le métabolisme énergétique et les processus de méthylation. Ces observations ont été validées par l'utilisation d'organoïdes cérébraux CTD ré-exprimant le CRT fonctionnel, ainsi que par des modèles murins *Slc6a8*$^{-/y}$ traités ou non avec l'ester dodécylique de créatine (DCE), une prodrogue permettant d'augmenter la teneur en créatine du cerveau.

Les résultats obtenus mettent en exergue que l'absence de créatine cérébrale entraîne une suractivation de la voie GSK3β, l'expression génique de facteurs, la stabilité des microtubules, un déficit d'incorporation du glucose, un déficit mitochondrial et une hypométhylation de l'ADN. Ces modifications semblent altérer les processus de neurogenèse et de synaptogenèse responsables des altérations des fonctions cognitives chez les patients. Ces différentes voies dérégulées, décrites pour la première fois dans le CTD grâce à l'utilisation conjointe d'organoïdes cérébraux CTD humains et de modèles murins *Slc6a8*$^{-/y}$, mettent en évidence de nouveaux biomarqueurs qui peuvent être utilisés pour tester l'efficacité thérapeutique de candidats médicaments dans des études précliniques et cliniques.

Title : Development of brain organoids from patients with creatine transporter deficiency as a tool for evaluating the efficacy of therapeutic agents

Keywords : Brain organoids, Creatine Transporter Deficiency, CTD physiopathology, CTD biomarkers, Neurogenesis, Synaptogenesis

Abstract: Creatine transporter deficiency (CTD) is a rare genetic and metabolic disorder in which loss of functionality of the creatine transporter (CRT, SLC6A8) leads to an absence of creatine in the brain. CTD patients present with a neurodevelopmental disorder manifesting as intellectual disability with language delay, as well as behavioral disorders and epilepsy in some cases. At present, no effective therapy is available. The absence of a functional CRT represents a major obstacle to delivering creatine to the brain and improving the clinical picture of CTD patients. In addition, our knowledge of the molecular and cellular mechanisms in the brain affected by creatine depletion has yet to be clarified. Current studies are based on the use of conventional human cell cultures, often considered non-physiological, and on animal models, whose inter-species differences complicate the extrapolation of results to humans. To clarify the affected mechanisms and identify potential new targets for pharmacological treatments, it is important to develop new, relevant human CTD models. The combined use of these different models would enhance CTD biomarker discovery and provide solid convergent data to support clinical trials.

This thesis project is based on the development of CTD brain organoids, a human cellular model mimicking the brain of CTD patients, to better understand the role of creatine in brain dysfunctions in affected patients.

After obtaining and characterizing this new *in vitro* human CTD model, comparison of the proteomes of healthy vs CTD organoids identified several molecular and cellular alterations linked to neurogenesis and synaptogenesis processes, energy metabolism and methylation processes. These observations were validated using CTD brain organoids re-expressing functional CRT, as well as *Slc6a8*$^{-/y}$ mouse models treated or untreated with dodecyl creatine ester (DCE), a prodrug used to increase brain creatine content.

The results obtained highlight that the absence of cerebral creatine leads to overactivation of the GSK3β pathway, gene expression of factors, microtubule stability, glucose incorporation deficiency, mitochondrial deficiency, and DNA hypomethylation. These changes appear to alter the processes of neurogenesis and synaptogenesis responsible for the cognitive impairment in patients. These different dysregulated pathways, described for the first time in CTD thanks to the combined use of human CTD brain organoids and *Slc6a8*$^{-/y}$ mouse models, highlight new biomarkers that can be used to test the therapeutic efficacy of drug candidates in preclinical and clinical studies.

« Les neurosciences sont de loin la branche la plus passionnante de la science, car le cerveau est l'objet le plus fascinant de l'univers. Chaque cerveau humain est différent, le cerveau rend chaque être humain unique et définit qui il est. »

Stanley B. Prusiner

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury, Pr Sandrine Ongeri, Pr Olivier Braissant, Dr Martine Cohen-Salmon, Dr Jean Armengaud, Dr Olga Corti et Pr Vincent Des Portes de me faire l'honneur de juger ce travail. Je remercie également Carole Chehowah, vice présidente de l'Association Xtraordinaire, de se joindre aux membres du jury de thèse.

J'adresse ma profonde gratitude au Dr Aloïse Mabondzo pour l'opportunité qu'il m'a donnée de travailler sur ce sujet passionnant ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée pour mener ce projet à bien. Ton expertise, ton enthousiasme, ta passion pour la science, ainsi que ton optimisme sans faille m'ont accompagnée tout au long de ces années de thèse et m'ont fait progressée aussi bien professionnellement qu'humainement. Merci de m'avoir encouragée et soutenue. Tu as été un véritable mentor.

Je tiens à remercier les associations de parents de patients, l'Association for Creatine Deficiency (ACD) et l'Association Xtraordinaire, pour leur soutien. Je suis reconnaissante à ces associations de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux en congrès et d'avoir permis la rencontre avec des patients et leurs familles. Ce contact très particulier m'a beaucoup touchée et ne peut que renforcer notre motivation d'aller toujours plus loin dans la recherche pour ces patients. J'adresse en particulier mes remerciements aux trois patients et à leurs familles qui ont fait don des fibroblastes utilisés dans ce projet.

Je remercie également le Dr Christophe Junot et le Dr Stéphanie Simon, successivement chef du Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), de m'avoir accueillie au sein de ce service.

Ce projet a été réalisé grâce à la collaboration avec plusieurs partenaires. Je tiens donc à remercier l'équipe du Dr Frank Yates pour la reprogrammation des iPSC et pour m'avoir formée à la technique de différenciation des organoïdes cérébraux. Je remercie

le Dr Jean Armengaud et les membres de la plateforme ProGénoMix pour l'obtention des datas protéomiques en spectrométrie de masse, ainsi que le Dr Rifat Hamoudi et le Dr Rania Harati pour les analyses bioinformatiques de ces datas. Je remercie le Dr Balazs Sarkadi, le Dr Agota Apati et Orsolya Mozner pour l'obtention des iPSC CTD-rescue. Je remercie également les laboratoires du Dr Matthew Skelton et du Dr Laura Baroncelli pour les souris KO CRT utilisées dans ce projet, ainsi que l'équipe du Dr Nicolas Tournier pour les analyses de [18F]FDG sur ces souris. Je remercie particulièrement le Dr Françoise Geffroy de Neurospin pour ses nombreux conseils sur l'IHC et l'imagerie des coupes.

Je tiens également à remercier les collaborateurs qui m'ont accompagnée au cours de divers tests autour des organoïdes cérébraux : Dr Elena Dossi du Collège de France et Dr Davide Boido de Neurospin pour l'électrophysiologie ; Dr Luisa Ciobanu et Dr Fawzi Boumezbeur de Neurospin pour l'IRM et la spectroscopie RMN ; Dr Aurélie Heuzé de NeuroPSI et Matthieu Simion de Tefor pour la transparisation et imagerie 3D.

Merci à tous mes collègues du Laboratoire d'Étude de l'Unité Neurovasculaire et Innovation Thérapeutique (LENIT) pour l'ambiance chaleureuse et conviviale au sein du labo, pour les pique-niques, les soirées et les escape games ! Merci en particulier à toi, Anne-Cécile, pour ton aide précieuse en salle de culture et tes conseils sur diverses manips. Merci Auriane pour le coup de main sur les dernières manips, pour la découverte de recettes improbables et pour avoir détecté mon premier cheveu blanc ! Je peux dire que la culture d'organoïde, « c'est pas une sinécure ». J'en profite, Romane, pour te laisser la place de doyenne de la culture d'organoïdes au labo, j'espère que tes « miels pops » en culture ne te mèneront pas trop la vie dure ! Merci à Didier, Amaury et surtout merci au maître de la PCR, Narciso, pour ton aide inestimable, notamment sur les PCR. Un grand merci à Marie, ma coloc de rédaction de thèse, pour ton soutien et ta bonne humeur contagieuse, et merci Léa (ma Camerounaise préférée avec tes recettes exotiques) pour ta gentillesse. Merci Lisa d'avoir continué la partie traitement du projet organoïdes CTD. Merci aux joyeux drilles Eva, Cyril et Amalia (je n'oublierai

jamais ta réaction en découvrant le « bureau » sous l'escalier), ainsi qu'aux nouveaux que j'ai moins eu l'occasion de connaitre, et ceux qui sont partis vers de nouvelles aventures. J'emporte de supers souvenirs des moments passés dans le bureau 129.

Je remercie également CERES Brain Therapeutics, et en particulier Clémence : merci pour ton accompagnement sur le sujet CTD ainsi que pour ton implication dans les rédactions des articles et tes conseils pour le manuscrit.

Merci à Gwenaëlle, pour m'avoir formée sur la culture des iPSC, et merci à l'ensemble des collègues du SPI pour l'ambiance conviviale dans le service, notamment avec les Team Building (vive la team Batman 2023 !) et les concours de Noël.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr Valérie Le Morvan et au Dr Laurence Bresson-Bépoldin, mes encadrantes de stage de master, pour m'avoir donné ma première chance dans la recherche et m'avoir toujours soutenue. C'est grâce aux différents stages passés sous vos ailes que j'ai acquis la conviction d'avoir trouvé ma voie. C'est également au cours de ces stages que j'ai manipulé pour la première fois les modèles 3D.

Merci à mes copines de licence/master de la région des chocolatines, Léa, Alexina, Alexandra, Solène (je sais que techniquement tu n'es pas de Bordeaux, mais après un master et une thèse passés dans la région, j'espère qu'on a réussi à te convertir !) : que c'est dur de se retrouver sans vous dans le pays des pains au chocolat et des sacs au lieu des poches…

Aux membres de ma famille qui s'amusent encore à essayer de mémoriser le titre de ma thèse : un immense merci à mes merveilleux parents pour leur soutien indéfectible, vous m'avez toujours soutenue même à 577 km de distance ! À toi Maxou, l'historien de la famille dont la culture générale m'impressionnera toujours, merci d'être mon p'tit frère adoré et d'être sur la même longueur d'onde et ça… « c'est pas faux » !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS **7**

TABLE DES MATIÈRES **11**

LISTE DES FIGURES **14**

LISTE DES TABLEAUX **16**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **17**

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION **21**

PARTIE 1 : LE DÉFICIT EN TRANSPORTEUR DE LA CRÉATINE 23

1. Le métabolisme de la créatine 23

1.1 Généralités 23

1.2 Apport en créatine par l'alimentation 23

1.3 Apport en créatine par la synthèse endogène 24

1.3.1 La synthèse de créatine en périphérie 24

1.3.2 La synthèse de créatine intracérébrale 25

1.4 Excrétion de la créatine 28

1.5 Le système Cr/PCr et créatine kinases 29

1.6 Le transporteur de la créatine SLC6A8 30

1.7 Rôles physiologiques de la créatine 34

1.8 Le métabolisme de la créatine dans les pathologies cérébrales 38

2. Les syndromes de déficit cérébral en créatine 42

2.1 Symptômes des patients CTD 42

2.2 Diagnostic 43

2.3 Fréquence 46

2.4 Pronostic 47

2.5 Physiopathologie du CTD 47

2.5.1 Hypothèses sur l'absence de créatine cérébrale 47

2.5.2 Lien entre l'absence de créatine et les symptômes des patients 49

2.6 Impact des mutations des patients CTD 51

PARTIE 2 : MODÈLES D'ÉTUDE DU DÉFICIT EN TRANSPORTEUR DE LA CRÉATINE 53

1. Les modèles *in vitro* modélisant le CTD 53

2. Les modèles *ex-vivo* 54

3. Les modèles *in vivo* 55
3.1 Les modèles KO ubiquitaire de *Slc6a8* 57
3.1.1 Caractéristiques de ces modèles 57
3.1.2 Utilisation des modèles KO Slc6a8 ubiquitaires pour l'étude de la physiopathologie 60
3.2 Les modèles KO conditionnels de *Slc6a8* 63
3.3 Les modèles KO temporel de *Slc6a8* 64
3.4 Modèles *in vitro* dérivés des modèles murins 65
4. Nouvelles stratégies d'études 65
4.1 Émergence des modèles de culture en 3D 65
4.2 L'utilisation des cellules souches pour les modèles 3D 69
4.3 Le développement d'organoïdes cérébraux 71
4.4 Similitudes des organoïdes cérébraux et le cerveau humain 76
4.5 Les applications des organoïdes cérébraux 79
4.6 Les limites des organoïdes cérébraux 83
PARTIE 3 : STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES 85
1. Restauration du pool de créatine cérébrale 85
1.1 Supplémentation en monohydrate de créatine et précurseurs de synthèse 85
1.2 Dérivés de la créatine 88
1.3 Stratégie de vectorisation au cerveau 95
2. Production d'un transporteur SLC6A8 fonctionnel 96
2.1 Thérapie génique 96
2.2 Repliement du transporteur SLC6A8 99
2.3 Restauration de la traduction pour les mutations non-sens 102
3. Molécules agissant sur la physiopathologie du CTD 103
CHAPITRE 2 – OBJECTIFS 105
CHAPITRE 3 – DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE 111
CHAPITRE 4 – RÉSULTATS & DISCUSSIONS 117
PARTIE 1 : OBTENTION ET CARACTÉRISATION DES ORGANOÏDES CÉRÉBRAUX CTD 121
1. Contexte 121
2. Article 1 : Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency 124
3. Principaux résultats et données supplémentaires 171
4. Discussion 174
PARTIE 2 : ÉTUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DU CTD 177
1. Régulation de la neurogenèse 178

1.1 Contexte 178

1.2 Article 1 – Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency 180

(cf. article entier dans Résultats – Partie 1.2) 180

1.3 Article 2 : Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency 181

1.4 Brevet européen 195

1.5 Principaux résultats et résultats complémentaires 197

2. Métabolisme énergétique 201

2.1 Contexte 201

2.2 Article 3 : Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-derived brain organoids and *in vivo* [18F]FDG PET imaging in a mouse model 203

2.3 Principaux résultats 241

3. Processus de méthylation 245

3.1 Contexte 245

3.2 Article 4 : Epigenetic alterations in creatine transporter deficiency: a new marker for therapeutic efficacy monitoring 246

3.3 Principaux résultats et résultats complémentaires 259

4. Discussion 260

CONCLUSION 271

PERSPECTIVES 283

RÉFÉRENCES 291

ANNEXES 307

Annexe 1 – Matériels et méthodes 309

Annexe 2 – Liste de protéines altérées en fonction de la mutation du patient 312

Annexe 3 – Communications orales et écrites 319

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures chimiques du système créatine (Cr) et phosphocréatine (PCr), catalysé par la créatine kinase (CK) 23
Figure 2 : Biosynthèse de la créatine, transport et système Cr/PCr/CK 25
Figure 3 : Transport et synthèse de la créatine dans le SNC 26
Figure 4 : Structure chimique de la créatinine 28
Figure 5 : Arbre phylogénétique des membres de la famille SLC6 31
Figure 6 : Représentation schématique de la structure de SLC6A8 32
Figure 7 : Rôle de la créatine dans la neuromodulation et neurotransmission 36
Figure 8 : Complexe MtCK/ANT/VDAC dans l'espace intermembranaire mitochondrial 37
Figure 9 : Comparaison de spectres RMN du proton entre individu sain et patients CTD 44
Figure 10 : Incorporation de la créatine dans les fibroblastes 45
Figure 11 : Lien entre la créatine et la fonction mitochondriale 50
Figure 12 : Localisation de diverses mutations sur le transporteur SLC6A8 51
Figure 13 : Chronologie du développement des cultures d'organoïdes 68
Figure 14 : Différents organoïdes pouvant être cultivés à partir de cellules souches pluripotentes 70
Figure 15 : Schéma de la formation du tube neural à partir de la plaque neurale 71
Figure 16 : Représentation simplifiée des principes généraux de l'induction neurale *in vitro* 73
Figure 17 : Représentation du protocole de culture d'organoïdes cérébraux 74
Figure 18 : Divers types d'organoïdes cérébraux pouvant être obtenus par différenciation guidée ou non guidée 75
Figure 19 : Assembloïdes cortico-moteur 75
Figure 20 : Chronologie montrant les similitudes relatives entre le développement du cerveau humain *in vivo* et la chronologie du protocole des organoïdes cérébraux *in vitro* 76
Figure 21 : Représentation simplifiée de la complexité biologique cellulaire du cerveau en développement *in vivo* et de l'organoïde cérébral *in vitro* 77
Figure 22 : Comparaison de l'activité électrique des organoïdes cérébraux avec les EEG de prématurés et d'adultes 78
Figure 23 : Applications diverses de la technologie des organoïdes 79
Figure 24 : Applications diverses des organoïdes cérébraux 80
Figure 25 : Modélisation de troubles du neurodéveloppement avec les organoïdes cérébraux 81
Figure 26 : Cycles folate et méthionine 88
Figure 27 : Structure du complexe Phosphocréatine-Mg 88
Figure 28 : Comparaison des structures des esters de créatine 90
Figure 29 : Structure de la cyclocréatine 92
Figure 30 : Transport de la créatine et de la cyclocréatine dans les cellules avec ou sans CRT 93
Figure 31 : Structure du diacétyl-GAAE 94
Figure 32 : Administration nasale de DCE chez l'humain et le modèle murin 96
Figure 33 : Thérapie génique basée sur des vecteurs AAV 98
Figure 34 : Position des mutations des variants SLC6A8 99
Figure 35 : Points de contrôle de la qualité des protéines dans le RE 100
Figure 36 : Stratégie de repliement du transporteur de la créatine par des chaperonnes pharmacologiques 101
Figure 37 : Localisation du CRT WT et P544L dans des neurones de l'hippocampe de souris avec ou sans traitement au 4-PBA 102

Figure 38 : Stratégie expérimentale développée au cours de ce projet de thèse ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 39 : Incorporation de créatine dans les iPSC saines 171
Figure 40 : Expression de marqueurs d'oligodendrocytes immatures dans les organoïdes cérébraux 173
Figure 41 : Variabilité intra et inter-production des organoïdes cérébraux 174
Figure 42 : Voies de régulation de la GSK3 dans les neurones 198
Figure 43 : Fusion et fission mitochondriales 243
Figure 44 : Fonctions des prohibitines PHB1 et PHB2 dans la mitochondrie 244
Figure 45 : Expression de marqueurs mitochondriaux dans les organoïdes cérébraux 244
Figure 46 : Observations générales sur les organoïdes cérébraux CTD 275
Figure 47 : Représentation des mécanismes mis en évidence dans la physiopathologie du CTD 276
Figure 48 : Représentation des bénéfices du traitement au DCE sur la physiopathologie du CTD et identifications de nouvelles cibles thérapeutiques 288
Figure 49 : Graphiques des efficacités des amorces de PCR 310

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des différents modèles animaux CTD ubiquitaires 56
Tableau 2 : Caractéristiques des différents modèles animaux CTD conditionnels 62
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des cultures 2D, 3D et modèles animaux 67
Tableau 4 : Variabilité intra et inter-production des organoïdes cérébraux 173
Tableau 5 : Amorces pour les PCR 309
Tableau 6 : Mix d'ADNc et programme PCR des tests d'efficacité des amorces 311
Tableau 7 : Liste de protéines spécifiquement altérées entre les organoïdes CTD1-4 vs BJ 315
Tableau 8 : Liste de protéines spécifiquement altérées entre les organoïdes CTD2-3 vs BJ 316
Tableau 9 : Liste de protéines spécifiquement altérées entre les organoïdes CTD3-7 vs BJ 317

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[18F]FDG : [18F]2-fluoro-2-désoxy-D-glucose
4-PBA : 4-phénylbutyrate
AAV : Virus adéno-associé, *Adeno-associated virus*
ADP: Adénosine diphosphate
AGAT : L-arginine:glycine amidinotransférase
AMPK : Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMP), *AMP-activated protein kinase*
AND : Acide désoxyribonucléique
ANT : Translocase ATP/ADP, *Adenine Nucleotide Translocator*
APC : *Adenomatous Polyposis Coli*
ARN : Acide ribonucléique
ASC : Cellules souches adultes, *Adult Stem Cells*
ATP : Adénosine triphosphate
AVC : Accident vasculaire cérébral
BDNF : *Brain-Derived Neurotrophic Factor*
BGT1 : Transporteur de la bétaïne (SLC6A12)
BHE : Barrière hématoencéphalique
CCDS : Syndromes de déficit cérébral en créatine, *Cerebral Creatine Deficiency Syndromes*
cCr : Cyclocréatine
CK/MtCK : Créatine kinase/ Créatine kinase mitochondriale
CP : Plaque corticale, *Cortical Plate*
Cr : Créatine
CREB : *C-AMP Response Element-Binding protein*
CRMP2 : *Collapsin Response Mediator Protein 2*
Crn : Créatinine
CRT : cf. SLC6A8
CSPG4 : *Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4*
CTD : Déficit en transporteur de la creatine, *Creatine Transporter Deficiency*
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DAT : Transporteur de la dopamine (SLC6A3)
DCE : Ester dodécylique de créatine, *Dodecyl Creatine Ester*
DNM1L/DRP1 : *Dynamin 1 Like/ Dynamin-Related Protein 1*
eGFP : Protéine de fluorescence verte renforcée, *enhanced Green Fluorescent Protein*
ERAD : *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*
ESC : Cellules souches embryonnaires, *Embryonic Stem Cells*
FABP7 : *Fatty Acid Binding Protein 7*
FMR1 : *Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1*
GAA : Guanidinoacétate
GABA : Acide γ-aminobutyrique

$GABA_A$: Récepteur du GABA de type A
GABBR1 : Récepteur du GABA de type B1
GAMT : Guanidinoacétate méthyltransférase
GAT1/2/3 : Transporteurs GABA 1 (SLC6A1), 2 (SLC6A13) et 3 (SCL6A11)
GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GLUT : Transporteurs du glucose
GLYT1/2 : Transporteurs de la glycine 1 (SLC6A9) et 2 (SLC6A5)
GPA (ou β-GPA) : β-guanidine propionate ou acide β-guanidinopropionique
GRIA2 : *Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 2*
GSEA : *Gene Set Enrichment Analysis*
GSK3 : Glycogène synthase kinase 3
HDAC1/2 : *Histone Deacetylase 1 et 2*
HEK293 : *Human embryonic kidney 293 cells*
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance, *High Performance Liquid Chromatography*
IBA1 : *Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1*
IGF1 : *Insulin-like Growth Factor-1*
iPSC : Cellules souches pluripotentes induites, *induce Pluripotent Stem Cells*
JAK2/3 : *Janus kinase 2 et 3*
KIF1A : *Kinesin Family Member 1A*
LCR : Liquide céphalorachidien
LOVD : *Leiden Open Variation Database*
LTP : Potentialisation à long terme, *Long-Term Potentiation*
MAP1B : *Microtubule-Associated Protein 1B*
MAP2 : *Microtubule-associated protein 2*
MCT12 : *Monocarboxylate Transporter 12*
MeCP2 : *Methyl CpG binding Protein 2*
MFN1 : *Mitofusine-1*
mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondriale, *Mitochondrial Permeability Transition Pore*
mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
MWM : Labyrinthe de Morris, *Morris Water Maze*
NCAM1 : *Neural Cell Adhesion Molecule 1*
Nedd4 : *Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4*
NET : Transporteur de la norépinéphrine (SLC6A2)
NeuN : *Neuronal Nuclear protein*
NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cells*
NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*
NG2 : *Neuron-Glial Antigen 2*, cf CSPG4
NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
NOR : Test de reconnaissance des nouveaux objets, *Novel Object Recognition test*
NPC : Cellules progénitrices neurales, *Neural Progenitor Cells*
NTT4/5 : *Neurotransmitter Transporter* 4 (SLC6A17) et 5 (SLC6A16)

OCT : Transporteurs de cations organiques
OLIG1 : *Oligodendrocyte transcription factor 1*
OSR1 : *Protein odd-skipped-related 1*
OXPHOS : Phosphorylation oxydative, *Oxidative Phosphorylation*
PAK1/2 : *P21 Activated Kinase 1 et 2*
PCr : Phosphocréatine
PHB : Prohibitines
PLCB1 : *Phospholipase C Beta 1*
ppm : partie par million
PROT : Transporteur de la proline (SLC6A7)
PSC : Cellules souches pluripotentes, *Pluripotent Stem Cells*
PSD95 : *Postsynaptic Density protein 95*
PV : parvalbumine
RE : Réticulum endoplasmique
RMN/H-MRS : Résonnance magnétique nucléaire, Proton Magnetic Resonance Spectroscopy
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène, *Reactive Oxygen Species*
RT-PCR : *Real-Time Polymerase Chain Reaction*
SAM : S-adénosylméthionine
SERT : Transporteur de la sérotonine (SLC6A4)
SFEBq : *Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with Quick reaggregation*
SGK1/3 : *Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 et 3*
SIFT : *Sorting Intolerant From Tolerant*
SLC6 : *Solute Carrier Transporter family 6*
SLC6A10 : Transporteur de la créatine, *Solute Carrier 6A10*
SLC6A8 : Transporteur de la créatine, *Solute Carrier 6A8*
SNC : Système nerveux central
SPAK : *STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase*
SSEA4 : *Stage-Specific Embryonic Antigen-4*
SVZ : Zone subventriculaire, *Subventricular Zone*
TauT : Transporteur de la taurine (SLC6A6)
TEP : Tomographie par émission de positons
UPR : *Unfolded Protein Response*
VDAC : Canal anionique voltage-dépendant, *Voltage-dependent anion channels*
vGluT1 : *vesicular Glutamate Transporter 1*
VZ : Zone ventriculaire, *Ventricular Zone*

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

Partie 1 : Le déficit en transporteur de la créatine

1. Le métabolisme de la créatine

1.1 Généralités

La créatine (Cr), ou acide α-méthyl-guanidinoacétique (Figure 1), est un dérivé d'acide aminé découvert en 1832 par le chimiste Michel-Eugène Chevreul comme constituant de la viande. Il lui a alors donné le nom de créatine en se basant sur le mot grec *kreas* signifiant viande.

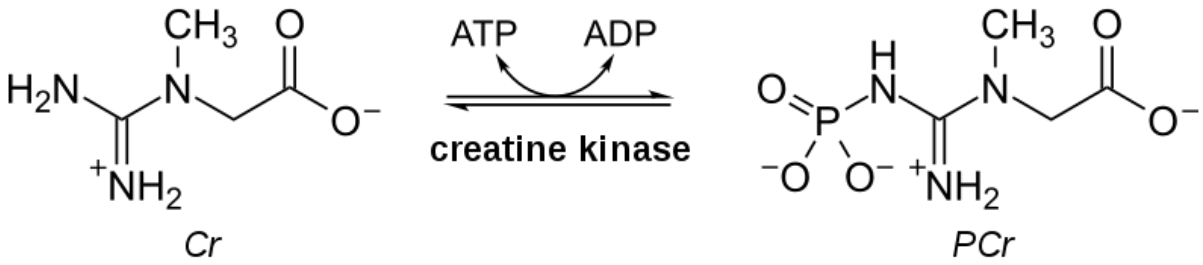


Figure 1 : Structures chimiques du système créatine (Cr) et phosphocréatine (PCr), catalysé par la créatine kinase (CK)

La créatine est une molécule polaire hydrophile (LogP = -1,22) incapable de traverser les membranes plasmatiques sans un transporteur. La très grande majorité de la créatine est retrouvée dans les muscles squelettiques (95 %). Les 5 % restants sont principalement localisés dans le cerveau, le cœur, la rétine, les testicules, le foie et les reins.

1.2 Apport en créatine par l'alimentation

Chez les mammifères, la moitié de l'apport de créatine provient des protéines dans l'alimentation (viandes, poissons et produits laitiers). La créatine ingérée est captée par l'intestin au niveau des entérocytes qui expriment le transporteur de la créatine côté apical. En revanche, le mécanisme de passage vers la circulation sanguine côté basolatéral est inconnu (Rae & Bröer, 2015).

1.3 Apport en créatine par la synthèse endogène

L'autre moitié des besoins en créatine est apportée par une synthèse endogène réalisée en deux étapes (Figure 2). La première étape fait intervenir l'enzyme L-arginine:glycine amidinotransférase (AGAT) qui catalyse le transfert du groupement guanidino de l'arginine à la glycine pour former de l'ornithine et du guanidinoacétate (GAA). La deuxième étape est effectuée par l'enzyme guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT) qui catalyse le transfert du groupement méthyl de la S-adénosylméthionine (SAM) au GAA pour former de la S-adénosylhomocystéine et de la créatine. Certaines études estiment que la synthèse en créatine consommerait 40 % des groupes méthyl de SAM (Brosnan *et al*, 2011).

Il existerait plusieurs niveaux de régulation de la synthèse endogène. L'expression d'AGAT est réprimée au niveau pré-traductionnel par de fortes concentrations en créatine, tandis que l'activité de GAMT est inhibée *in vitro* par des niveaux élevés en S-adénosylhomocystéine (McGuire *et al*, 1984; Stockler *et al*, 2007). De fortes concentrations en arginine, et dans une certaine limite de glycine, favorisent la synthèse de créatine.

1.3.1 La synthèse de créatine en périphérie

La synthèse de créatine dans le corps se fait principalement dans les reins et le foie (Figure 2). AGAT est exprimée de manière prédominante dans les reins, tandis que GAMT est exprimée dans le foie. La synthèse de créatine dans le corps se fait donc principalement dans ces deux organes. Cependant, les enzymes de biosynthèse sont également exprimées à de moindres niveaux dans d'autres organes comme le pancréas et le cerveau.

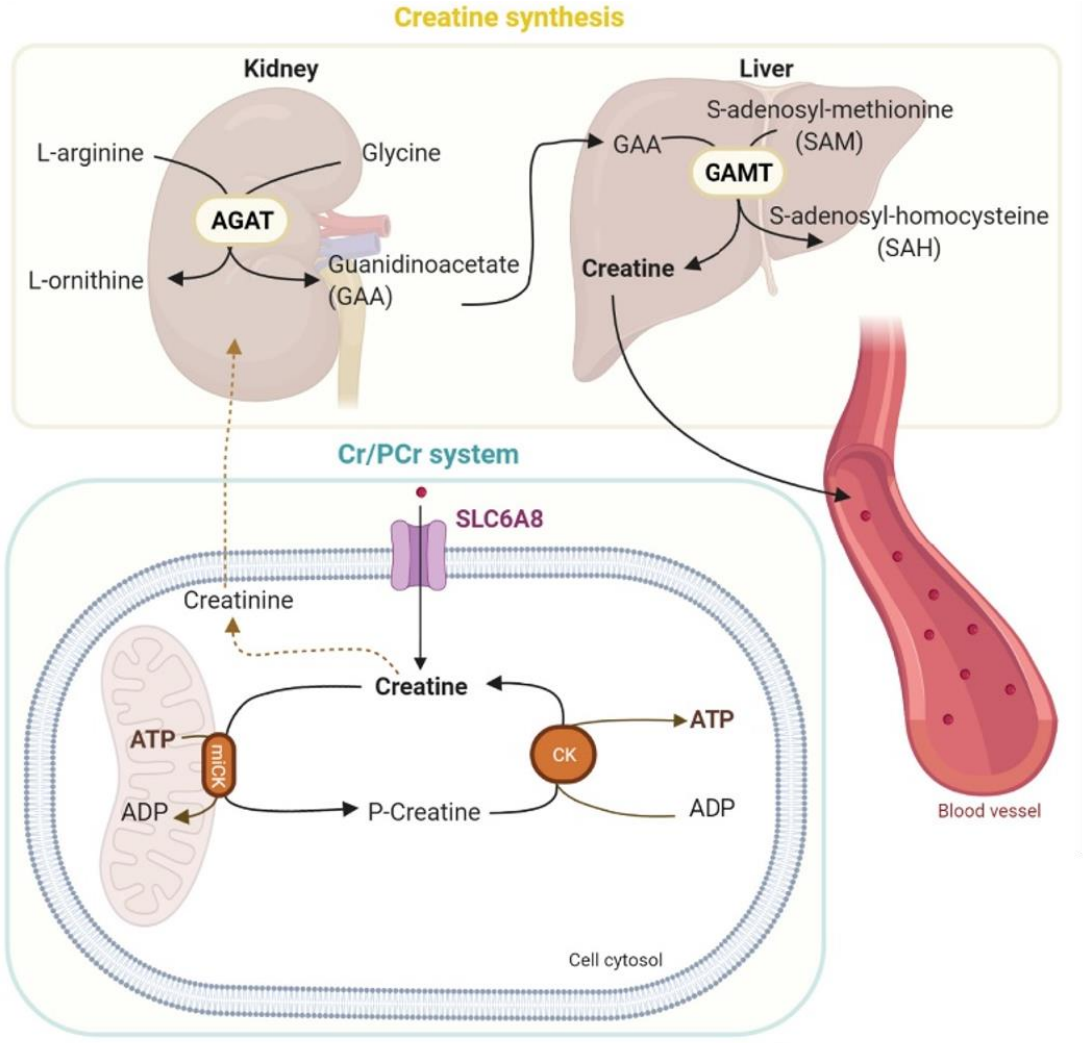


Figure 2 : Biosynthèse de la créatine, transport et système Cr/PCr/CK

Dans les reins, l'enzyme AGAT synthétise l'intermédiaire GAA, qui est transféré dans le foie et méthylé par GAMT pour donner de la créatine. La créatine est libérée dans la circulation sanguine pour atteindre les tissus à fortes demandes énergétiques tels que les muscles squelettiques, le cerveau, les reins et le cœur. Les cellules transportent la créatine par un transporteur spécifique (SLC6A8). La créatine peut être convertie en phosphocréatine par les créatine kinases mitochondriales (MtCK) ou cytosoliques (CK) de manière à réguler les concentrations d'ATP et d'ADP. La créatine est dégradée en créatinine via une réaction spontanée non-enzymatique. La créatinine est excrétée dans les urines. Adapté d'après Fernandes-Pires & Braissant, 2022.

1.3.2 La synthèse de créatine intracérébrale

Une fois synthétisée la créatine est acheminée par voie sanguine vers les organes à fortes demandes en énergie (les muscles, le cœur et le cerveau). La créatine est ensuite internalisée dans les cellules cibles par son transporteur spécifique, SLC6A8. Historiquement, l'apport de créatine au niveau cérébral a été attribuée à la synthèse en

périphérie (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Le transporteur de la créatine (CRT) est exprimé au niveau de la barrière hématoencéphalique (BHE), ce qui permettrait le passage de la créatine dans le parenchyme cérébral (Figure 3).

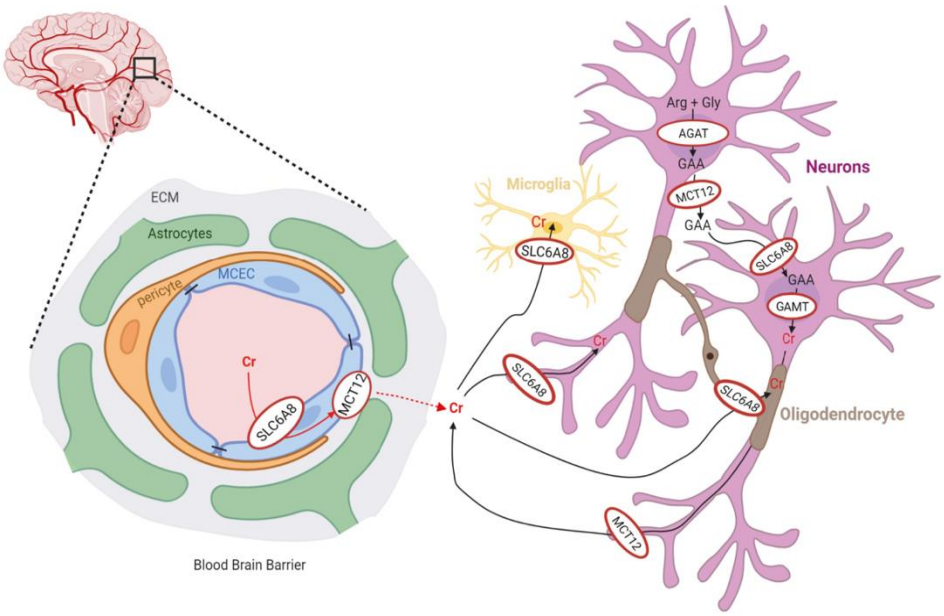


Figure 3 : Transport et synthèse de la créatine dans le SNC

Le passage de la créatine par la BHE est relativement limité puisque les pieds astrocytaires sont dépourvus du CRT. Le cerveau doit assurer une synthèse de créatine intracérébrale. Les enzymes AGAT et GAMT sont exprimées dans les neurones, oligodendrocytes et astrocytes mais sont rarement co-exprimées dans la même cellule, ce qui implique que le GAA doit être transporté via SLC6A8 pour compléter la synthèse de créatine. Adapté d'après Fernandes-Pires & Braissant, 2022.

La BHE est une structure multicellulaire complexe qui sépare le système nerveux central (SNC) de la circulation systémique. Elle est localisée au niveau des cellules endothéliales cérébrales qui tapissent la paroi des microvaisseaux cérébraux. Avec les péricytes, les astrocytes, les oligodendrocytes, les neurones, la microglie et la membrane basale, les cellules endothéliales de la BHE forment une unité fonctionnelle appelée l'unité neurovasculaire (Gosselet, 2017). En interagissant continuellement, ces différents types cellulaires permettent de réguler finement l'influx et l'efflux d'ions, d'oxygène et de nutriments entre les compartiments sanguin et cérébral. Ce contrôle précis de l'homéostasie du SNC permet le bon fonctionnement des neurones et protège également le tissu neuronal des toxines et des agents pathogènes (Daneman & Prat,

2015). Bien que les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales expriment le CRT, les pieds astrocytaires qui entourent la BHE sont dépourvus de ce transporteur rendant le passage de la créatine périphérie relativement limité (Braissant *et al*, 2001, 2002; Lowe *et al*, 2015) (Figure 3). Il semblerait donc que l'apport de créatine dans le cerveau reposerait davantage sur une synthèse intracérébrale. En effet, AGAT et GAMT sont exprimées dans toutes les structures cérébrales et dans plusieurs types cellulaires (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) (Figure 3). En revanche, ces deux enzymes sont très peu co-exprimées dans les mêmes cellules. Dans le cortex cérébral du rat, seulement 12 % des cellules co-expriment les deux enzymes. Comme pour la synthèse périphérique, la synthèse intracérébrale semble donc être divisée spatialement. La synthèse commencerait dans les cellules exprimant AGAT, puis l'intermédiaire GAA pourrait être transporté jusqu'aux cellules exprimant GAMT, en passant par le CRT. D'autres études ont montré que le GAA pouvait également être transporté par le transporteur de la taurine (Braissant, 2012). La créatine synthétisée serait finalement effluée dans le parenchyme cérébral pour être captée par les cellules exprimant le CRT. Comme les enzymes de biosynthèse, le transporteur de la créatine est exprimé dans toutes les structures cérébrales (Braissant *et al*, 2011). En revanche, le CRT n'est exprimé que dans les neurones et les oligodendrocytes et n'est pas détecté dans les astrocytes, à l'exception du cervelet (Mak *et al*, 2009). De plus, les astrocytes peuvent exprimer SLC6A8 quand ils sont dans un état activé ce qui permettrait d'augmenter la perméabilité de la BHE pour la créatine afin de protéger le cerveau de phénomènes d'inflammation (Braissant *et al*, 2008). SLC6A8 est également exprimé au niveau du plexus choroïde et des épithéliums épendymaires. L'efflux de créatine des cellules se ferait quant à lui par un autre transporteur inconnu. Les transporteurs candidats pour l'efflux de la créatine seraient les transporteurs de cations organiques (OCT), comme hOCT2, connu pour transporter la créatine et des composés guanidines (Rae & Bröer, 2015).

L'origine de la créatine cérébrale est probablement différente selon le stade de développement du cerveau. De par le profil d'expression des enzymes de synthèse et

du transporteur, le cerveau adulte semble reposer davantage sur la synthèse intracérébrale, tandis que le cerveau fœtal doit reposer sur la créatine synthétisée dans les organes périphériques ou d'origine maternelle. Pendant le développement fœtal, le cerveau exprime GAMT à des niveaux très faibles alors que l'expression du CRT est plus importante dans les barrières cérébrales (Braissant, 2012). De plus, au début du développement fœtal, le CRT est exprimé au niveau du plexus choroïde mais pas des cellules endothéliales de la BHE, suggérant un passage de la créatine périphérique par la barrière sang-liquide céphalorachidien (LCR). Puis, suite à l'angiogenèse du SNC, l'expression du CRT au niveau des barrières cérébrales serait inversée, favorisant un passage de la créatine périphérique par la BHE.

1.4 Excrétion de la créatine

La Cr et la PCr sont spontanément dégradées par une conversion non-enzymatique en créatinine (Crn), une version cyclisée de la créatine (Brosnan & Brosnan, 2010) (Figure 4). Ce produit de dégradation n'a pas de fonction métabolique, il traverse passivement les membranes des cellules pour être excrété dans les urines (Figure 2). Cette conversion s'effectue à raison de 1,5 % à 2 % de la créatine totale par jour (Wyss & Schulze, 2002; Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014; Cheillan *et al*, 2005). Un homme de 70 kg contient environ 120 g de créatine, dont 90 % sont localisée dans le tissu musculaire (Schulze, 2003). L'excrétion urinaire de Crn est donc un indicateur de la masse musculaire et est utilisée comme marqueur de la fonction rénale. Les niveaux de créatine doivent être restaurés par un apport quotidien assuré par la synthèse endogène et l'alimentation.

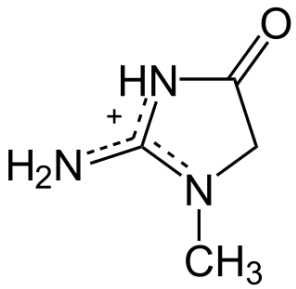


Figure 4 : Structure chimique de la créatinine

1.5 Le système Cr/PCr et créatine kinases

La créatine est un acide aminé jouant un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique par la conversion vers sa forme phosphorylée ou phosphocréatine (PCr) (Figure 1). Ainsi pour mobiliser les groupements phosphates de haute énergie, le couple Cr/PCr nécessite un système de créatine kinases (CK) au niveaux des mitochondries (MtCK) et des sites de consommation (CK cytoplasmiques) (Figure 2).

Il existe deux isoformes de MtCK chez l'humain : la MtCK sarcomérique (sMtCK), dans les muscles, et l'ubiquitaire (uMtCK), dans le reste des tissus dont le cerveau. Les MtCK génèrent de la PCr à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) mitochondriale pour être ensuite transférée dans le cytoplasme. Les MtCK sont généralement situées au niveau des crêtes mitochondriales ou des sites de contacts entre les membranes mitochondriales interne et externe. Elles se présentent sous la forme d'un octamère complexé avec la translocase ATP/ADP et une porine de manière à contrôler finement la concentration ATP/ADP dans l'espace intermembranaire (Rae & Bröer, 2015). Le couple Cr/PCr régule donc la phosphorylation oxydative (l'OXPHOS) en contrôlant la disponibilité de l'adénosine diphosphate (ADP) dans la mitochondrie.

Les CK cytoplasmiques existent sous la forme de dimères de plusieurs isoformes. Il existe des homodimères musculaires (MM-CK) et cérébraux (BB-CK) ainsi qu'un hétérodimère (MB-CK) qui peut être retrouvé dans le cœur. Ces CK cytoplasmiques sont généralement rattachées aux structures qui demandent beaucoup d'ATP pour faciliter les échanges. Il s'agit de couplage fonctionnel (Schlattner *et al*, 2006). Le système Cr/PCr/CK a ainsi un rôle important dans le fonctionnement des ATPases, essentielles pour la restauration des gradients ioniques, le recyclage des neurotransmetteurs, la synthèse moléculaire et le transport dans la cellule.

1.6 Le transporteur de la créatine SLC6A8

La créatine est principalement transportée par un transporteur spécifique, SLC6A8, dépendant du sodium et du chlore. Le gène *Slc6a8* est localisé sur le chromosome X, sur le locus Xq28. Il est exprimé dans la plupart des tissus humains, en particulier dans les muscles squelettiques et les reins, et plus faiblement dans le colon, le cerveau, le cœur, les testicules et la prostate (Salomons *et al*, 2003). Le gène *Slc6a8* est composé de 13 exons et code une protéine de 635 acides aminés ayant une masse de 70 kDa (van de Kamp *et al*, 2014).

SLC6A8 est un membre de la famille des solute-carrier family 6 (SLC6) qui comporte 20 membres de divers transporteurs de neurotransmetteurs et d'acides aminés (Pramod *et al*, 2013) (Figure 5). La famille SLC6 est divisée en 4 sous-groupes en fonction du type de substrat transporté :

- *Les transporteurs de neurotransmetteurs* : les transporteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (SLC6A1, GAT1 ; SLC6A11, GAT3, SLC6A13, GAT2), les transporteurs de monoamines (norépinéphrine, SLC6A2, NET ; dopamine, SLC6A3, DAT ; sérotonine, SLC6A4, SERT), et les transporteurs de la glycine (SLC6A5, GLYT2 ; SLC6A9, GLYT1).
- *Les transporteurs d'acides aminés* : le transporteur de la proline (SLC6A7, PROT), et des transporteurs d'acides aminés neutres et cationiques (SLC6A14, B^{0+}/ATB^{0+} ; SLC6A15, B^0AT2 ; SLC6A17, NTT4/XT1 ; SLC6A18, B^0AT3 ; SLC6A19, B^0AT1 ; SLC6A20, IMINO).
- *Les transporteurs d'osmolytes* : le transporteur de la taurine (SLC6A6, TauT), les transporteurs de la créatine (SLC6A8, CRT1 ; SLC6A10, CRT2), et le transporteur de la bétaïne (SLC6A12, BGT1).
- *Un transporteur orphelin* (SLC6A16, NTT5).

Les divisions fonctionnelles de la famille SLC6 correspondent étroitement aux regroupements observés en phylogénie (Pramod *et al*, 2013) (Figure 5). Les SLC6 sont des transporteurs actifs secondaires puisqu'ils transportent leurs substrats contre leur

gradient électrochimique grâce à l'énergie fournie par un ion sodique qui suit son gradient électrochimique. La plupart de SLC6 co-transportent aussi un ion chlorure. SLC6A8 co-transporte ainsi deux Na^+ et un Cl^- pour faire passer la créatine dans la cellule contre son gradient électrochimique.

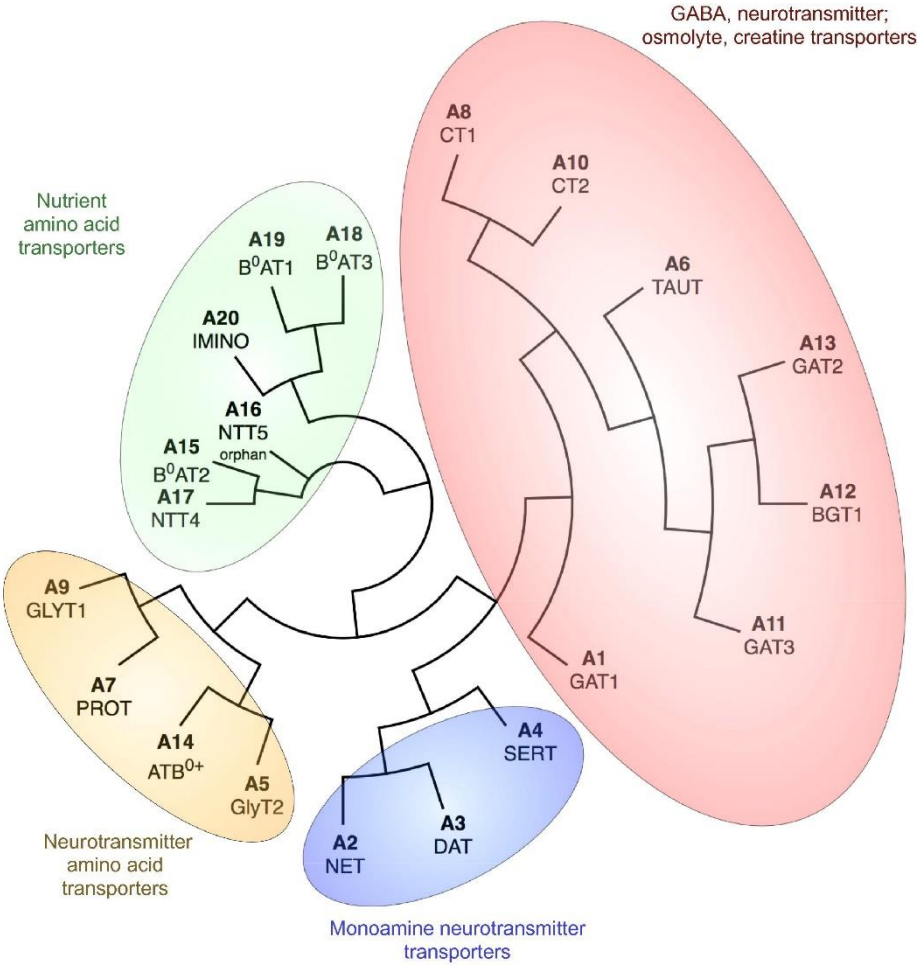


Figure 5 : Arbre phylogénétique des membres de la famille SLC6

D'après Pramod *et al*, 2013

En terme d'homologie, SLC6A8 est le plus proche du transporteur de la taurine (52% d'homologie) et des transporteurs GABA/bétaïne (48-50% d'homologie) (van de Kamp *et al*, 2014). Cependant, l'homologie n'est pas assez importante pour que les substrats de ces transporteurs soient efficacement pris en charge par SLC6A8. En revanche, il suffit de substituer quelques acides aminés de SLC6A8 pour le convertir en transporteur du GABA (Dodd & Christie, 2007).

La structure hypothétique de SLC6A8 consiste en 12 segments transmembranaires avec les parties N-terminale et C-terminale tournées vers le cytoplasme, ainsi qu'une grande boucle extracellulaire entre les segments 3 et 4 avec des sites de N-glycosylation (van de Kamp *et al*, 2014; Christie, 2007) (Figure 6). Il existe également des sites putatifs de phosphorylation au niveau des extrémités de la protéine et dans les boucles intracellulaires entre les segments 2 et 3, et les segments 4 et 5. Ces modifications post-traductionnelles pourraient être importantes pour réguler son activité. En effet, il a été montré que l'AMPK (« AMP-activated protein kinase ») serait un régulateur positif du transport de la créatine dans les cardiomyocytes, tandis qu'il inhiberait le transport dans les cellules rénales (van de Kamp *et al*, 2014). De plus, les kinases mTOR, PIKfyve, SGK1 et SGK3 augmentent l'activité du CRT, alors que JAK2, JAK3, SPAK, OSR1 et GSK3β l'inhibent (Shojaiefard *et al*, 2006; Strutz-Seebohm *et al*, 2007; Shojaiefard *et al*, 2005, 2012; Fezai *et al*, 2015, 2014, 2016).

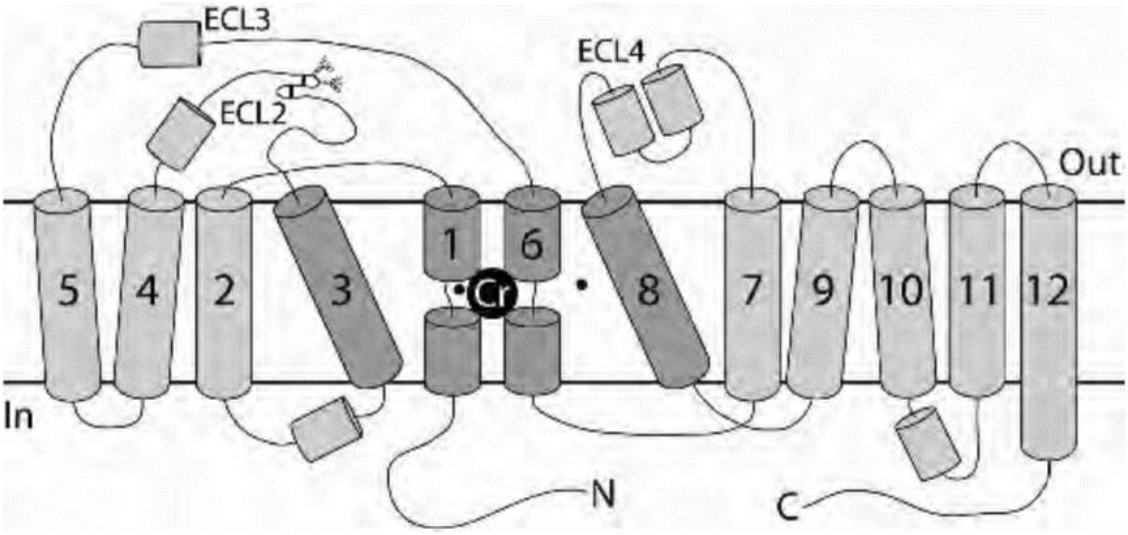


Figure 6 : Représentation schématique de la structure de SLC6A8

La structure de SLC6A8 est basée sur celle du transporteur de la leucine, LeuT, d'*Aquifex aeolicus*. (ECL, boucle extracellulaire). Le site de liaison prédit pour la créatine est indiqué par le rond noir Cr. Les petits points noirs indiquent le Na+ lié. D'après Christie, 2007.

Une étude a également décrit un motif putatif leucine zipper dans la 3^{e} boucle extracellulaire qui pourrait être impliqué dans la polymérisation du transporteur (Sora *et al*, 1994). De plus, des résultats et observations chez d'autres transporteurs suggèrent que les régions après le segment 10 seraient impliquées dans l'oligomérisation de ces transporteurs (Betsalel *et al*, 2012).

L'activité du CRT pourrait être régulée par des hormones (Shojaiefard *et al*, 2005). Dans le cœur, l'hormone de croissance et l'hormone thyroïdienne modulent la transcription du gène *Slc6a8*. De plus, le transport de créatine est augmenté par les catécholamines, l'hormone thyroïdienne, l'amyline, l'insuline (à des concentrations supra-physiologiques) et l'IGF1. L'action de ces hormones passerait par la modulation du gradient de sodium à travers la membrane par la stimulation de la Na/K/ATPase, modulant ainsi le transport actif secondaire dépendant du sodium du CRT.

SLC6A8 a une forte affinité envers la créatine (Km entre 15 et 110 µM) (Ardon *et al*, 2016; Snow & Murphy, 2001). Il est ainsi exprimé dans les organes ayant de forts besoins en énergie ainsi que dans les structures responsables du maintien des réserves de créatine dans le corps. En effet, au niveau intestinal, SLC6A8 est localisé dans la partie apicale des entérocytes pour permettre le passage de la créatine exogène. Dans les reins, SLC6A8 permet la réabsorption de créatine en étant exprimé au niveau de la partie apicale des cellules du tubule proximal. Cependant, la sortie de Cr dans le sang par le CRT est impossible à cause du gradient Na^{+} et Cl^{-} qui est inversé. Pour compléter la réabsorption de créatine transépithéliale au niveau intestinal et rénal, la créatine a besoin d'un autre mode de transport.

Il existe deux variants d'épissage : SLC6A8C ou CRT4, dont l'ARNm contient l'intron 4 et les exons 5 à 13, et SLC6A8D ou CRT5, identique au précédent sans l'exon 9 (Martínez-Muñoz *et al*, 2008; Ndika *et al*, 2014). Ces variants d'épissage sont incapables de transporter la créatine, mais ils pourraient réguler l'oligomérisation de SLC6A8 ce qui affecterait son trafic et sa stabilité. Ces variants d'épissage permettraient une plus grande abondance du CRT en contribuant à être des cibles alternatives de Nedd4-2,

une ubiquitine ligase, qui influence la dégradation de transporteurs Na^+/Cl^-. Cette hypothèse est étayée par le fait que SGK1 et SGK3, des inhibiteurs de Nedd4-2, augmentent le V_{max} du CRT (Ndika *et al*, 2014).

Il existe également un pseudogène, SLC6A10P localisé sur le chromosome 16p11.1. Il s'agirait d'une duplication de la région Xq28 (Nasrallah *et al*, 2010). Ce paralogue est exprimé dans les testicules et le cerveau mais il ne serait pas fonctionnel dû à la présence d'un codon STOP prématuré dans l'exon 4 (Bayou *et al*, 2008; Chen *et al*, 2004).

Il existerait un autre transporteur de la créatine, MCT12 (monocarboxylate transporter 12) codé par le gène SLC16A12. Ce transporteur permettrait un transport facilité de la créatine, selon son gradient de concentration, avec un Km élevé (567,4 µM) (van de Kamp *et al*, 2014). Il pourrait s'agir du transporteur qui permet l'efflux de la créatine des cellules rénales et intestinales.

Le β-guanidine propionate (β-GPA) et γ-guanidinobutyrate sont des analogues compétitifs de la créatine qui peuvent donc inhiber son transport par le CRT. L'intermédiaire de synthèse, le GAA, est également transporté par le CRT mais avec une moins grande affinité par rapport à la créatine (Km 10 fois plus élevé pour le GAA) (Tachikawa *et al*, 2008).

1.7 Rôles physiologiques de la créatine

Rôle dans le métabolisme énergétique : bien que les rôles de la créatine soient nombreux et divers, la Cr est principalement associée à la régulation du métabolisme énergétique des cellules (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). En effet, elle est convertie en phosphocréatine par des créatines kinases (CK) qui transfèrent un groupement phosphate de l'ATP (Figure 2). Le système Cr/PCr, couplé aux CK, permet de maintenir des niveaux élevés d'énergie dans les organes à fortes demandes énergétiques comme le cerveau. En effet, le couple Cr/PCr agit comme une navette d'énergie : il transporte

les groupements phosphates de hautes énergies depuis les sites de productions au niveau des mitochondries, jusqu'aux sites de consommations dans le cytoplasme. Le groupement phosphate de la PCr est alors transféré à l'ADP pour régénérer de l'ATP. Contrairement au couple ATP/ADP (Poids moléculaires (PM) = 507 daltons et 427 daltons, respectivement), le système Cr/PCr (PM = 131 daltons et 211 daltons, respectivement) peut diffuser plus librement dans le cytoplasme et à des niveaux plus élevés grâce à sa petite taille et sa faible charge négative. Il constitue donc un pool d'énergie cellulaire qui favorise le maintien des concentrations d'ATP permettant le bon fonctionnement des processus physiologiques. La réaction catalysée par les CK est 40 fois plus rapide que l'OXPHOS pour générer la même quantité d'ATP et 10 fois plus rapide que la glycolyse (Rae & Bröer, 2015).

Rôle dans la neuromodulation et neurotransmission : la créatine est également considérée comme un neurotransmetteur ou neuromodulateur (Almeida *et al*, 2006) (Figure 7). En effet, les composés guanidino comme la créatine et le GAA peuvent affecter la neurotransmission GABAergique en tant qu'agoniste, parfois partiel, des récepteurs $GABA_A$ (Rae & Bröer, 2015). La créatine peut également réduire l'inhibition de la glycine dans des cultures de neurones. Almeida *et al* ont montré que la créatine est libérée dans le SNC comme les neurotransmetteurs classiques (Almeida *et al*, 2006). La libération de créatine est bloquée par l'absence de calcium ou par la tétradotoxine (TTX), et est favorisée par le blocage des canaux potassiques (Rae & Bröer, 2015). La libération de créatine semble donc pouvoir dépendre des potentiels d'action. De plus, l'ajout de créatine favorise l'activité de la pompe Na+/K+ via la voie NMDA-calcineurine, et protège contre la toxicité du glutamate. Plusieurs pistes tendent donc à montrer le rôle neuromodulateur de la créatine, notamment au niveau des récepteurs NMDA et GABA. La créatine est aussi impliquée dans la migration du cône de croissance et l'élongation axonale et dendritique (Braissant & Henry, 2008).

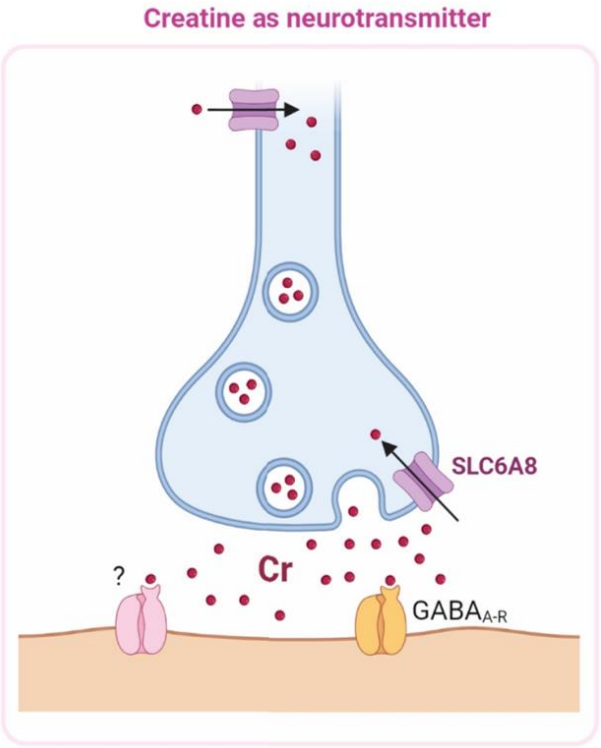


Figure 7 : Rôle de la créatine dans la neuromodulation et neurotransmission

Le rôle de la créatine dans la neurotransmission est mis en évidence par sa libération dépendante de potentiels d'action et ses propriétés d'agoniste partiel des récepteurs $GABA_{A-R}$ post-synaptiques et éventuellement d'autres récepteurs. Adapté d'après Fernandes-Pires & Braissant, 2022.

Rôle dans la stabilisation des membranes : la PCr est un zwitterion de par la présence des groupements phosphate et carboxyl négatifs et du groupement guanidino positif. Sa taille et son caractère de zwitterion lui permet d'interagir avec les têtes chargées des phospholipides membranaires, favorisant la stabilisation des membranes (Tokarska-Schlattner *et al*, 2012). Grâce à son action de tampon énergétique et de stabilisation des membranes, le système Cr/PCr permet ainsi le bon fonctionnement de la Na^+/K^+ ATPase. Cette enzyme est nécessaire au maintien du gradient ionique pour l'excitabilité neuronale.

Rôle anti-apoptotique : la présence de créatine permet à la MtCK de se complexer en octamère avec la translocase ATP/ADP (ANT) et le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) empêchant ou retardant ainsi l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) qui est un processus précoce de l'apoptose (Dolder *et al*, 2003; Schlattner *et al*, 2006; Guzun *et al*, 2012) (Figure 8). Il existe un lien étroit entre la créatine et la fonction mitochondriale. Les modifications du couple Cr/PCr régulent finement la respiration mitochondriale et la diminution de créatine dans le cerveau est associé à une perturbation de l'activité métabolique et des anomalies structurelles des mitochondries (Giusti *et al*, 2019).

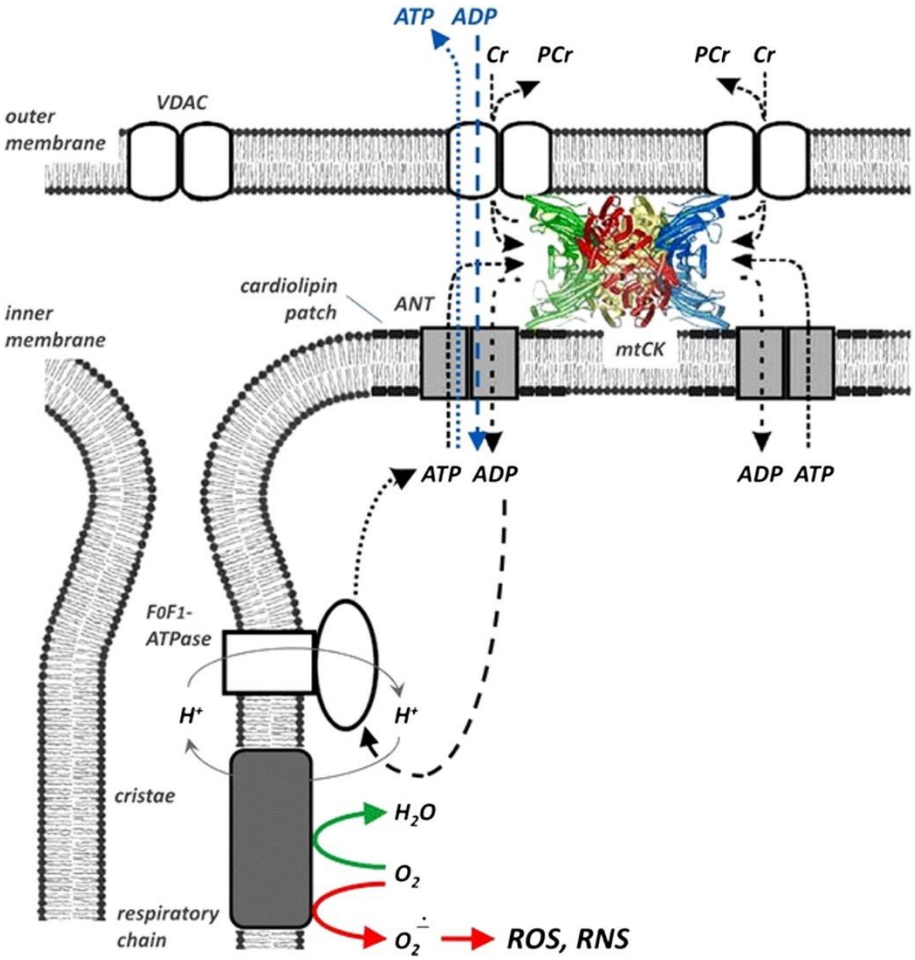


Figure 8 : Complexe MtCK/ANT/VDAC dans l'espace intermembranaire mitochondrial

La présence de créatine permet à la MtCK de se structurer sous forme d'octamère et d'interagir avec ANT et VDAC. Dans ce complexe, l'ATP nouvellement synthétisé par l'ATPase est exporté par ANT dans l'espace intermembranaire au plus près de la MtCK afin de transférer le phosphate de haute énergie sur la Cr. L'interaction de la MtCK avec VDAC facilite l'exportation de PCr dans le cytosol. D'après Guzun *et al*, 2012.

Rôle antioxydant et neuroprotecteur : la créatine pourrait exercer une activité antioxydante légère en piégeant directement des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. La Cr empêcherait également l'induction de lésions dues à l'oxydation sur l'ADN mitochondrial et sur les ARN (Sestili *et al*, 2011). De plus, plusieurs expériences tendent à montrer un rôle neuroprotecteur de la créatine. En effet, dans l'hippocampe de rat, la créatine protège les neurones de la toxicité induite par un excès de glutamate et du peptide β-amyloïde (Brewer & Wallimann, 2000). La supplémentation en créatine semble améliorer la concentration ainsi que la mémoire et l'apprentissage à court terme (Rae *et al*, 2003; Cameron *et al*, 2017).

Rôle comme osmolyte : comme la bétaïne et la taurine, la créatine peut agir comme osmolyte pour protéger les cellules lors d'un stress hypertonique (Alfieri *et al*, 2006). Lorsque des cellules sont confrontées à ce stress, le transport de créatine est augmenté, améliorant ainsi la survie cellulaire. De plus, la créatine peut être libérée lorsque les astrocytes sont exposés à des conditions hypotoniques (Bothwell *et al*, 2002).

1.8 Le métabolisme de la créatine dans les pathologies cérébrales

De par ces rôles divers, la créatine joue un rôle majeur dans l'homéostasie des cellules cérébrales et la supplémentation en créatine peut augmenter les mesures de la fonction cognitive (Forbes *et al*, 2022). Ces effets cognitifs semblent être plus robustes lorsque la bioénergie du cerveau est mise à l'épreuve, comme dans le cas d'une privation de sommeil. Par conséquent, la supplémentation en créatine est envisagée dans le cadre de neuropathologies où la bioénergie du cerveau est altérée (Béard & Braissant, 2010; van de Kamp *et al*, 2014). En effet, plusieurs neuropathologies sont caractérisées par une diminution de créatine cérébrale et/ou un dysfonctionnement bioénergétique.

Pathologies psychiatriques : plusieurs troubles psychiatriques tels que la schizophrénie et la dépression sont associés à des altérations du métabolisme de la créatine (Ongür *et al*, 2009). Il a également été démontré que les patients souffrant de troubles liés à l'anxiété ont une teneur réduite en créatine cérébrale (Gualano *et al*, 2010).

Pathologies génétiques : les niveaux de créatine sont également diminués dans l'atrophie gyrée de la choroïde et de la rétine, une erreur innée du métabolisme causée par des mutations de l'ornithine δ-aminotransférase (Béard & Braissant, 2010). Les patients ont une dystrophie choriorétinienne débutant dans l'enfance et qui peut conduire à la cécité. Cette pathologie génère un déficit secondaire en créatine puisque l'absence d'ornithine δ-aminotransférase entraîne une accumulation importante d'ornithine ce qui inhibe la première étape de la synthèse de créatine. Des erreurs innées dans le métabolisme de l'ammonium peuvent également conduire à une diminution cérébrale en créatine via une inactivation de l'enzyme AGAT (Béard & Braissant, 2010). De plus, dans les troubles du spectre autistique, de jeunes patients peuvent avoir une diminution des concentrations en créatine dans les lobes occipitaux tandis que les adultes ont une légère augmentation dans les lobes temporaux (Ipser *et al*, 2012).

Lésions cérébrales occasionnées par des accidents ou des traumatismes : l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une perte rapide des fonctions cérébrales due à des perturbations de la circulation sanguine dans le SNC, qui se traduit par un apport insuffisant d'oxygène et de glucose pour soutenir l'homéostasie des cellules cérébrales. Dans ces conditions, les niveaux limités de PCr permettent de régénérer l'ATP pour une courte durée. Des études ont ainsi démontré une diminution rapide des réserves de créatine cérébrale sur différents modèles *in vivo* d'ischémies cérébrales ainsi que chez des patients ischémiques (Béard & Braissant, 2010). La teneur en créatine du cerveau diminue également après un traumatisme crânien (Forbes *et al*, 2022). En effet,

immédiatement après une commotion cérébrale ou des lésions cérébrales traumatiques légères, un état d'hypermétabolisme se produit, suivi d'un état d'hypométabolisme. Cependant, en raison de la disponibilité limitée de l'énergie cérébrale et des anomalies du flux sanguin cérébral induites par la blessure, l'apport et la demande d'énergie sont découplés à l'instar de l'AVC.

Maladies neurodégénératives : le stress oxydatif, l'épuisement de l'énergie et les dommages mitochondriaux sont des caractéristiques communes des maladies neurodégénératives (Forbes *et al*, 2022). Alors que d'autres mécanismes peuvent exacerber le dysfonctionnement bioénergétique tels que l'agrégation des protéines et l'altération de la transcription, les modifications du métabolisme énergétique peuvent déclencher une signalisation pro-apoptotique, des dommages oxydatifs, une excitotoxicité et entraver la réparation de l'ADN nucléaire et mitochondrial (Klein & Ferrante, 2007). Ces messages pathologiques peuvent interagir et se potentialiser les uns les autres, entraînant un cycle continu d'épuisement énergétique. L'énergie étant essentielle à la régulation de multiples fonctions cellulaires, la réduction des niveaux d'énergie menace l'homéostasie et l'intégrité cellulaire. La créatine peut agir sur ces altérations en piégeant les espèces réactives de l'oxygène et en augmentant la production d'énergie. De plus, chez les animaux, la supplémentation en créatine s'est montré prometteuse pour la maladie d'Alzheimer et de Huntington. Mais les essais cliniques n'ont pas montré suffisamment d'effet ce qui peut s'expliquer par l'administration de dose plus faible que pour les modèles précliniques, mais également par les différences inter-espèces et le manque d'information sur les mécanismes des pathologies (Rae & Bröer, 2015).

Supplémentation en créatine dans ces neuropathologies : l'administration de créatine tend à montrer des bénéfices dans plusieurs modèles pathologiques *in vivo* (Béard & Braissant, 2010; Forbes *et al*, 2022). En revanche, dans les essais cliniques, les effets sont

plus mitigés et dépendent de la maladie et de son état de progression chez le patient. Ainsi, la créatine semble atténuer la dépression et améliorer la qualité du sommeil chez les personnes souffrant de stress post-traumatique (Gualano *et al*, 2010), tandis qu'elle a un effet clinique limité sur la progression de pathologies neurodégénératives (Forbes *et al*, 2022; Béard & Braissant, 2010). La supplémentation en créatine pourrait jouer un rôle neuroprotecteur si elle est consommée de manière prophylactique dans le cadre de traumatismes crâniens ou à des stades précoces des maladies neurodégénératives (Forbes *et al*, 2022; Rae & Bröer, 2015). De plus, la créatine est peut-être plus intéressante lorsqu'elle est administrée en complément d'autres traitements, pour permettre de pourvoir aux besoins énergétiques pendant que d'autres molécules agissent sur des mécanismes complémentaires.

2. Les syndromes de déficit cérébral en créatine

Les syndromes de déficit cérébral en créatine (CCDS) regroupent des maladies héréditaires neurométaboliques rares où les patients peuvent présenter une absence de créatine dans le cerveau. Il existe trois types de pathologies avec comme caractéristique commune des troubles de comportement liés à l'absence de créatine dans le cerveau. Deux pathologies concernent un déficit de la biosynthèse de la créatine, on parle de déficience en AGAT ou en GAMT, et le troisième est un déficit de transport de la créatine ou déficit en SLC6A8.

La première publication sur les CCDS remonte à 1994 avec la description d'un patient déficient pour GAMT (Stöckler *et al*, 1994). Puis, il faut attendre 2000 et 2001 pour la première identification de patients déficients pour l'enzyme AGAT et le transporteur SLC6A8 (Bianchi *et al*, 2000; Item *et al*, 2001; Cecil *et al*, 2001; Salomons *et al*, 2001). Le déficit en transporteur de la créatine (CTD) constitue l'objet de cette thèse. Le gène codant pour le transporteur SLC6A8 porte une mutation qui abolit la fonctionnalité du transporteur de la créatine.

2.1 Symptômes des patients CTD

Les symptômes des patients CTD se manifestent dès la petite enfance. Le système nerveux central (SNC) est l'organe principalement touché chez ces patients. En effet, les patients CTD présentent un trouble neurodéveloppemental qui se manifeste par une déficience intellectuelle et un retard de langage. La déficience intellectuelle varie de légère à sévère, et semble être plus prononcée avec l'âge (van de Kamp *et al*, 2014). Il existe une hétérogénéité clinique dans les symptômes de ces patients. En effet, 85% des patients CTD présentent des troubles du comportement qui se manifestent par de l'hyperactivité, un déficit de l'attention, des troubles du sommeil et/ou une attitude pseudo-autistique. Près des deux tiers des patients ont aussi des crises d'épilepsie, contrôlables la plupart du temps avec des antiépileptiques (van de Kamp *et al*, 2013; Cheillan *et al*, 2012). De l'hypotonie musculaire est fréquemment notée et des

problèmes gastro-intestinaux sont relativement fréquents. Certains patients ont une corpulence mince et une faible masse musculaire. De plus, les patients CTD sont généralement plus petits que la moyenne. Quelques patients ont des symptômes cardiaques, tandis que certains peuvent avoir des dysmorphismes subtils. Certains patients présentent également des anomalies non-spécifiques de type atrophie cérébrale et/ou cérébelleuse ou des lésions de la substance blanche (Cheillan *et al*, 2012).

Le gène *Slc6a8* étant localisé sur le chromosome X, les mâles sont les plus touchés par le CTD puisqu'ils n'ont qu'une seule version allélique du gène. En revanche, les femelles hétérozygotes peuvent quant à elles présenter une déficience intellectuelle plus légère avec des problèmes de comportement et d'apprentissage (Stockler *et al*, 2007). On estime que 50% des femelles hétérozygotes seraient symptomatiques. Les manifestations cliniques peuvent être plus ou moins prononcées chez les patientes en raison du phénomène d'inactivation du chromosome X. Les patientes symptomatiques peuvent avoir des crises d'épilepsie, notamment des crises non traitables par des médicaments.

Les symptômes des patients CTD sont donc communs à d'autres pathologies neurodéveloppementales ce qui en fait probablement une pathologie sous-diagnostiquée. Plus de 150 patients sont déjà mentionnés dans la littérature (Stockler *et al*, 2007).

2.2 Diagnostic

De par la rareté relative de la maladie et le manque de symptômes spécifiques, le diagnostic des patients CTD peut être un long processus. Il faut combiner plusieurs méthodes pour pouvoir poser le diagnostic avec certitude.

Spectroscopie RMN (Résonance magnétique nucléaire) : l'absence de créatine au niveau cérébral peut être détectée par spectroscopie RMN du proton (H-MRS) (Figure 9). Il s'agit d'une technique non invasive de neuroimagerie 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}H en réponse à des impulsions radiofréquences. Il s'agit de la technique utilisée pour la découverte du 1er patient CCDS et qui permet de constater l'absence d'un pic de créatine (3 ppm) en présence de niveaux normaux de choline (3,2 ppm) et N-acétylaspartate (2 ppm) (Figure 9B). Cependant, cette technique nécessite une sédation des patients. De plus, elle ne permet pas de distinguer les différents déficits en créatine et les femelles CTD peuvent présenter des niveaux variables de créatine avec parfois une normalité par rapport aux contrôles pour certaines patientes (Figure 9C) (van de Kamp *et al*, 2011).

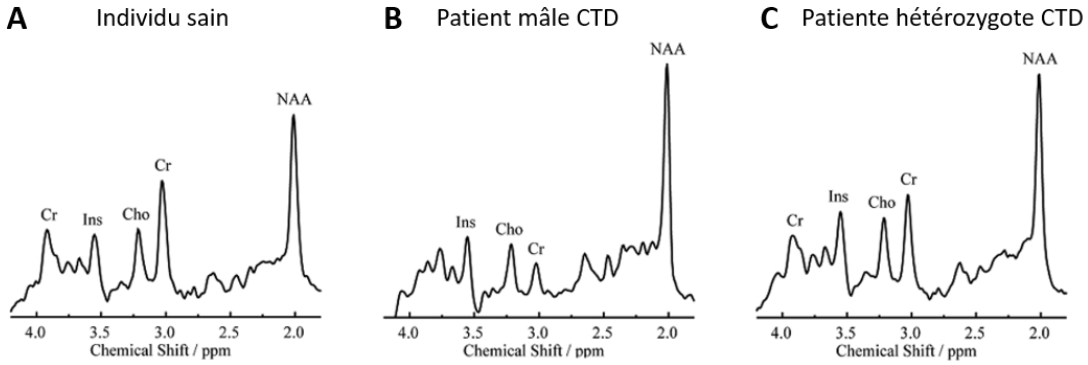


Figure 9 : Comparaison de spectres RMN du proton entre individu sain et patients CTD

Spectres RMN du proton (A) d'un individu sain, (B) d'un patient CTD mâle, (C) d'une patiente CTD femelle hétérozygote. L'axe des abscisses représente les déplacements protoniques caractéristiques des métabolites détectés en ppm. On note la présence du pic de la choline à 3,2 ppm, du N-acétylaspartate à 2 ppm et de la créatine à 3 ppm. Le pic de créatine disparait chez le patient mâle CTD, tandis qu'il est détecté chez la patiente CTD femelle hétérozygote. Adapté d'après van de Kamp *et al*, 2011.

Biochimie : pour confirmer le diagnostic et distinguer les déficits, des méthodes biochimiques peuvent être utilisées en quantifiant les niveaux de GAA, Cr et Crn dans le sang, les urines et le LCR, cela permet le calcul des ratios creatine/créatinine et GAA/créatine. Chez les patients AGAT, on observe une diminution de GAA et de créatine dans les urines et le plasma. La créatinine est aussi diminuée car sa quantité reflète le pool de créatine dans le corps. Les patients GAMT ont des niveaux élevés de

GAA et une diminution de la créatine dans les urines, le plasma et le liquide céphalo-rachidien.

Pour les patients CTD, la concentration en créatine dans le plasma et l'urine est élevée, tandis que le niveau de créatinine est normal dans le plasma et faible dans les urines. Les niveaux élevés de créatine dans les urines sont dus au manque de réabsorption par le CRT dans les cellules tubulaires rénales (Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014). En revanche, ce test n'est pas efficace pour diagnostiquer les femelles CTD qui peuvent avoir un ratio inchangé. De plus, il peut y avoir des faux positifs comme c'est le cas pour des patients atteints de dystrophie musculaire et de thyrotoxicose (Verhoeven *et al*, 2005). Les niveaux de ces métabolites peuvent également fluctuer en fonction de l'alimentation du patient. Pour éviter des faux positifs, il faudrait également répéter ces analyses sur des urines prélevées à plusieurs jours d'intervalle, ou analyser des urines de 24h.

Analyse fonctionnelle : une autre méthode biochimique utilisée pour le diagnostic repose sur des tests de fonctionnalité du transporteur SLC6A8 (Salomons *et al*, 2001). Pour ces tests, il faut prélever des cellules de patients et tester *in vitro* la capacité d'incorporation de la créatine par les cellules. Ainsi, les fibroblastes d'un patient CTD sont incapables d'incorporer de la créatine (Figure 10). Cependant, ce test d'uptake de créatine n'est pas informatif pour les patientes CTD (Salomons *et al*, 2001; van de Kamp *et al*, 2014).

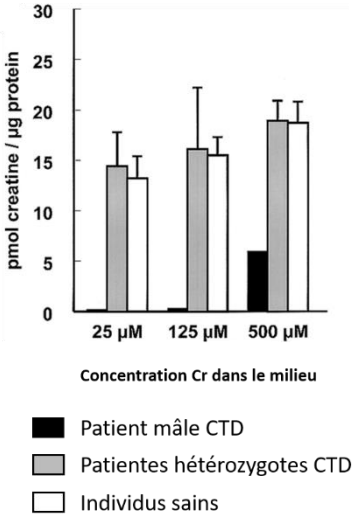


Figure 10 : Incorporation de la créatine dans les fibroblastes

Les fibroblastes d'un patient mâle CTD (en noir), de deux patientes CTD femelles hétérozygotes (membres de la famille du patient mâle) (en gris) et de deux individus sains (en blanc) ont été incubés pendant 24h dans un milieu contenant différentes concentrations de créatine. Ce test permet de voir une absence d'incorporation de créatine dans les cellules du patient mâle CTD, mais ce test n'est pas informatif pour les patients femelles. Adapté d'après Salomons *et al*, 2001.

Analyse moléculaire du gène codant pour le transporteur SLC6A8 : pour finir, le séquençage du gène *Slc6a8* peut permettre de détecter la présence de la mutation et de la déterminer. Il s'agit également de la méthode la plus sûre pour poser le diagnostic des patientes CTD (van de Kamp *et al*, 2014). L'analyse des mutations permet de classer l'origine de la maladie, somatique ou *de novo*, en recherchant chez les proches parents. 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 corréler ces modifications à la perte de l'activité de transport. Certaines mutations permettent de maintenir une fonction de transport résiduel.

Somme toute, la plupart de ces méthodes, prises individuellement, ne permettent pas de poser le diagnostic CTD. Il faut en combiner plusieurs pour poser le diagnostic avec certitude. Cependant, certaines de ces techniques sont chères et ne sont pas présentes dans tous les laboratoires d'analyses. Par conséquent, les patients CCDS peuvent attendre des années pour être diagnostiqués. Il s'agit d'une problématique commune à d'autres retards mentaux dont l'étiologie reste souvent inconnue (Cheillan *et al*, 2005).

2.3 Fréquence

À ce jour, plus de 150 individus ont été décrits comme patients CTD dans les vingt dernières années. Cependant, il s'agit très probablement d'une pathologie sous-diagnostiquée car sa découverte est relativement récente. La fréquence du CTD peut être difficile à déterminer puisqu'elle varie en fonction des critères des cohortes étudiées. La prévalence pourrait être plus importante dans des cohortes restreintes aux retards mentaux liés au chromosome X. Ainsi, plusieurs études ont estimé que le CTD représenterait 1 à 5,4 % de ces retards mentaux (Rosenberg *et al*, 2004; Clark *et al*, 2006; Longo *et al*, 2011; Nasrallah *et al*, 2010; Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014; Cheillan *et al*, 2012). Les données publiées suggèrent 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 (Clark *et al*, 2006). Ainsi, on estime que le CTD pourrait être la 2^{e} cause des maladies lié à l'X après le syndrome de l'X fragile causé par une mutation dans le gène *FMR1* localisé sur le chromosome X (Salazar *et al*, 2020).

2.4 Pronostic

Le CTD ne semble pas être une maladie mortelle, mais l'espérance de vie peut être limitée, en particulier chez les patients ayant des crises d'épilepsie sévères et des handicaps physiques associés. Dans l'étude menée en 2013 par van de Kamp *et al*, l'âge des 101 patients recensés allaient de 1 à 66 ans avec un âge médian de 10 ans (van de Kamp *et al*, 2013). Il est cependant difficile de savoir si l'âge médian reflète une espérance de vie limitée ou un manque de diagnostic chez les adultes à cause de la découverte récente du CTD.

2.5 Physiopathologie du CTD

2.5.1 Hypothèses sur l'absence de créatine cérébrale

Les patients CTD présentent des niveaux normaux de créatine dans le liquide céphalorachidien (LCR) (Braissant *et al*, 2011). En revanche, ces niveaux sont faibles chez les patients GAMT. Cela suggère que la synthèse de créatine intracérébrale est toujours opérationnelle chez les patients CTD, contrairement aux patients AGAT et GAMT. Plusieurs hypothèses peuvent donc être formulées pour expliquer l'absence de créatine cérébrale chez les patients CTD malgré la présence de la synthèse intracérébrale.

Le modèle de synthèse dissociée : les enzymes de biosynthèse peuvent être exprimées dans tous les types cellulaires du cerveau mais sont rarement co-exprimées (Braissant *et al*, 2001). Cela implique que l'intermédiaire GAA doit être transféré entre les cellules exprimant AGAT et celles exprimant GAMT afin de terminer la synthèse en créatine.

Selon ce modèle, le GAA serait transporté par le transporteur SLC6A8. Chez les patients CTD, la synthèse en créatine ne pourrait donc pas aboutir sans le transporteur fonctionnel. En revanche, selon cette hypothèse, des niveaux élevés de GAA devraient pouvoir être détectés dans le cerveau des patients CTD comme pour les patients GAMT. Or, à ce jour, il n'y a qu'un seul patient CTD décrit avec une accumulation de GAA dans le LCR (Sijens *et al*, 2005; van de Kamp *et al*, 2013). De plus, le GAA n'est pas un très bon substrat du CRT et son transport peut se faire avec d'autres transporteurs (Tachikawa *et al*, 2009; van de Kamp *et al*, 2014). Ainsi, en condition physiologique, les concentrations de créatine et de GAA ne permettent probablement pas un très grand passage du GAA par le CRT.

La défaillance de recapture de la créatine : plusieurs résultats indiquent que la créatine pourrait se comporter comme un neurotransmetteur ou neuromodulateur (Almeida *et al*, 2006; van de Kamp *et al*, 2014). Elle serait en effet libérée par les neurones suite à l'arrivée d'un potentiel d'action et modulerait des récepteurs d'autres neurotransmetteurs comme les récepteurs GABA et NMDA. Le CRT est également exprimé dans les synapses et pourrait servir pour recapturer la créatine libérée. Sans le CRT, la créatine ne pourrait donc pas être recapturée entrainant une diminution des pools de créatine intracellulaire altérant ainsi les communications neuronales et l'aggravation des symptômes. De plus, les niveaux de créatine dans le liquide céphalorachidien ne sont pas différents entre les patients CTD et les individus sains du même âge (Braissant & Henry, 2008). Cette théorie de défaillance de recapture de la créatine chez les patients CTD est étayée par des observations similaires chez des souris déficientes pour des transporteurs d'autres neurotransmetteurs, dont certains de la même famille que SLC6A8 tels que les transporteurs de la sérotonine, dopamine et norépinéphrine (van de Kamp *et al*, 2014). Ces souris présentent une diminution des niveaux de ces neurotransmetteurs ainsi qu'une élévation des concentrations de ces mêmes neurotransmetteurs dans le LCR. De plus, des neurones d'hippocampes de souris CTD libèrent *in vitro* 30 à 40% de leurs réserves en créatine en quelques heures, ce qui n'est pas le cas de cellules non cérébrales (HEK293) (van de Kamp *et al*, 2014).

Somme toute, le pool de créatine cérébrale dépendrait d'une balance entre l'apport par la synthèse intracérébrale et le faible passage de la créatine périphérique par la barrière hématoencéphalique, et la recapture de la créatine libérée comme neurotransmetteur. Chez les patients CTD, cette balance serait déséquilibrée par un moindre apport de créatine et par un drainage de la créatine libérée non recapturée, provoquant la diminution générale du pool de créatine cérébrale.

2.5.2 Lien entre l'absence de créatine et les symptômes des patients

Le lien entre l'absence de créatine au niveau cérébral et les symptômes des patients n'est pas clairement établi. Plusieurs pistes ont été soulevées en lien avec le réseau mitochondrial ainsi que la croissance axonale (Andres *et al*, 2008; Braissant *et al*, 2002).

Lien entre créatine et mitochondrie : il existe un lien étroit entre la créatine et la fonction mitochondriale (Figure 11). Les modifications du rapport Cr/PCr régulent finement la respiration mitochondriale et le phénotype métabolique. La déplétion de créatine dans le cerveau est associée à une perturbation de l'activité métabolique et des changements de la structure du réseau mitochondrial (Andres *et al*, 2008; Giusti *et al*, 2019). Il y aurait donc un lien entre le stress métabolique et la voie de la créatine. Des dysfonctions mitochondriales avec une diminution d'ATP et une surproduction de ROS sont des caractéristiques d'autres maladies neurologiques comme les maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique) (Alcaide *et al*, 2011; Béard & Braissant, 2010). La supplémentation en créatine a d'ailleurs montré des propriétés antioxydantes chez les modèles animaux modélisant ces maladies neurodégénératives.

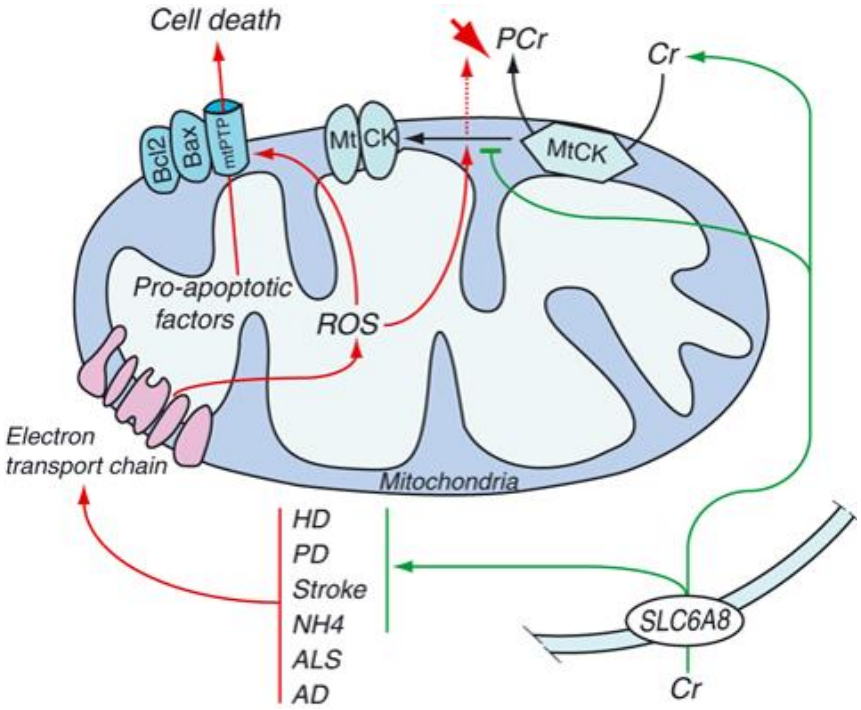


Figure 11 : Lien entre la créatine et la fonction mitochondriale

Plusieurs neuropathologies présentent des dysfonctions mitochondriales qui entraînent la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par la chaîne de transport des électrons. Les ROS inactive la MtCK en changeant sa conformation octamérique en une forme dimérique inactive, ce qui provoque une diminution de PCr. La MtCK dimérique et les ROS modifient la structure du mPTP ce qui conduit à son ouverture et à la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. La supplémentation en Cr peut stabiliser la MtCK octamérique et ainsi empêcher l'ouverture du mPTP et éviter la mort cellulaire. D'après Béard & Braissant, 2010.

Lien entre la créatine et les axones : des expériences de culture de neurones en développement suggèrent que la créatine est nécessaire pour réguler la croissance axonale (Braissant *et al*, 2002). Les déficits en créatine pendant le développement cérébral pourraient donc causer un appauvrissement du réseau d'axones et des densités synaptiques (Chen *et al*, 2021). De plus, les anomalies de structures de dendrites et du réseau neuronal sont considérées comme un signe distinctif de pathologies ayant des symptômes communs au CTD comme le syndrome de Down et le syndrome de l'X fragile (Stockler *et al*, 2007).

2.6 Impact des mutations des patients CTD

Les variants du transporteur SLC6A8, pathogéniques ou bénins, sont regroupées dans une base de données LOVD (https://databases.lovd.nl/shared/genes/SLC6A8). En 2020, plus de 80 variants SLC6A8 pathogéniques étaient recensés (Farr *et al*, 2020). Ces mutations sont très variées puisque la plupart des mutations sont spécifiques d'une famille de patients. Les mutations faux-sens et les délétions d'un acide aminé sont les plus fréquentes puisqu'elles sont retrouvées dans 31% et 24% des familles, respectivement (van de Kamp *et al*, 2013) (Figure 12). D'autres types de mutations ont été recensés dans une moindre fréquence tels que des décalages de cadre de lecture, des mutations non-sens, des erreurs d'épissage, des mutations du site d'initiation de la traduction et des délétions de plusieurs exons. Bien que ces mutations soient retrouvées sur toute la structure du transporteur, un certain nombre de ces mutations sont concentrées dans les segments transmembranaires 7 et 8.

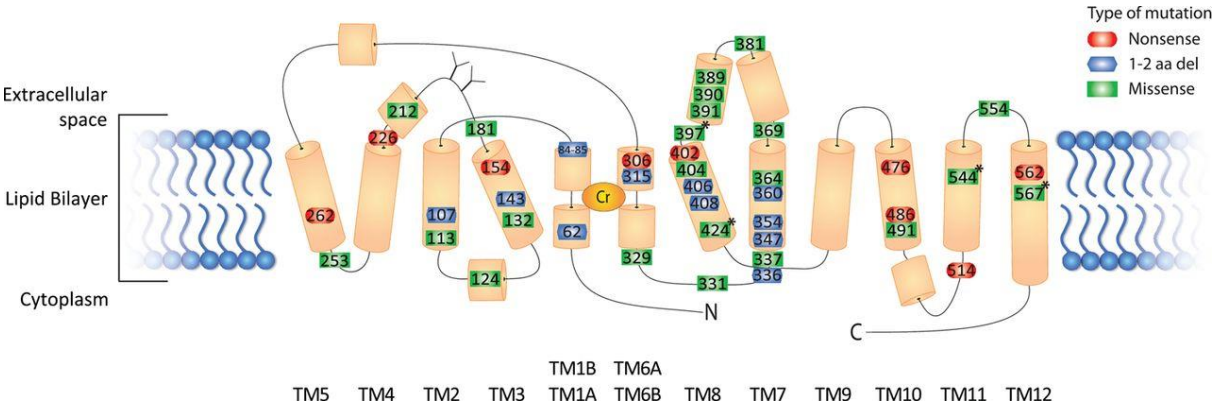


Figure 12 : Localisation de diverses mutations sur le transporteur SLC6A8

Structure du transporteur SLC6A8 avec la localisation de plusieurs mutations faux-sens (en vert), non-sens (en rouge) et délétion d'un ou deux acides aminés (en bleu). Les mutations faux-sens avec une activité résiduelle sont marquées avec un astérisque. D'après van de Kamp *et al*, 2014.

Les mutations sur le gène *Slc6a8* pourraient impacter la fonctionnalité du transporteur de différentes manières. Elles peuvent empêcher la production du transporteur ou produire une protéine tronquée, modifier l'affinité pour le substrat, influencer la stabilité du transporteur ou encore empêcher son acheminement à la membrane plasmique en le bloquant dans le réticulum endoplasmique (Zhang *et al*, 2013; Salazar

et al, 2020). Les mutations peuvent aussi impacter les modifications post-traductionnelles en entrainant une glycosylation aberrante (Farr *et al*, 2020). Dans une étude menée sur 101 patients, un tiers des mutations étaient des mutations *de novo* ce qui ne facilite pas le diagnostic par manque d'antécédents familiaux chez ces patients (van de Kamp *et al*, 2013). De plus, les mutations faux-sens sont plus problématiques car elles ne sont pas forcément pathogéniques. On peut utiliser des outils *in silico* comme SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) ou PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) pour prédire l'impact du variant sur le transporteur (DesRoches *et al*, 2015). Cependant, pour prouver leur pathogénicité et l'absence de fonctionnalité du transporteur, il faut avoir accès aux cellules des patients ou recréer les mutations dans des cellules saines par mutagenèse dirigée pour pouvoir faire des expériences *in vitro* d'incorporation de créatine (Salomons *et al*, 2001; DesRoches *et al*, 2015; Ardon *et al*, 2016).

Plusieurs études ont étudié les relations génotypes/phénotypes chez les patients CTD (van de Kamp *et al*, 2014). Bien que les corrélations entre les mutations et les symptômes des patients ne soient pas évidentes, certains types de mutations semblent être en lien avec le degré de sévérité des déficiences intellectuelles. En effet, 4 mutations faux-sens, détectées chez 9 patients, sont à l'origine d'un transporteur avec une activité résiduelle (van de Kamp *et al*, 2013). Quatre de ces patients ont une déficience intellectuelle légère tandis que les autres ont une déficience modérée. De plus, leurs QI semblent plus élevés et le ratio Cr/Crn urinaire est significativement plus bas que pour le reste des patients de la cohorte ayant des mutations sans activité résiduelle du transporteur. À l'inverse, les patients avec de larges délétions dans le gène *Slc6a8* ont des phénotypes plus sévères (van de Kamp *et al*, 2013, 2014). Certains de ces patients présentent également des délétions de gènes adjacents, tel que BCAP31, qui doivent participer à la sévérité du phénotype. Ainsi, van de Kamp *et al* ont recensé un patient avec une délétion des exons 5-13 présentant un phénotype sévère, avec un ratio Cr/Crn urinaire assez élevé, tandis qu'un autre patient avec une délétion des exons 5-12 avait un phénotype modéré (van de Kamp *et al*, 2015).

Partie 2 : Modèles d'étude du déficit en transporteur de la créatine

La compréhension de la physiopathologie de maladies cérébrales et l'évaluation de l'efficacité de candidats médicaments a conduit au développement de nombreux modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*.

1. Les modèles *in vitro* modélisant le CTD

Les modèles *in vitro* classiques sont des cultures de cellules en monocouche ou en suspension. On recense les cultures primaires, les cultures secondaires et les lignées immortalisées. Les cultures primaires sont composées de cellules non immortalisées provenant d'un organe vivant et qui ont un nombre limité de divisions cellulaires *in vitro*. Elles sont plus représentatives de l'état physiologique *in vivo* que les lignées immortalisées. Les cultures secondaires correspondent au repiquage des cellules de cultures primaires, et conservent les caractéristiques des cellules d'origine. Les lignées cellulaires immortalisées sont des cellules qui peuvent, en théorie, proliférer *in vitro* indéfiniment. Ces cellules échappent au processus de sénescence cellulaire grâce à une mutation qui peut se produire naturellement ou être induite expérimentalement. Leur usage est plus simple que celui des cultures primaires, mais leurs caractéristiques de cellules cancéreuses les éloignent de la physiologie *in vivo* (Carter *et al*, 2022).

À ce jour, le principal modèle de culture *in vitro* modélisant le CTD est la culture primaire de fibroblastes de patients. Les avantages sont que ces cellules peuvent être prélevées facilement par biopsie cutanée et qu'elles possèdent la mutation du patient. Ces fibroblastes sont principalement utilisés pour les tests d'incorporation de la créatine pour le diagnostic de la maladie. À ce jour, deux études ont utilisé ce modèle *in vitro* CTD pour étudier la physiopathologie (Rosenberg *et al*, 2006; Nota *et al*, 2014). Rosenberg *et al* ont montré qu'en insérant le gène *Slc6a8* fonctionnel, les fibroblastes de patients CTD sont capables d'incorporer de la créatine, ce qui montrent l'importance

du CRT dans cette pathologie. Nota *et al* ont analysé le transcriptome des fibroblastes CTD et ont mis en évidence une dérégulation de gènes impliqués dans les protéines de la matrice extracellulaire et dans la structure de la cellule. Toutefois, même si certaines de ces observations pourraient être transposées au cerveau, la culture de fibroblastes reste un modèle éloigné de la physiologie cérébrale ce qui limite la compréhension des dérégulations dans le cerveau des patients CTD. Le reste des études utilisent les fibroblastes CTD comme modèle pour tester des candidats médicaments. Les auteurs essaient ainsi de prédire la capacité d'un dérivé de la créatine à traverser les membranes biologiques lorsqu'il n'y a pas de CRT fonctionnel (Fons *et al*, 2010; Uemura *et al*, 2020). Cependant, comme les fibroblastes se cultivent en monocouche, il ne s'agit pas du modèle *in vitro* le mieux adapté pour prédire le passage d'une molécule à travers un tissu de plusieurs couches cellulaires.

Lorsque des types cellulaires CTD ne sont pas accessibles, certaines méthodes peuvent être mise en place pour recréer le phénotype CTD. Ainsi, Uemura *et al* utilisent des siRNA pour sous-exprimer *Slc6a8* dans des lignées cellulaires (Uemura *et al*, 2020). En revanche, cette méthode n'abolit pas complètement l'expression du transporteur ce qui peut biaiser les résultats.

2. Les modèles *ex-vivo*

D'autres études se sont focalisées sur l'utilisation de coupe de cerveau de souris pour tester le passage de candidats médicaments dans un tissu. Les coupes peuvent être traitées avec un inhibiteur du CRT, l'acide guanidinopropionique (GPA), qui empêche le passage de la créatine (Lunardi *et al*, 2006; Adriano *et al*, 2017, 2022). En revanche, cet inhibiteur ne peut pas être utilisé quand il faut mesurer la créatine dans l'échantillon en HPLC parce que le signal du GPA peut interférer avec celui de la créatine (Adriano *et al*, 2022).

De plus, puisque le passage de créatine par SLC6A8 nécessite deux ions sodiques et un ion chlorure, les coupes d'hippocampe de souris peuvent également être incubées

dans un milieu sans ions chlorure (Lunardi *et al*, 2006; Adriano *et al*, 2011; Garbati *et al*, 2014; Adriano *et al*, 2022). Cependant, l'appauvrissement du milieu en ions chlorure ne peut pas se faire pour les expériences d'électrophysiologies parce que cela inhibe l'excitation des neurones (Adriano *et al*, 2022).

3. Les modèles *in vivo*

Pour pouvoir étudier la physiopathologie cérébrale du CTD et tester des candidats médicaments dans des modèles plus complexes, plusieurs études se sont focalisées sur des modèles *in vivo* (Ghirardini *et al*, 2021). Lors du développement d'un modèle animal, il est important de valider sa pertinence pour étudier la physiologie humaine. Il existe trois niveaux de validité des modèles animaux : (1) la validité de construction définie par la similarité des dysfonctionnements biologiques entre le modèle animal et l'humain ; (2) la validité apparente définie par la similarité avec les symptômes des patients ; (3) la validité prédictive définie par la similarité dans la réponse aux traitements (Rossi *et al*, 2021). Ainsi, dans le cadre du CTD, des études se sont focalisées sur le développement de modèles animaux qui, comme les patients, portent une mutation sur le gène *Slc6a8*, ce qui permet d'avoir une bonne validité de construction. Les différents modèles ont ensuite été étudiés pour déterminer leur validité apparente en évaluant les modifications de métabolites et le degré d'altération de leurs fonctions cognitives.

Modèle	Espèce	Mutation	Niveaux de créatine	Fonctions cognitives	Comportements autistiques	Symptômes musculaires	Épilepsie	Références
KO (2-4)	Souris	Délétion exons 2 à 4	Réduction de créatine dans le cerveau, les muscles, le cœur, le sérum et les testicules	Déficits de l'apprentissage spatial et de la mémoire dans le MWM. Déficit de la mémoire dans le test NOR et de la peur conditionnée.	Pas de déficit social observé.	Réduction du poids du corps. Fonctions motrices altérées avec une nage moins rapide.	Non mentionné	(Skelton *et al*, 2011)
KO (5-7)	Souris	Délétion exons 5 à 7	Réduction de créatine dans le cerveau, les muscles, le cœur et les reins	Déficit de la mémoire déclarative dans le test NOR. Déficit de la mémoire de travail spatial dans le Y maze. Déficit de l'apprentissage spatial et de la mémoire dans le MWM.	Augmentation du temps passé au toilettage. Augmentation de tâches répétitives.	Réduction du poids du corps. Fonctions motrices altérées avec une nage moins rapide et moins d'activité locomotrice dans la cage.	Crises d'épilepsie spontanées chez 30% des animaux. Plus forte susceptibilité à l'épilepsie induite par le kaïnate.	(Baroncelli *et al*, 2014, 2016; Molinaro *et al*, 2019)
KO (LacZ 4-5)	Souris	Insertion cassette LacZ entre les exons 4 et 5, ARNm contenant les exons 1 à 4 de *Slc6a8*	Réduction de créatine dans le cerveau, les muscles et le cœur	Non décrit	Non décrit	Fonctions motrices altérées avec sévère atrophie musculaire. Réduction du poids du corps.	Non mentionné	(Stockebrand *et al*, 2018; Chen *et al*, 2021)
KI Y389C	Rat	Substitution d'acide aminé Y389C (mutation présente chez un patient)	Réduction de créatine dans le cerveau, le plasma et les muscles. Augmentation de GAA dans le plasma. Niveaux normaux de créatine et GAA dans le LCR.	Déficit de la mémoire de travail dans le Y maze.	Tendance à la diminution de la sociabilité. Augmentation du temps passé au toilettage.	Réduction du poids du corps. Fonctions motrices altérées sans atrophie musculaire.	Non mentionné	(Duran-Trio *et al*, 2021, 2022)

Tableau 1 : Caractéristiques des différents modèles animaux CTD ubiquitaires

3.1 Les modèles KO ubiquitaire de *Slc6a8*

3.1.1 Caractéristiques de ces modèles

Il existe plusieurs modèles murins KO ubiquitaires pour *Slc6a8* (Skelton *et al*, 2011; Baroncelli *et al*, 2014; Stockebrand *et al*, 2018; Chen *et al*, 2021; Duran-Trio *et al*, 2021) (Tableau 1). La plupart des modèles consistent à provoquer une délétion importante dans le gène *Slc6a8*. Il existe ainsi deux modèles de souris sans les exons 2-4 de *Slc6a8* (Skelton *et al*, 2011) et sans les exons 5-7 (Baroncelli *et al*, 2014). Deux autres études ont généré des souris avec une insertion d'une cassette LacZ entre les exons 4 et 5 de manière à exprimer un ARNm comprenant seulement les exons 1 à 4 de *Slc6a8* et la séquence LacZ (Stockebrand *et al*, 2018; Chen *et al*, 2021). Toutes ces mutations sont supposées entraîner l'expression du transporteur SLC6A8 tronqué et donc non fonctionnel chez les souris KO. Duran-Trio *et al* ont également généré des rats knock-in (KI $Slc6a8^{Y389C}$) portant une mutation faux-sens qui rend le transporteur non fonctionnel chez les patients CTD. C'est ainsi le seul modèle animal portant la mutation d'un patient CTD. De plus, un des avantages de ce modèle est que les rats sont plus proches de la physiologie, de la biochimie et du comportement humain par rapport aux souris (Duran-Trio *et al*, 2021).

Niveaux de créatine : tous ces modèles murins KO ubiquitaires pour *Slc6a8* ont un déficit en créatine cérébrale qui oscille entre une absence totale ou une forte diminution par rapport aux animaux sauvages. Le déficit en créatine est également observé à la périphérie au niveau des muscles squelettiques, cœur, reins, testicules et sérum. De plus, les niveaux de créatine sont élevés dans les urines du modèle de rat KI (Duran-Trio *et al*, 2021). De plus, les souris femelles hétérozygotes $Slc6a8^{-/WT}$ ont aussi une diminution de créatine dans le cerveau (Hautman *et al*, 2014).

Tests cognitifs : plusieurs tests cognitifs peuvent être faits sur ces modèles pour étudier différents aspects de la cognition :

- Le labyrinthe de Morris (MWM, Morris Water Maze) est utilisé pour évaluer et comparer l'apprentissage et la mémoire chez les rongeurs. Il s'agit d'une piscine remplie d'eau avec une plate-forme d'évacuation cachée sous la surface de l'eau. Ce test est basé sur l'aversion des rongeurs pour l'environnement aquatique. Lorsque l'animal est relâché dans l'eau, il nage autour de la piscine à la recherche de la plate-forme pour s'échapper de l'eau.
- L'alternance spontanée dans le labyrinthe Y (Y maze) est un test comportemental permettant de mesurer la volonté des rongeurs d'explorer de nouveaux environnements. Les rongeurs préfèrent généralement explorer un nouveau bras du labyrinthe plutôt que de revenir à un bras déjà visité.
- Le test de reconnaissance des nouveaux objets (NOR) est basé sur la tendance spontanée des rongeurs à passer plus de temps à explorer un nouvel objet qu'un objet familier. Le choix d'explorer le nouvel objet reflète l'utilisation de la mémoire d'apprentissage et de reconnaissance.
- Le conditionnement à la peur est un type d'apprentissage associatif dans lequel les animaux apprennent à associer un stimulus conditionnel neutre particulier à un stimulus inconditionnel aversif et à présenter une réponse conditionnelle.

Les animaux CTD présentent des déficits dans la plupart de ces tâches (Tableau 1). Cependant, quelques différences peuvent être observées en fonction de l'étude, ce qui peut être dû aux différences entre espèces, entre mutations, ou entre les conditions expérimentales des tests effectués (Ghirardini *et al*, 2021). Les femelles hétérozygotes montrent une hyperactivité, des difficultés d'apprentissage et des déficits de mémoire (Hautman *et al*, 2014). En revanche, le déficit chez ces femelles hétérozygotes est modéré par rapport aux souris mâles.

Symptômes autistiques : des comportements autistiques, tels qu'une augmentation des tâches répétitives et du temps passé au toilettage, ont été décrits dans le modèle de

souris KO (5-7) de Baroncelli *et al*, et le modèle de rat KI de Duran-Trio *et al* (Baroncelli *et al*, 2016; Duran-Trio *et al*, 2021). Mais ces modèles ne semblent pas avoir de problèmes d'interactions sociales.

Épilepsie : Mazziotti *et al* ont rapporté que les souris KO (5-7) ont des crises d'épilepsie spontanées et une plus forte susceptibilité à l'épilepsie induite par le kaïnate (Mazziotti *et al*, 2020).

Symptômes musculaires : tous les modèles murins KO ubiquitaires semblent également présenter une diminution de leur poids (Skelton *et al*, 2011; Baroncelli *et al*, 2014; Stockebrand *et al*, 2018; Duran-Trio *et al*, 2022). Les souris CTD ont également des fonctions motrices altérées avec une sévère atrophie musculaire et une réduction de créatine au niveau musculaire (Stockebrand *et al*, 2018).

Ainsi, dans l'ensemble, ces modèles semblent récapituler plusieurs phénotypes des patients mâles et femelles CTD, à quelques exceptions près en fonction du modèle. En effet, contrairement aux modèles murins CTD, les patients n'ont pas nécessairement de réduction de créatine dans les muscles et ne présentent pas tous des symptômes musculaires (van de Kamp *et al*, 2014). Russell *et al* ont montré que la biosynthèse de créatine est augmentée dans les muscles de souris KO (2-4) mais sans compenser suffisamment pour revenir à des niveaux physiologiques (Russell *et al*, 2014). Ce mécanisme de compensation est peut-être plus efficace dans les muscles de certains patients CTD. Ainsi, l'hétérogénéité clinique des patients n'est pas mise en évidence chez les modèles murins CTD développés. De plus, les concentrations plasmatiques de créatine montrent une tendance à la diminution chez les rats KI ainsi qu'une augmentation de GAA (Duran-Trio *et al*, 2021) ce qui n'est pas le cas chez les patients CTD.

3.1.2 Utilisation des modèles KO Slc6a8 ubiquitaires pour l'étude de la physiopathologie

Depuis peu, les études rapportant la physiopathologie cérébrale de la créatine dans les modèles *in vivo* CTD commencent à émerger.

Altération des circuits neuronaux : le cerveau de différents modèles CTD montre une réorganisation subtile des circuits neuronaux avec une altération des niveaux de neurotransmetteurs et des malformations des dendrites et synapses. En effet, les souris KO (5-7) montrent des signes de vieillissement précoce du cerveau avec une réduction de la densité des synapses inhibitrices GABAergiques, ainsi qu'une dysfonction de la neurogenèse dans l'hippocampe (Baroncelli *et al*, 2016). De plus, Ghirardini *et al* ont récemment montré une altération de l'expression des gènes de neurones excitateurs et inhibiteurs, avec diminution de la densité synaptique dans les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (PV^+) (Ghirardini *et al*, 2023). Dans un modèle murin similaire, Chen *et al* ont confirmé les changements du réseau neuronal avec une modification des épines dendritiques et des synapses (Chen *et al*, 2021). De plus, les souris KO (2-4) présentent une altération du système sérotoninergique (Skelton *et al*, 2011; Abdulla *et al*, 2020b) et une diminution des marqueurs synaptiques impliqués dans la potentialisation à long terme (Ullio-Gamboa *et al*, 2019). Duran-Trio *et al* ont également montré des modifications au niveau des neurones, des oligodendrocytes et des astrocytes dans le cervelet du modèle de rat KI (Duran-Trio *et al*, 2022).

Altération du métabolisme énergétique : plusieurs études ont montré une régulation du métabolisme énergétique chez les souris KO *Slc6a8*. Au niveau musculaire, Stockebrand *et al* ont détecté une surexpression de protéines en lien avec l'OXPHOS et le transport du glucose, ainsi qu'une suractivation de l'AMPK (Stockebrand *et al*, 2018). De plus, Chen *et al* ont montré dans le tissu cérébral du même modèle une augmentation de la signalisation catabolique, via la suractivation de l'AMPK, et une diminution de l'anabolisme, via l'inactivation de mTOR (Chen *et al*, 2021). Dans le

modèle de souris KO (2-4), Perna *et al* ont également mis en évidence une augmentation de la respiration mitochondriale, qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la citrate synthase suggérant une augmentation du nombre de mitochondrie dans les cellules CTD (Perna *et al*, 2016). De plus, Giusti *et al* détectent une augmentation des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et la réponse au stress oxydatif dans les souris KO (5-7) (Giusti *et al*, 2019). Ce modèle murin présente également une accumulation de lipofuscine, un pigment constitué de produits agrégés de la dégradation lysosomale, y compris des protéines oxydées et mal repliées, des lipides, des mitochondries défectueuses et des ions métalliques (Baroncelli et al, 2016). Ces résultats semblent indiquer la présence d'un mécanisme pour tenter de compenser le déficit énergétique causé par l'absence de la créatine. Cependant, ce métabolisme forcé est susceptible d'engendrer une surcharge de sous-produits du métabolisme cellulaire, potentiellement nocifs, qui activeraient à leur tour le système de défense antioxydant.

Altération du système immunitaire : la perte de fonction du CRT dans les macrophages de souris KO (2-4) entraîne une reprogrammation pro-inflammatoire de ces cellules, renforçant la défense de l'hôte en cas d'infection (Ji *et al*, 2019). De plus, les souris KO (5-7) montrent une activation de la microglie, la population de macrophages résidents dans le cerveau, et il est connu qu'une inflammation microgliale excessive est impliquée dans de nombreuses maladies neurologiques (Baroncelli et al, 2016).

Modèle	Espèce	Mutation	Niveaux de créatine	Fonctions cognitives	Comportements autistiques	Symptômes musculaires	Épilepsie	Références
CAMKIIα-KO (2-4)	Souris	Délétion exons 2 à 4 sous le contrôle du promoteur de CAMKIIα (neurones excitateurs du cerveau antérieur)	Déficit de créatine dans le cerveau.	Déficits modestes de l'apprentissage spatial et de la mémoire dans le MWM et le labyrinthe à bras radiaux. Déficit de la mémoire déclarative dans le test NOR.	Souris hyperactives.	Pas de différence de poids. Fonctions motrices normales	Non mentionné	(Kurosawa *et al*, 2012)
Nes-KO (2-4)	Souris	Délétion exons 2 à 4 sous le contrôle du promoteur de Nestine (CNS)	Déficit de créatine dans le cerveau. Augmentation du GAA dans le cerveau.	Déficits de l'apprentissage spatial et de la mémoire dans le MWM. Déficit de la mémoire dans le test NOR et le test de peur conditionnée.	Souris hyperactives.	Pas de différence de poids. Fonctions motrices normales.	Non mentionné	(Udobi *et al*, 2018)
Nes-KO (5-7)	Souris	Délétion exons 5 à 7 sous le contrôle du promoteur de Nestine (CNS)	Déficit de créatine dans le cerveau.	Déficits de la mémoire déclarative dans le test NOR, et de la mémoire de travail dans le test Y maze.	Souris hyperactives.	Légère diminution de poids. Fonctions motrices normales.	Non mentionné	(Baroncelli *et al*, 2016; Molinaro *et al*, 2019)
DAT-KO (2-4)	Souris	Délétion exons 2 à 4 sous le contrôle du promoteur du récepteur à la dopamine (neurones dopaminergiques)	Faible expression d'ARNm *Slc6a8* dans les régions riches en neurones dopaminergiques.	Non décrit	Souris hyperactives.	Légère diminution de poids. Fonctions motrices normales.	Non mentionné	(Abdulla *et al*, 2020a)
KO (2-4) induit par le tamoxifen	Souris	Délétion exons 2 à 4 induite après traitement de l'animal avec du tamoxifen (J5 ou J60, jours après la naissance)	Déficit de créatine dans le cerveau.	Chez souris mutées à J5 : déficits de l'apprentissage spatial et de la mémoire dans le MWM, déficit de la mémoire déclarative dans le test NOR. Pas de déficit chez souris mutées à J60.	Hyperactivité à cause du traitement tamoxifen.	Réduction du poids du corps à partir de l'induction de la mutation.	Non mentionné	(Udobi *et al*, 2019)
PV-KO (5-7)	Souris	Délétion exons 2 à 4 sous le contrôle du promoteur de la parvalbumine (interneurones GABAergiques PV+)	Non mentionné	Déficit de la mémoire dans le test NOR et le test Y maze.	Non mentionné	Poids légèrement inférieur aux souris sauvages.	Plus forte susceptibilité à l'épilepsie induite par le kaïnate.	(Ghirardini *et al*, 2023)

Tableau 2 : Caractéristiques des différents modèles animaux CTD conditionnels

3.2 Les modèles KO conditionnels de *Slc6a8*

Comme mentionné précédemment, les modèles animaux KO ubiquitaires pour *Slc6a8* développent des symptômes musculaires prononcés (Skelton *et al*, 2011; Baroncelli *et al*, 2014; Duran-Trio *et al*, 2021). Skelton *et al* ont noté que les souris KO (2-4) nageaient moins vite dans le MWM que les souris sauvages, ce qui pourrait impacter leur capacité à trouver la plateforme lors du test (Skelton *et al*, 2011). Pour s'affranchir de ces potentielles interférences, des études ont développé des souris KO conditionnelles de *Slc6a8* dans le cerveau (Kurosawa *et al*, 2012; Udobi *et al*, 2018; Baroncelli *et al*, 2016; Molinaro *et al*, 2019) (Tableau 2). Ces souris KO conditionnelles possèdent les mêmes délétions d'exons que les souris KO ubiquitaires, à savoir les exons 2 à 4 (Skelton *et al*, 2011; Kurosawa *et al*, 2012; Udobi *et al*, 2018) ou les exons 5 à 7 (Baroncelli *et al*, 2014, 2016; Molinaro *et al*, 2019). Dans la première étude générant des souris KO conditionnelles, Kurosawa *et al* ont obtenu des souris dont l'expression de la Cre recombinase, générant la mutation sur *Slc6a8*, était sous le contrôle du promoteur CAMKIIα (Kurosawa *et al*, 2012). Cependant, ce promoteur présente quelques limitations puisqu'il n'est actif que dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur (Ghirardini *et al*, 2021). La mutation du CRT se retrouve ainsi localisée dans une partie du cerveau. De plus, le promoteur n'est actif qu'après la naissance. Des niveaux importants de créatine peuvent donc être présents pendant plusieurs semaines chez les nouveau-nés avant d'être progressivement perdus sous forme de créatinine. D'autres études ont donc placé l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la nestine pour permettre une expression plus précoce et plus générale dans le cerveau puisque le promoteur est actif dans les précurseurs neuronaux (Udobi *et al*, 2018; Baroncelli *et al*, 2016; Molinaro *et al*, 2019). Ces souris KO conditionnelles ont un déficit de créatine cérébrale et une augmentation locale de la synthèse de GAA, mais les autres tissus ne sont pas affectés. Ainsi, ces modèles apportent des informations concernant l'impact du déficit de créatine cérébrale en s'affranchissant des impacts du déficit de créatine en périphérie. Ces souris ont des déficits cognitifs similaires aux souris KO ubiquitaires, mais ne présentent pas de diminution du poids

ou de réduction de la vitesse de nage ce qui tend à valider la pertinence des résultats des tests cognitifs obtenus chez les souris KO ubiquitaires. Cependant, les souris KO conditionnelles présentent quelques différences puisqu'elles sont hyperactives et qu'elles ne montrent pas de signes autistiques (Udobi *et al*, 2018; Molinaro *et al*, 2019).

D'autres types de KO conditionnels pour *Slc6a8* peuvent être développés pour étudier l'impact de l'absence de créatine dans des types cellulaires précis. Ainsi, puisque la créatine est impliquée dans des troubles neurodégénératifs associés à la dopamine tels que les maladies de Parkinson et d'Huntington, Abdulla *et al* ont développé un modèle de souris KO pour *Slc6a8* au niveau des neurones dopaminergiques (Abdulla *et al*, 2020a) (Tableau 2). L'expression de la Cre recombinase a été placée sous le contrôle du promoteur d'un transporteur de la dopamine (DAT). Les souris DAT-KO *Slc6a8* ont ainsi montré de l'hyperactivité. Ce type de modèle animal peut donc être intéressant pour étudier les rôles de la créatine dans des régions spécifiques.

3.3 Les modèles KO temporel de *Slc6a8*

De la même manière que l'on peut étudier les effets du manque de créatine sur un type cellulaire donné, Udobi *et al* se sont intéressés à l'impact temporel du manque de créatine (Udobi *et al*, 2019). Ils ont ainsi généré un modèle de souris dont l'expression de la Cre recombinase était induite par un traitement au tamoxifen, de manière à induire la mutation (KO *Slc6a8*, délétion des exons 2-4) chez des nouveau-nés ou chez des adultes (Tableau 2). Les problèmes cognitifs n'apparaissent que quand la mutation est induite précocement dans un cerveau en cours de développement. Malgré une diminution graduelle des niveaux de créatine cérébrale, les souris mutées à l'âge adulte ne semblent pas développer de déficits cognitifs.

3.4 Modèles *in vitro* dérivés des modèles murins

Certaines études utilisent les cellules prélevées dans les modèles murins pour générer des modèles *in vitro* plus complexes que les cultures cellulaires classiques. Ainsi, Hall *et al* ont agrégé des cellules prélevées dans le colon de souris KO (2-4) pour comprendre le rôle du transport de la créatine dans la fonction épithéliale intestinale (Hall *et al*, 2020). De plus, Braissant *et al* ont généré un modèle de neurosphères, composées de cellules de télencéphale de rat, exposées à l'ammonium pour générer un déficit secondaire en créatine (Braissant *et al*, 2008).

4. Nouvelles stratégies d'études

4.1 Émergence des modèles de culture en 3D

Comparé à d'autres pathologies, le développement de médicaments pour les troubles neurologiques présente le plus haut taux d'échec dans les essais cliniques (Gribkoff & Kaczmarek, 2017; Pankevich *et al*, 2014). Une des raisons de ces échecs est le manque de modèles animaux ayant une validité prédictive malgré un certain degré de validité apparente. Au niveau cérébral en particulier, l'espèce humaine a acquis au cours du processus de développement cérébral une expansion corticale plus importante ainsi qu'une complexité des circuits neuronaux (Bhattacharya *et al*, 2022). De plus, au sein d'un même type cellulaire, il peut y avoir des divergences morphologiques et moléculaires entre les modèles animaux et l'humain. Ces différences peuvent être dues à des gènes spécifiques impliqués dans le neurodéveloppement humain, à l'instar de *NOTCH2NL*, *TMEM14B*, *TBC1D3* et *ARHGAP11B*, mais également aux profils épigénétiques des cellules qui peuvent être différents (Bhattacharya *et al*, 2022). En outre, contrairement à tous les modèles animaux, les êtres humains ne sont pas consanguins. L'espèce humaine a donc une diversité génétique qui peut influencer l'apparition et la progression de pathologies ainsi que conditionner les réponses aux traitements (Kim *et al*, 2020). Par conséquent, les modèles les plus pertinents pour étudier la physiopathologie humaine sont les cellules de patients. Cependant, la

recherche sur l'humain est ralentie par la difficulté à obtenir des tissus cérébraux fœtaux et adultes post-mortem ainsi que l'incapacité d'étudier le cerveau des patients avec les méthodes non invasives disponibles. De plus, les cultures cellulaires humaines classiques sont souvent considérées comme non physiologiques de par l'utilisation de cellules immortalisées, ainsi que l'absence de modélisation de l'architecture du tissu et des interactions des différents types cellulaires. Les cellules en monocouche peuvent ainsi perdre leur phénotype originel et leurs caractéristiques fonctionnelles, impactant la pertinence de leurs réponses biologiques. Face à ces limitations, des efforts ont été entrepris pour développer des modèles de cultures cellulaires en trois dimensions (3D) plus pertinents, récapitulant fidèlement la physiologie humaine.

Située à l'interface entre les modèles *in vivo* et *in vitro*, la culture cellulaire en 3D regroupe les processus qui visent à faire croitre les cellules dans leur contexte d'origine. En raison de leur similitude architecturale avec les tissus *in vivo*, les cultures cellulaires 3D conservent les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de leurs homologues *in vivo*, fournissant ainsi un système *in vitro* plus pertinent sur le plan physiologique pour évaluer les réponses biologiques (Badr-Eldin *et al*, 2022; Fang & Eglen, 2017). Les cultures 3D incluent des technologies comme les sphéroïdes, organoïdes, organes-sur-puce, l'ingénierie tissulaire et la bio-impression. Parmi ces techniques, certaines s'appuient sur l'utilisation d'une matrice pour permettre le développement du modèle (Corrò *et al*, 2020). Ces matrices peuvent être des hydrogels biologiques ou synthétiques qui ressemblent à la matrice extracellulaire. D'autres techniques n'utilisent pas de matrice et reposent sur des méthodes physiques comme la goutte pendante où la gravité permet l'agrégation des cellules.

Les avantages et inconvénients des cultures 3D, par rapport aux cultures classiques et modèles animaux, sont résumés dans le Tableau 3.

	Avantages	Inconvénients
Cultures cellulaires 2D	Réalisables avec des cellules humaines Faible coût Faciles à manipuler Faible hétérogénéité Possibilité de générer des biobanques Adaptées au criblage à haut débit	Cellules immortalisées (éloignées de la physiologie) Manque d'architecture du tissu Interactions limitées entre différents types cellulaires Ne modélisent pas ou peu la physiologie humaine
Cultures d'organoïdes 3D	Réalisable avec des cellules humaines (à partir de cellules souches pluripotentes ou de cellules souches adultes) Récapitulent différentes propriétés des organes modélisés Modélisent le développement humain Présence de différents types cellulaires pour modéliser les interactions cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire Plus ou moins adaptées au criblage à haut débit (en fonction du modèle) Possibilité de générer des biobanques (plus ou moins possible en fonction du modèle)	Coût plus élevé que les cultures classiques Hétérogénéité Modèles incomplets (e.g. manque de vascularisation et de système immunitaire) Systèmes de culture plus complexes, manipulations plus compliquées
Modèles animaux	Organisme entier donc complexité physiologique Récapitulent les différents aspects du développement Tests cognitifs possibles (pour l'étude de neuropathologies) Développement de modèles animaux « humanisés »	Espèces différentes de l'être humain ce qui limite l'extrapolation des résultats Coût élevé Hétérogénéité

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des cultures 2D, 3D et modèles animaux

Historiquement, la première tentative décrite autour de la régénération d'un organisme *in vitro* est celle d'Henry Van Peters Wilson en 1907 (Corrò *et al*, 2020) (Figure 13). Il montra que des cellules d'éponges dissociées peuvent s'auto-organiser pour régénérer un organisme entier. Quelques décennies plus tard, d'autres études se sont focalisées sur la dissociation/réagrégation pour générer différents types d'organes chez les amphibiens et le poulet. Ainsi, le terme « organoïde » a commencé à se développer au milieu du XX^{e} siècle par les études de biologie du développement qui utilisaient ces expériences de dissociation/réagrégation pour étudier l'organogenèse (Clevers, 2016). D'autres études utilisaient ce terme pour désigner des organites cellulaires, des tumeurs ou des excroissances tissulaires anormales (Simian & Bissell, 2017).

Le terme organoïde fait référence aujourd'hui à des structures 3D générées à partir de cellules souches ou de tissu primaire, et composées de types cellulaires qui s'auto-organisent recréant les structures et fonctions principales du tissu *in vivo* (Eiraku *et al*, 2008; Lancaster & Knoblich, 2014a; Fatehullah *et al*, 2016). Les organoïdes se prêtent à pratiquement toutes les analyses cellulaires, biologiques et moléculaires qui ont été développées pour les cultures traditionnelles (Clevers, 2016).

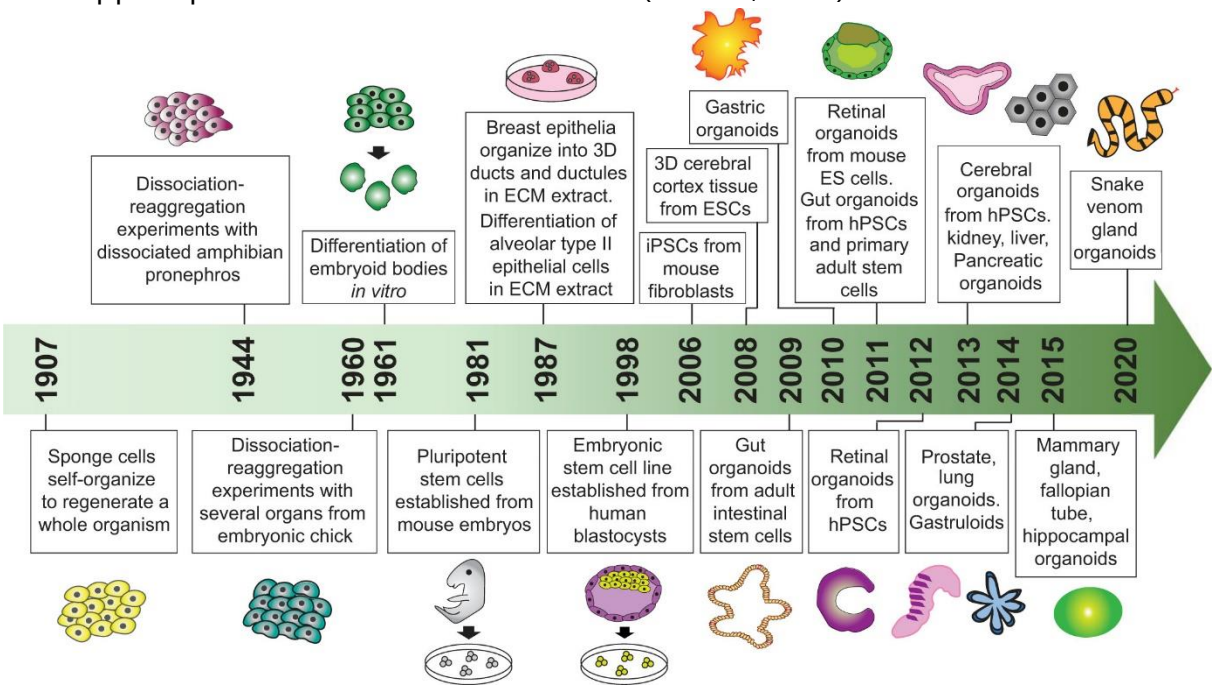


Figure 13 : Chronologie du développement des cultures d'organoïdes

Résumé des principales études et percées qui ont conduit à l'établissement de diverses technologies d'organoïdes. D'après Corrò *et al*, 2020.

4.2 L'utilisation des cellules souches pour les modèles 3D

L'essor récent des modèles 3D a été possible grâce aux avancées dans l'isolation et la culture de cellules souches (Figure 13). En effet, ces cellules sont souvent utilisées pour générer les modèles 3D (Corrò *et al*, 2020). Il existe différents types de cellules souches selon leur capacité de différenciation et leur origine. Les cellules souches adultes (ASC) peuvent s'auto-renouveler et se différencier en tous les types de cellules de l'organe dont elles sont issues, ce qui permet de régénérer l'organe entier à partir de quelques cellules (Mahla, 2016). Les cellules souches pluripotentes (PSC) sont des cellules qui peuvent s'auto-renouveler et se différencier en n'importe quel type cellulaire venant des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) (Guerreiro & Maciel, 2023). Parmi les PSC, les cellules souches embryonnaires (ESC) sont issues de la masse cellulaire interne d'un embryon avant implantation au stade blastocyste, tandis que les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont obtenues par reprogrammation de cellules différenciées. Cette reprogrammation se fait grâce à l'utilisation d'un cocktail de facteurs de transcription, appelés facteurs de Yamanaka (OCT4, SOX2, cMYC, KLF4) (Mahla, 2016). Les iPSC maintiennent les avantages des ESC, tout en étant obtenues à partir de cellules du patient. Elles conservent donc le patrimoine génétique du donneur qui peut contribuer au développement de pathologies et influencer la réponse aux traitements (Guerreiro & Maciel, 2023). Cependant, des aberrations épigénétiques peuvent se mettre en place ou être maintenues (mémoire épigénétique de la cellule somatique) ce qui peut influencer la capacité de différenciation des iPSC.

Les PSC humaines apparaissent comme un bon outil pour modéliser des pathologies humaines *in vitro* pour lesquelles du matériel primaire humain est limité. Les PSC sont intéressantes pour modéliser les maladies neurodéveloppementales puisqu'elles récapitulent les phénotypes génétiques, morphologiques et moléculaires trouvés chez les patients à des moments précoces du développement comme la prolifération des progéniteurs neuraux et leur différenciation (Guerreiro & Maciel, 2023).

Les organoïdes dérivés à partir d'ASC sont obtenus directement. L'obtention de ce type de culture 3D se fait par l'utilisation de cocktail de facteurs de croissance dans le milieu de culture qui recréent les signaux lors de l'homéostasie du tissu (Corrò *et al*, 2020). Les organoïdes obtenus à partir de PSC sont générés par des protocoles de différenciation de plusieurs étapes, en impliquant divers facteurs de croissance et inhibiteurs pour recréer des aspects du développement lors de la gastrulation et l'organogenèse (Corrò *et al*, 2020). Aujourd'hui, il existe de nombreux protocoles pour obtenir des organoïdes modélisant divers organes tels que les reins, tube digestif, foie, pancréas, prostate, thyroïde, poumons, trompes de Fallope, système cardiovasculaire, glandes mammaires, cerveau, rétine et hypophyse (Figure 14). Ces cultures d'organoïdes sont principalement développées à partir de cellules humaines et murines, mais il existe aussi des cultures 3D obtenues à partir de cellules de bovins, porcins, ovins, volailles, félins, canins, reptiles et primates non humains.

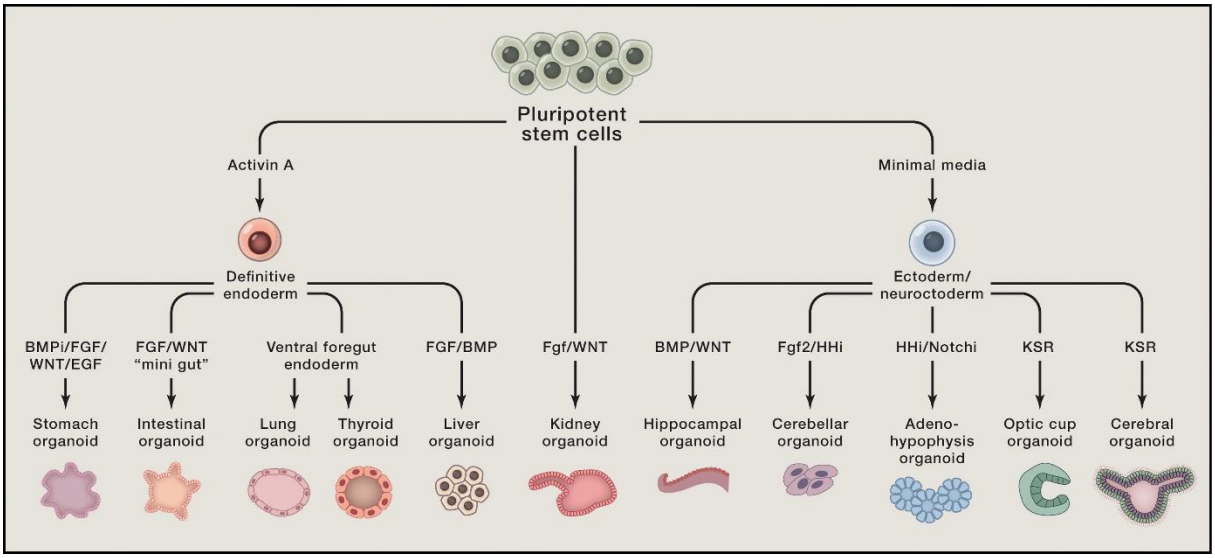


Figure 14 : Différents organoïdes pouvant être cultivés à partir de cellules souches pluripotentes

D'après Clevers, 2016

4.3 Le développement d'organoïdes cérébraux

Le développement de modèles 3D cérébraux représente une opportunité unique de pouvoir étudier le neurodéveloppement ainsi que des aspects précoces des neuropathologies. Le système nerveux central est dérivé à partir de l'ectoderme neural. La plaque neurale est façonnée en un tube neural par pliage et fusion de la plaque (Figure 15). Des gradients de morphogènes dans ce tube permettent d'établir un axe dorso-ventral et un axe rostro-caudal. Les neurones sont généralement générés à partir des cellules souches neurales qui résident près des ventricules. Ces cellules souches augmentent d'abord leurs nombres par divisions symétriques. Puis, pendant la neurogenèse, les cellules souches passent à des divisions asymétriques pour donner des pools de progéniteurs intermédiaires et de neurones, qui migrent vers l'extérieur pour former des structures stratifiées comme la médulla, le cortex cérébral et le tectum optique (Lancaster & Knoblich, 2014a). Depuis plusieurs années, la recherche se focalise donc sur le développement de modèles qui puissent récapituler ces aspects du neurodéveloppement humain *in vitro*.

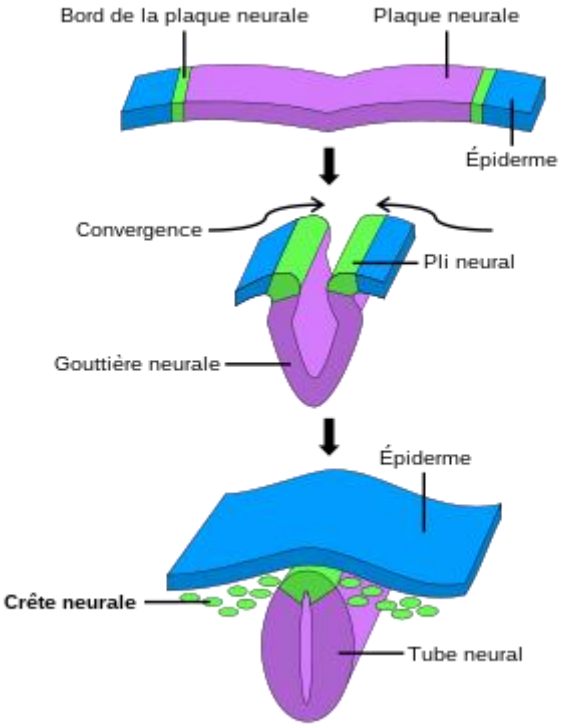


Figure 15 : Schéma de la formation du tube neural à partir de la plaque neurale

Zhang *et al* ont montré que des agrégats neuraux pouvaient être obtenus à partir de corps embryoïdes, qui sont une agrégation de cellules souches formant une structure 3D similaire à un embryon (Zhang *et al*, 2001). Après agrégation en corps embryoïdes, les cellules ES en cours de différenciation peuvent former des structures ressemblant à des tubes neuraux en présence du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2). De plus, les cellules souches en culture sont capables de se différencier spontanément vers la voie neurale lorsqu'il n'y a pas d'inhibiteurs dans le milieu, tels que BMP, Nodal et Wnt (Clevers, 2016). En se basant sur ces observations, Watanabe *et al* ont ainsi développé un protocole SFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates) qui consiste à dissocier des cellules souches et à les cultiver en suspension dans une boîte de Petri pour permettre leur réagrégation en 3D sous la forme d'un corps embryoïde (Watanabe *et al*, 2005, 2007) (Figure 16). Ces cellules sont gardées dans un milieu sans sérum ne contenant pas ou peu de facteurs de croissance ce qui leur permet de se différencier spontanément en cellules neurales.

Quelques années plus tard, Eiraku *et al* ont amélioré ce processus SFEB permettant une réagrégation rapide des cellules en quelques heures (SFEB with quick reaggregation – SFEBq) ce qui favorise une différenciation en cellules neurales plus efficace que le précédent protocole (Eiraku *et al*, 2008) (Figure 16). Les corps embryoïdes obtenus sont déposés sur une culture adhérente ce qui permet d'obtenir des structures de rosettes neurales. Ces structures sont composées de cellules progénitrices neurales (NPC) qui entourent un lumen ressemblant au tube neural. Les NPC de ces structures se différencient et se polarisent pour former un épithélium neuroectodermique qui donnera du tissu cortical stratifié avec des progéniteurs neuraux et des neurones correspondant à différentes couches corticales.

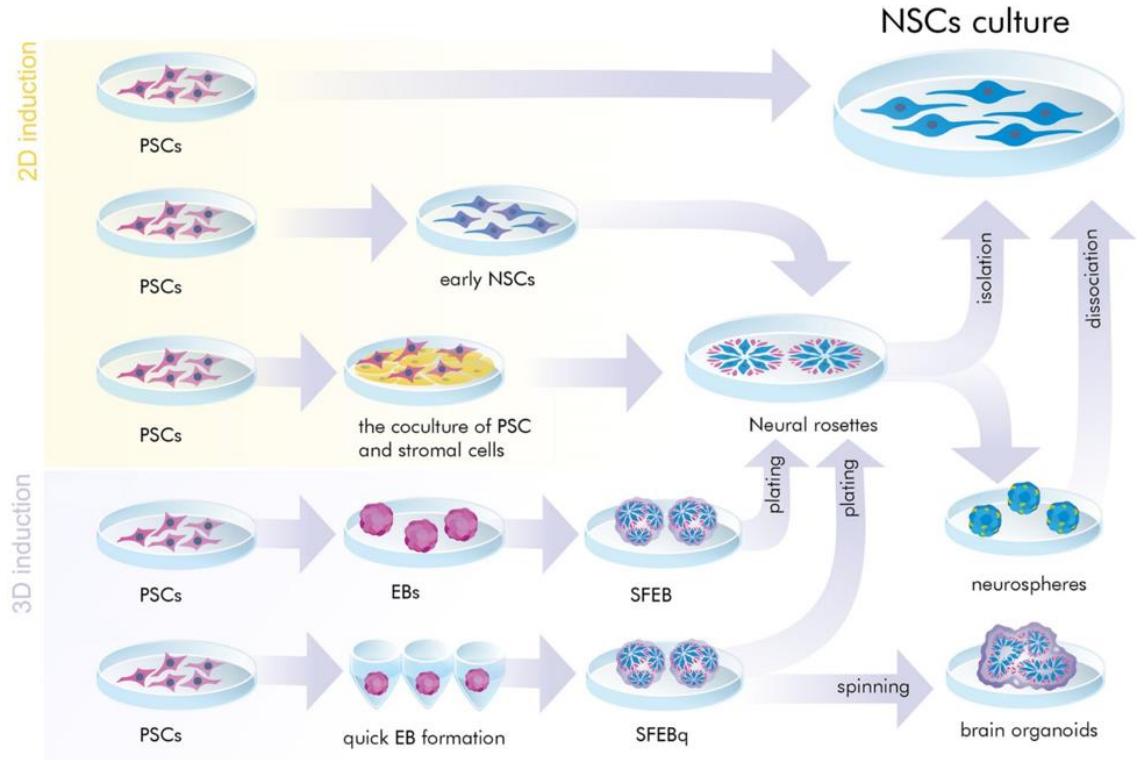


Figure 16 : Représentation simplifiée des principes généraux de l'induction neurale *in vitro*

L'induction neurale des PSC peut être réalisée dans des conditions 2D (monocouche ou coculture) ou dans des conditions 3D (corps embryoïdes). La génération et/ou la culture des cellules souches neurales peut être réalisée en monocouche et en rosettes neurales ou en culture 3D (SFEB et SFEBq, organoïdes cérébraux et neurosphères). Adapté d'après Galiakberova & Dashinimaev, 2020.

Lancaster et Knoblich sont allés plus loin en maintenant ces cultures en 3D tout au long du protocole, générant ainsi des « mini-cerveaux » contenant des représentations de plusieurs régions cérébrales (Lancaster *et al*, 2013; Lancaster & Knoblich, 2014b) (Figure 17). Le protocole commence par des SFEBq sans facteurs de croissance, puis les agrégats sont enrobés dans du matrigel, un mix de protéines de la matrice extracellulaire. Cette matrice permet de soutenir la croissance en 3D du corps embryoïde en favorisant le bourgeonnement du neuroépithélium. Ce processus, semblable à l'invagination de la plaque neurale, permet de développer spontanément des organoïdes cérébraux mimant diverses régions cérébrales. Ces organoïdes récapitulent ainsi les étapes clés du neurodéveloppement humain ce qui permet d'avoir accès à des processus inaccessibles dans le cerveau fœtal humain.

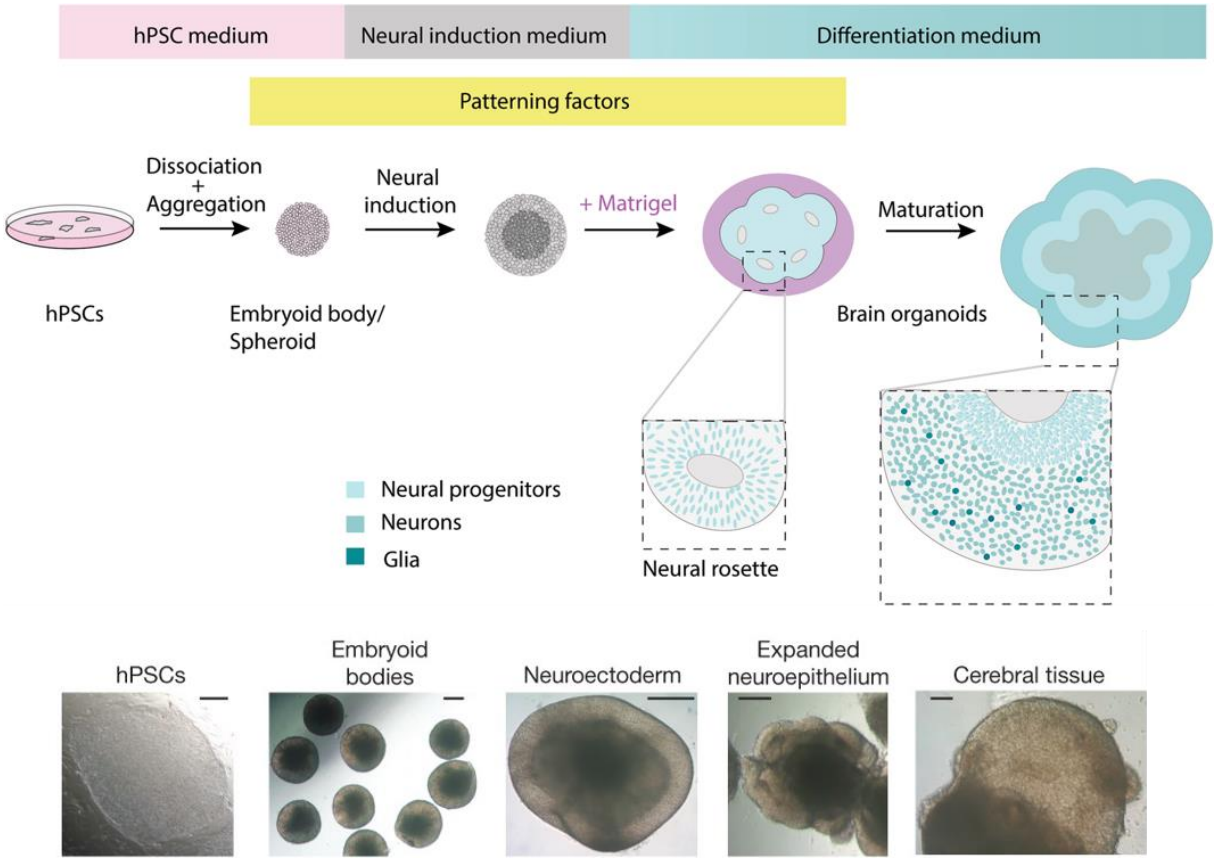


Figure 17 : Représentation du protocole de culture d'organoïdes cérébraux

Tout d'abord, les PSC sont dissociées puis réagrégées pour former un corps embryoïde ou un sphéroïde. La culture de ces cellules dans un milieu d'induction neurale permet ensuite le développement du neuroectoderme. Les cellules neuroectodermique s'auto-organisent en structures 3D (rosette neurale ou bourgeon neuronal) rappelant le tube neural. Par la suite, ce processus est stimulé par le matrigel, un gel riche en protéines de la matrice extracellulaire. Le tissu neuroectodermique donne naissance aux progéniteurs neuraux qui prolifèrent et se différencient en neurones et cellules gliales. Adapté d'après Sidhaye & Knoblich, 2020, et Lancaster *et al*, 2013.

Depuis, de nombreuses études se sont appuyées sur ces protocoles de différenciation non guidée pour générer des organoïdes cérébraux modélisant plusieurs régions cérébrales (Figure 18). De plus, divers protocoles de différenciations guidées ont été développés pour orienter la différenciation des corps embryoïdes vers des organoïdes mimant des régions cérébrales spécifiques tel que l'hypothalamus (Qian *et al*, 2016), l'hypophyse (Ozone *et al*, 2016), l'hippocampe (Sakaguchi *et al*, 2015), le cervelet (Muguruma *et al*, 2015), le cerveau moyen (Jo *et al*, 2016) ou encore le tronc cérébral (Eura *et al*, 2020).

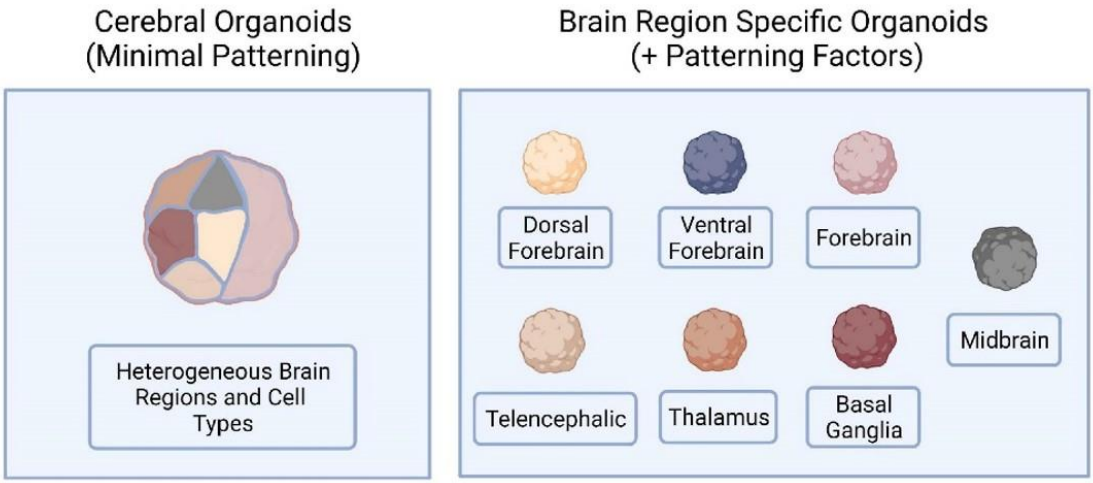


Figure 18 : Divers types d'organoïdes cérébraux pouvant être obtenus par différenciation guidée ou non guidée

Adapté d'après Fernandes *et al*, 2021.

En outre, il est également possible de fusionner des organoïdes d'identités régionales différentes pour donner des assembloïdes, ce qui permet de créer des modèles plus complexes du SNC humain en développement et d'étudier les connectivités et interactions entre les différentes régions (Chen *et al*, 2020). Il est également possible de connecter des organoïdes cérébraux à des sphéroïdes de muscles squelettiques (Andersen *et al*, 2020). Andersen *et al* ont ainsi généré des assembloïdes cortico-moteurs dans lesquels la stimulation des neurones corticaux provoque la contraction des cellules musculaires (Figure 19).

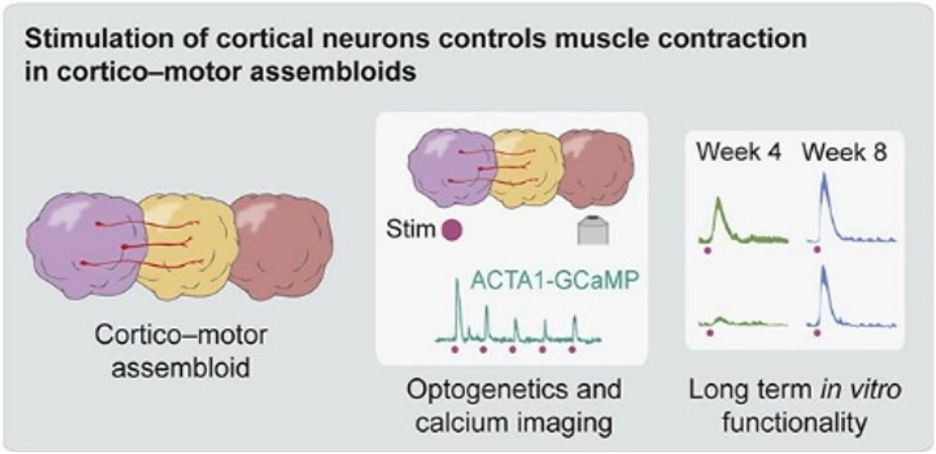


Figure 19 : Assembloïdes cortico-moteurs

Un organoïde cortical (violet) est fusionné avec un organoïde rachidien (jaune) puis à un sphéroïde de muscle squelettique (rouge). Les cellules de l'organoïde cortical établissent des projections vers l'organoïde rachidien (traits rouges). La stimulation des cellules de l'organoïde cortical permet d'obtenir une contraction des cellules musculaires. D'après Andersen et al, 2020.

4.4 Similitudes des organoïdes cérébraux et le cerveau humain

Pour évaluer le degré de similitudes entre les organoïdes cérébraux et le cerveau humain, plusieurs paramètres ont été étudiés tels que la composition cellulaire, les structures tissulaires, les profils d'expression de gènes ainsi que la fonctionnalité du réseau neuronal. Des études ont démontré que les signatures transcriptionnelles, la composition des types cellulaires, et l'activité du réseau observées dans le cerveau de fœtus humains peuvent être reproduites dans les organoïdes cérébraux (Wang *et al*, 2023) (Figure 20).

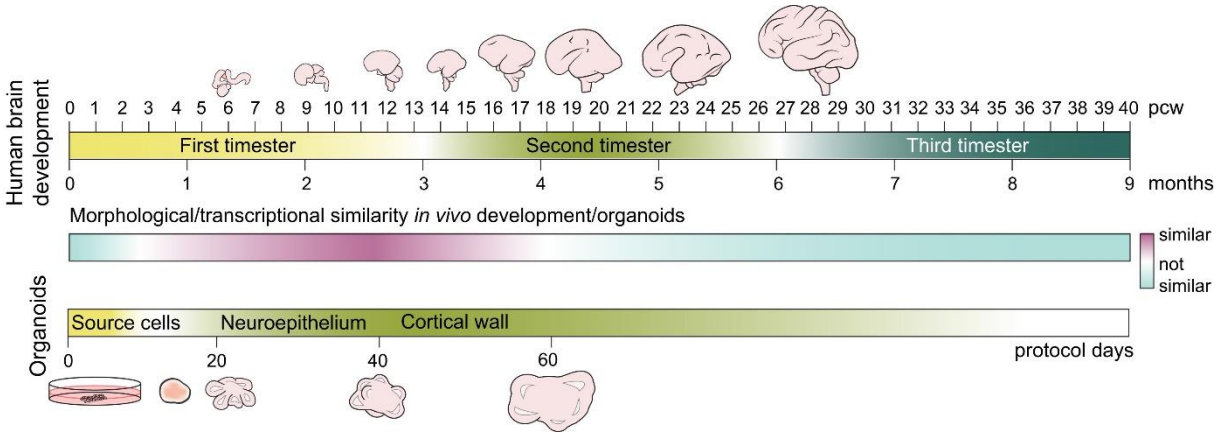


Figure 20 : Chronologie montrant les similitudes relatives entre le développement du cerveau humain *in vivo* et la chronologie du protocole des organoïdes cérébraux *in vitro*

La similarité relative (gradient bleu/violet) est basée sur des données biologiques et transcriptomiques provenant de plusieurs études. D'après Kelava & Lancaster, 2016.

Il a été ainsi démontré que les différents protocoles de différenciation d'organoïdes cérébraux permettent d'obtenir des amas cellulaires qui récapitulent *in vitro* les structures et fonctions principales du cerveau fœtal. En effet, les organoïdes cérébraux sont composés de structures similaires aux ventricules cérébraux bordés de progéniteurs neuraux (Lancaster *et al*, 2013). Ces structures *ventricle-like* dans les organoïdes sont composées d'un lumen entouré de cellules positives pour des marqueurs de la glie radiale (Figure 21). De plus, les organoïdes cérébraux sont composés de différents types cellulaires cérébraux tels que les progéniteurs neuraux, les neurones et des cellules gliales avec des astrocytes et oligodendrocytes.

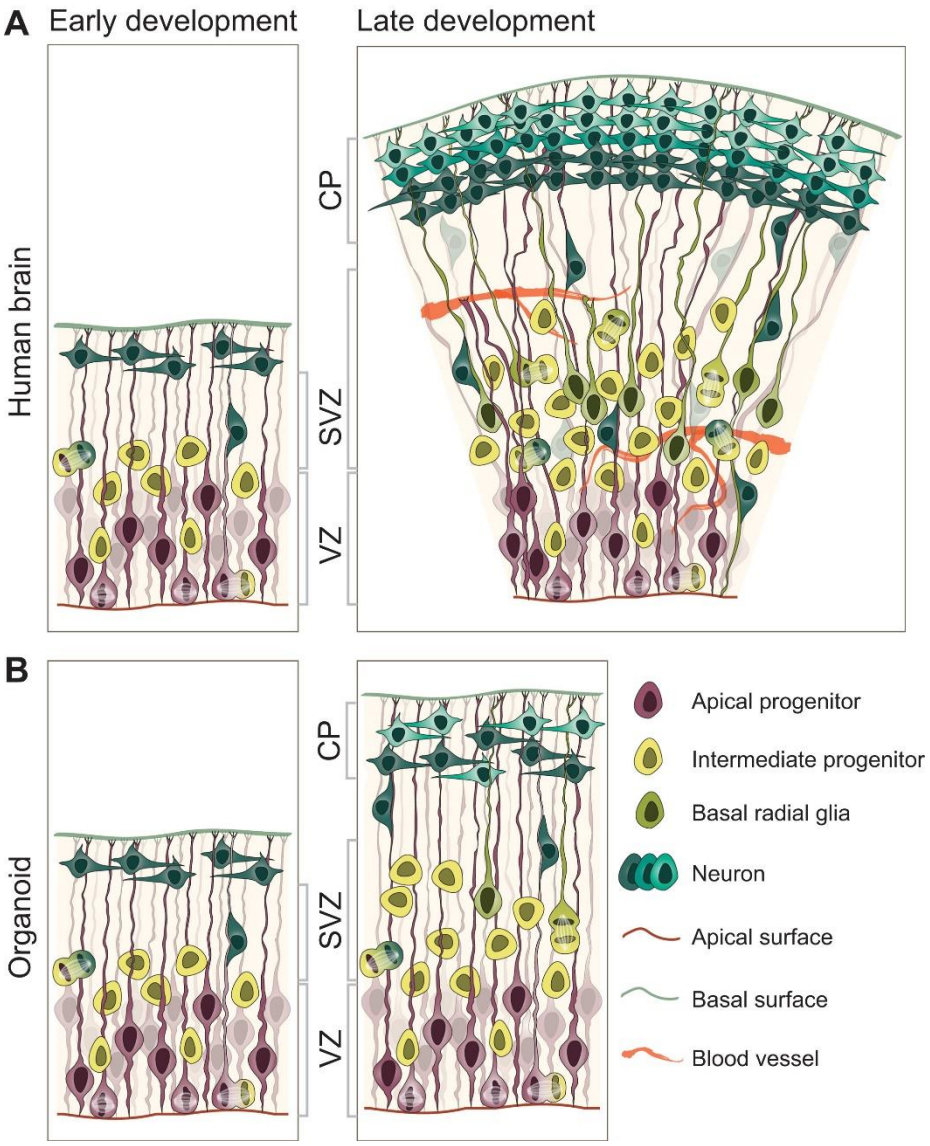


Figure 21 : Représentation simplifiée de la complexité biologique cellulaire du cerveau en développement *in vivo* et de l'organoïde cérébral *in vitro*

Représentation simplifiée des couches (A) du cerveau humain et (B) des organoïdes cérébraux. Les stades précoces (à gauche) présentent un niveau de complexité morphologique similaire. Les stades ultérieurs (à droite) diffèrent par la taille de la paroi corticale ainsi que par la diversité et la complexité des populations de progéniteurs neuraux. (VZ, zone ventriculaire ; SVZ, zone subventriculaire ; CP, plaque corticale) D'après Kelava & Lancaster, 2016.

La comparaison des transcriptomes d'organoïdes cérébraux et de cerveau humain ont montré que les programmes d'expression génique des cellules corticales des organoïdes sont similaires aux programmes dans le tissu fœtal (Camp *et al*, 2015; Mariani *et al*, 2015). Trujillo *et al* ont mis en évidence le développement d'une activité électrique au cours du développement d'organoïdes cérébraux, ce qui témoigne de la

présence d'une communication en réseau dans leur modèle (Trujillo *et al*, 2019). Selon les auteurs, le développement du réseau de leurs organoïdes corticaux de 7 mois ressemble à certaines caractéristiques des électroencéphalogrammes des enfants prématurés (Figure 22).

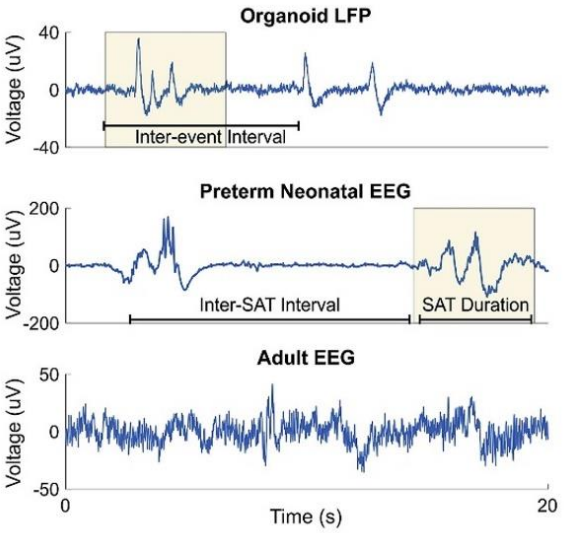


Figure 22 : Comparaison de l'activité électrique des organoïdes cérébraux avec les EEG de prématurés et d'adultes

L'activité électrique mesurée dans les organoïdes de 7 mois (par LFP, Local Field Potential) présente des événements comparables avec l'activité électrique d'un prématuré de 35 semaines (par EEG, électroencéphalogramme), tandis qu'une activité continue est observée dans l'EEG de l'adulte. D'après Trujillo *et al*, 2019.

L'ensemble de ces observations implique que des aspects du développement cortical humain peuvent être étudiés avec la culture d'organoïdes.

4.5 Les applications des organoïdes cérébraux

En tant que modèle *in vitro* mimant la physiologie humaine, la technologie des organoïdes est utilisée pour diverses applications allant de l'étude du développement humain à la modélisation de pathologies, en passant par des études de toxicologies et de tests d'efficacité de médicaments (Figure 23) (Corrò *et al*, 2020). Ainsi, les organoïdes constituent un outil intéressant pour la médecine de précision et pour l'étude de maladies idiopathiques. En effet, la création de modèles animaux pour une maladie spécifique nécessite une connaissance préalable des conditions causales ou des gènes impliqués. Les modèles animaux sont généralement créés en appliquant des conditions nocives aux animaux ou en manipulant les gènes responsables de la maladie, tandis que les modèles organoïdes peuvent être directement générés à partir de cellules de patients atteints sans connaissance préalable des gènes spécifiquement responsables. Ceci est particulièrement pertinent pour les troubles polygéniques tels que le trouble du spectre autistique, le diabète, les maladies cardiovasculaires ou les cancers (Kim *et al*, 2020).

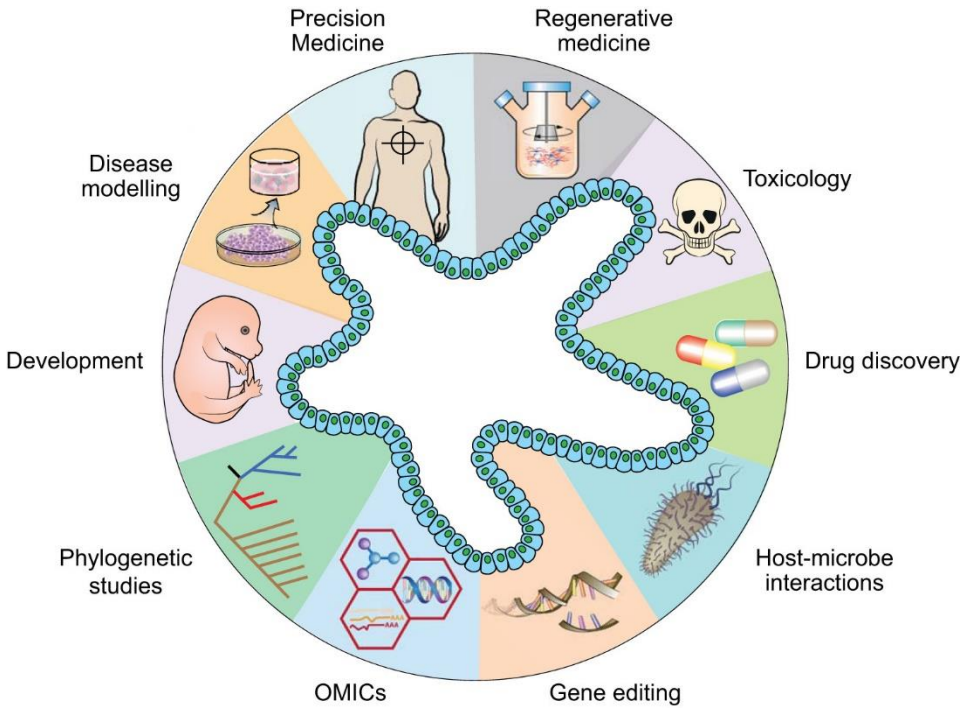


Figure 23 : Applications diverses de la technologie des organoïdes

D'après Corrò *et al*, 2020

Modélisation de pathologies : les organoïdes cérébraux, en particulier, sont des outils souvent utilisés pour modéliser différents types de pathologies cérébrales humaines. Ils peuvent représenter des pathologies neurodéveloppementales, neurodégénératives et psychiatriques (Bhattacharya *et al*, 2022; Clevers, 2016) (Figure 24). Ils peuvent également être utiles pour étudier des cancers cérébraux puisque contrairement aux lignées cellulaires cancéreuses en 2D, les organoïdes dérivés d'un cancer conservant souvent leur hétérogénéité tumorale et sont donc idéaux pour l'étude de l'évolution des tumeurs (da Silva *et al*, 2018; Corrò *et al*, 2020).

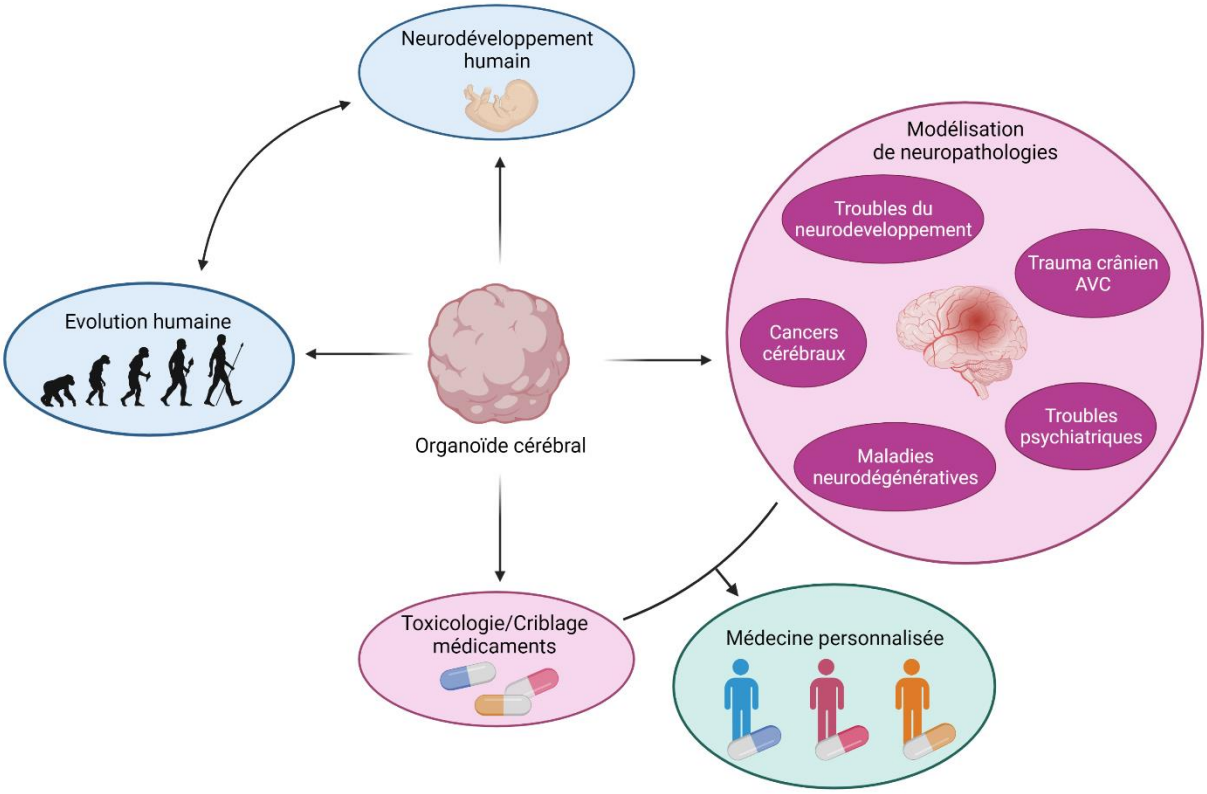


Figure 24 : Applications diverses des organoïdes cérébraux

Les organoïdes cérébraux peuvent servir à modéliser diverses pathologies affectant le SNC telles que des troubles du neurodéveloppement (e.g. microcéphalie, syndrome de Rett, troubles du spectre autistique), des troubles psychiatriques (e.g. schizophrénie, troubles bipolaires), des maladies neurodégénératives (e.g. maladies d'Alzheimer ou de Parkinson), des cancers (e.g. glioblastomes, métastases cérébrales) et des blessures provoquant des lésions (e.g. trauma crânien, AVC). Les organoïdes peuvent également être utilisés pour tester la toxicité et l'efficacité de molécules (toxines et candidats médicaments) ce qui en fait un outil intéressant de la médecine personnalisée. Les organoïdes cérébraux peuvent également apporter des informations sur le développement du cerveau humain au cours de l'évolution. (Créé avec BioRender)

Les organoïdes cérébraux peuvent ainsi modéliser des pathologies d'origine génétique, en utilisant des cellules de patients ou en recréant la mutation, ou des pathologies induites à la suite de stimuli de l'environnement (Figure 25). Pour cela, les organoïdes peuvent être traités par des molécules ou exposés à certaines conditions pour évaluer l'impact de ces facteurs environnementaux sur le développement de certaines pathologies. Ces facteurs peuvent être des agents infectieux (virus, parasites, bactéries, prions) (Pellegrini *et al*, 2020; Sun *et al*, 2020), des tératogènes et toxines (Wang *et al*, 2018; Yates *et al*, 2022), des conditions de traumas crâniens (Ramirez *et al*, 2021) ou d'hypoxie (Kim *et al*, 2021).

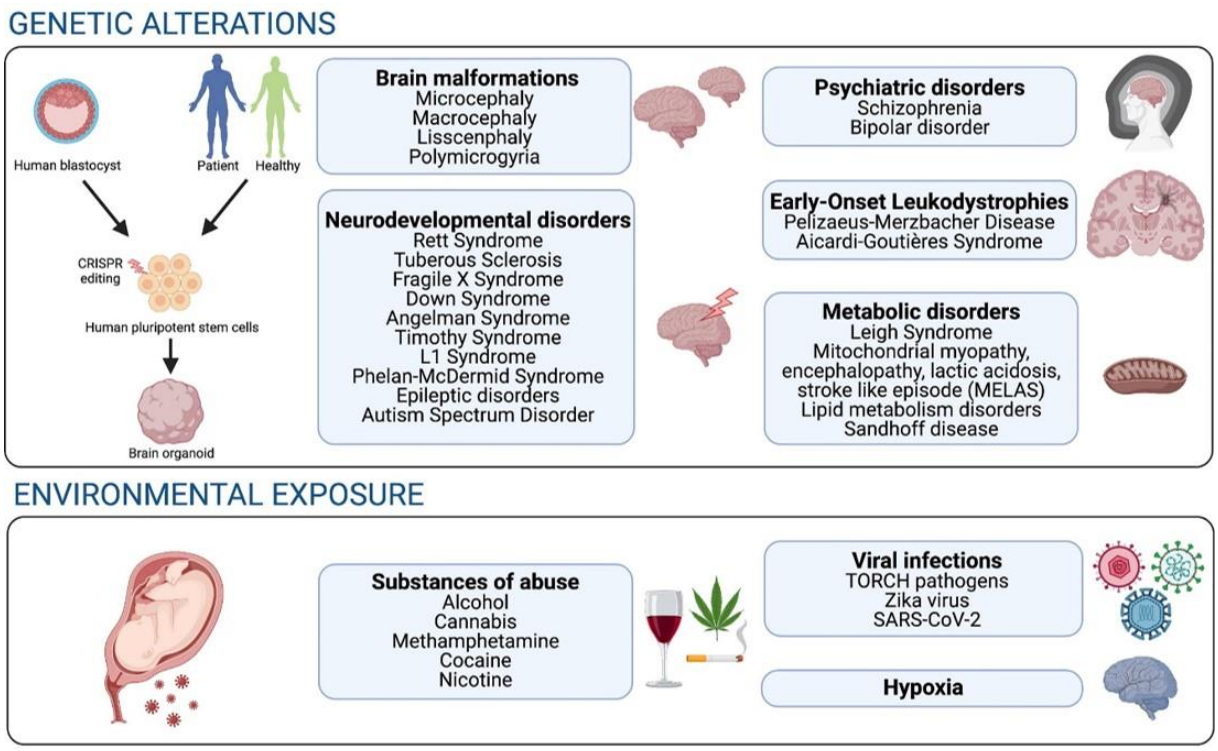


Figure 25 : Modélisation de troubles du neurodéveloppement avec les organoïdes cérébraux

Exemples de troubles génétiques et environnementaux du neurodéveloppement étudiés à l'aide de la technologie des organoïdes. D'après Bhattacharya *et al*, 2022.

Étude de toxicologie et de criblage des médicaments : les organoïdes cérébraux peuvent être utilisés comme plateforme de dépistage de la toxicité pour déterminer les effets de l'exposition aux médicaments et aux toxines sur le cerveau humain (Jeong *et al*, 2023) (Figure 24). Ils peuvent également servir à tester l'efficacité de candidats

médicaments dont la cible est le SNC. En effet, comme ils modélisent la physiologie d'un tissu humain, ils peuvent apporter des informations complémentaires quant à la toxicité d'une molécule dans un contexte humain et ainsi contribuer à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans les études de toxicologie.

Médecine personnalisée : de par leurs applications dans la modélisation de pathologies et dans les tests d'efficacité de médicaments, les organoïdes cérébraux ont un fort potentiel dans la médecine de précision (Figure 24). Ils pourraient permettre de déterminer le meilleur traitement à donner à un patient en fonction de la réponse sur le modèle 3D. Ainsi, il existe des biobanques d'organoïdes tumoraux pour le criblage de médicament et la prédiction des résultats cliniques chez le patient (Corrò *et al*, 2020).

Étude du neurodéveloppement humain et de l'évolution humaine : puisqu'ils modélisent des aspects précoces du neurodéveloppement, les organoïdes cérébraux sont également des outils intéressants pour étudier des aspects du développement du cerveau humain en s'affranchissant des contraintes éthiques d'expérimentations sur les embryons (Figure 24). Ils sont également utiles pour apporter des réponses sur l'évolution de l'espèce humaine. En effet, il est possible de générer des organoïdes à partir de cellules de grands singes, tels que les chimpanzés et les macaques, afin d'avoir accès au développement du cerveau de ces proches parents de l'être humain et ainsi mieux appréhender les raisons de la singularité du cerveau humain (Qian *et al*, 2019). Trujillo *et al* ont également généré des organoïdes cérébraux archaïques en remplaçant l'allèle humain moderne du gène *NOVA1* par l'allèle ancestral trouvé notamment chez les Néandertaliens et les Dénisoviens (Trujillo *et al*, 2021). Ils ont ainsi montré que « l'archéalisation » de *NOVA1* dans les organoïdes conduit à une maturation précoce des neurones corticaux, imitant ainsi le comportement des neurones corticaux dérivés du chimpanzé.

4.6 Les limites des organoïdes cérébraux

En moins d'une décennie, la technologie des organoïdes cérébraux a été largement adoptée pour étudier le processus insaisissable du développement du cerveau humain. Comme c'est le cas pour toute technologie émergente et en évolution, malgré ses nombreuses promesses, la conception, la mise en œuvre et l'interprétation des études utilisant des organoïdes cérébraux posent quelques limitations.

La représentation des cellules gliales : les cellules gliales représentent environ 50 % des cellules du cerveau et les dysfonctionnements gliaux contribuent à la pathogenèse des troubles du développement (Bhattacharya *et al*, 2022). Par conséquent, pour étudier fidèlement ces troubles dans les organoïdes, les différents types de cellules gliales doivent être représentés de manière adéquate. Alors que les astrocytes sont présents dans presque tous les organoïdes cérébraux à partir d'un mois de culture, les oligodendrocytes ne sont pas facilement observables en raison de leur émergence tardive au cours du développement. Ainsi, plusieurs études ont proposé des modifications des protocoles pour accélérer l'oligodendrogenèse (Madhavan *et al*, 2018; Marton *et al*, 2019; Shaker *et al*, 2021).

De plus, les cellules microgliales émergent en dehors du SNC, à partir de précurseurs du sac vitellin, et migrent dans le cerveau au cours du neurodéveloppement. Comme la plupart des méthodes de différenciation des organoïdes cérébraux utilisent des facteurs qui orientent les cellules souches vers la lignée neuroectodermique, la microglie est généralement absente des organoïdes cérébraux. Des études se focalisent sur le développement de protocoles d'organoïdes cérébraux enrichis en cellules microgliales (Bodnar *et al*, 2021; Fagerlund *et al*, 2021; Sabate-Soler *et al*, 2022).

La vascularisation dans les organoïdes : le système neurovasculaire joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie dans le cerveau en développement en fournissant de l'oxygène et des nutriments tout en éliminant les déchets. L'absence d'un compartiment vasculaire perfusé limite l'étude des interactions entre les neurones et l'unité neurovasculaire, mais réduit également la diffusion de l'oxygène et des nutriments vers le cœur des organoïdes, provoquant une nécrose interne (Bhattacharya *et al*, 2022). Afin d'améliorer la survie cellulaire et la maturation des cellules, certains protocoles proposent de couper les organoïdes en tranche (Giandomenico *et al*, 2019) ou de les vasculariser grâce à une transplantation dans le cerveau de souris adultes (Mansour *et al*, 2018). Le réseau vasculaire de l'hôte est capable d'envahir et de nourrir l'organoïde cérébral, empêchant la formation d'un cœur nécrotique. D'autres voies se développent autour de la co-culture d'organoïdes avec des précurseurs endothéliaux et/ou une culture en flux dans des puces microfluidiques (Ahn *et al*, 2021; Matsui *et al*, 2021). Cependant, malgré des progrès constants, la vascularisation reste un obstacle difficile à surmonter.

L'immaturité du réseau neuronal : plusieurs études semblent montrer que les neurones dans les organoïdes cérébraux ne deviennent électriquement actifs qu'à partir de 4 à 5 mois, l'activité du réseau continuant à augmenter dans les mois qui suivent (Bhattacharya *et al*, 2022; Porciúncula *et al*, 2021). La maturation globale des neurones et des circuits neuronaux dans les organoïdes cérébraux est donc un processus long et ne semble pas récapituler entièrement le développement *in vivo*. De plus, l'analyse des transcriptomes d'organoïdes mettent en exergue une immaturité des cellules qui les composent (Bhattacharya *et al*, 2022).

Partie 3 : Stratégies thérapeutiques

1. Restauration du pool de créatine cérébrale

Une des stratégies thérapeutiques pour traiter le CTD repose sur l'hypothèse que la restauration des réserves en créatine pourrait corriger les symptômes des patients. Plusieurs types de supplémentation ont donc été testées.

1.1 Supplémentation en monohydrate de créatine et précurseurs de synthèse

La supplémentation orale en monohydrate de créatine : la première stratégie proposée a été d'apporter aux patients une supplémentation en créatine. Cette stratégie reposait sur l'hypothèse, qu'à de fortes concentrations, la créatine pourrait traverser les membranes biologiques grâce à une activité résiduelle du CRT ou à un mécanisme de transport alternatif (van de Kamp *et al*, 2014). De plus, l'apport de créatine améliore fortement les problèmes neurologiques chez les patients déficients pour AGAT et GAMT (Braissant *et al*, 2011). Mais un apport en créatine dosé à 300 à 1000 mg/kg/jour ne permet qu'une restauration partielle des niveaux de créatine cérébrale au bout de plusieurs mois d'administration (Longo *et al*, 2011). Les traitements commencés avant le développement des symptômes permettent de prévenir la plupart des problèmes dus au manque de créatine comme le retard mental (Braissant *et al*, 2011; Longo *et al*, 2011; Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014). En revanche, les essais de la supplémentation orale en monohydrate de créatine chez les patients CTD se sont révélés inefficaces (Dunbar *et al*, 2014; van de Kamp *et al*, 2014).

La supplémentation en acides aminés précurseurs : pour maximiser l'apport de créatine cérébrale, les tests de traitements se sont ensuite focalisés sur des combinaisons de créatine avec les acides aminés précurseurs, L-arginine et/ou L-glycine, de manière à augmenter la synthèse cérébrale de créatine (Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek,

2014). Avec une supplémentation orale en créatine et/ou arginine et/ou glycine, seul 18 % des patients CTD ont une augmentation du pool de créatine cérébrale et 36 % des patients ont une amélioration des symptômes cliniques (Dunbar *et al*, 2014). Tous les patients ayant une augmentation de créatine cérébrale ont présenté une amélioration clinique, ce qui souligne la relation entre les niveaux du pool de créatine et les résultats cliniques. Les améliorations concernent généralement les crises d'épilepsie, les problèmes de comportement et d'attention ainsi que les symptômes musculaires avec une prise de poids. Il s'agit probablement d'une augmentation de la masse musculaire due à une synthèse plus importante de protéines musculaires ou à une rétention d'eau dans les premiers jours (van de Kamp *et al*, 2013). En revanche, le retard mental n'est pas inversé lors de la supplémentation en créatine, arginine et glycine, mais la progression de la pathologie semble être limitée (Bruun *et al*, 2018). De plus, la grande majorité des patients répondant au traitement sont ceux traités avant 9 ans (Dunbar *et al*, 2014).

La supplémentation en précurseur intermédiaire GAA : des études ont montré que la supplémentation en GAA pouvait augmenter les niveaux de créatine dans le muscle et le cerveau de sujets sains, plus efficacement que la supplémentation en créatine elle-même (Adriano *et al*, 2022). Adriano *et al* ont montré que des fortes concentrations en GAA, administrées sur des coupes d'hippocampe de souris, provoquent une augmentation de la créatine et de la phosphocréatine dans le tissu. Cependant, lorsque le transporteur de la créatine est bloqué par l'appauvrissement du milieu en ion chlorure, le GAA n'augmente plus les réserves de créatine ce qui semble souligner l'importance du CRT dans le transport du GAA pour la synthèse intracérébrale.

La supplémentation en précurseur intermédiaire S-adénosylméthionine (SAM) : un autre précurseur intermédiaire, SAM, a été testé dans une combinaison de créatine, arginine, glycine chez deux patients CTD. Le début du traitement avec de fortes doses de SAM

a montré des effets secondaires négatifs en provoquant des problèmes de comportement et de sommeil (Jaggumantri *et al*, 2015). La suite du traitement chez un des patients avec une dose plus faible de SAM semble montrer un effet bénéfique sur le langage et la communication. Cependant, ce patient suivait également une thérapie du langage et une physiothérapie qui pourraient être à l'origine de ces améliorations cliniques.

Il existe plusieurs barrières à ces différents traitements (Stockler-Ipsiroglu & van Karnebeek, 2014). En effet, le passage de la BHE par la créatine est d'autant plus difficile sans le CRT. De plus, la séparation de la synthèse intracérébrale, due à une expression différente des enzymes AGAT et GAMT, repose sur le CRT fonctionnel pour acheminer l'intermédiaire GAA. Pour finir, la créatine synthétisée et sécrétée dans le parenchyme cérébral ne peut être incorporée dans les cellules et s'évacue donc dans le liquide céphalo-rachidien. Le traitement des patients avec une supplémentation orale en créatine nécessite donc actuellement de très fortes doses de créatine. La supplémentation en acides aminés précurseurs nécessite un suivi régulier pour vérifier les niveaux plasmatiques de certains métabolites, tel que l'acide folique, pour réguler les carences ou excès dus à la stimulation de la synthèse de créatine. En effet, Villar *et al* ont décrit un cas d'hyperhomocystéinémie chez un patient CTD suite à une supplémentation en arginine et glycine (Villar *et al*, 2012). Ce patient a un polymorphisme du gène *MTHFR* rendant la protéine thermosensible. Or cette protéine est responsable du recyclage du 5-méthyltétrahydrofolate utilisé dans les cycles du folate et de la méthionine pour régénérer SAM, le donneur méthyl de la synthèse de créatine (Figure 26). Lorsque cette synthèse est stimulée par l'apport d'arginine et de glycine, l'absence du 5-méthyltétrahydrofolate engendre une accumulation d'homocystéine.

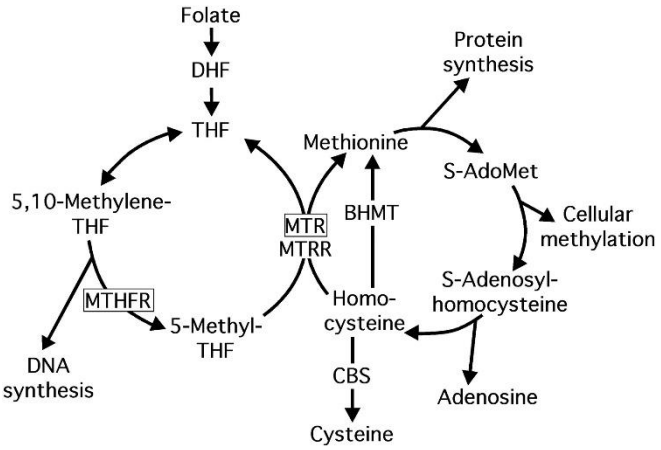


Figure 26 : Cycles folate et méthionine

BHMT : bétaïne-homocystéine méthyltransférase. ; CBS : cystathionine β-synthase ; MTHFR : 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase ; MTR : méthionine synthase ; MTRR : méthionine synthase réductase ; DHF : dihydrofolate ; S-AdoMet : S-adénosyl-méthionine (SAM) ; THF : tétrahydrofolate. D'après Cherukad *et al*, 2012.

1.2 Dérivés de la créatine

Devant les résultats décevants de la supplémentation en monohydrate de créatine, la recherche de médicaments pour les patients CTD s'est tournée vers le développement de dérivés de la créatine. Le défi est de développer un candidat médicament pouvant être internalisé dans les cellules cérébrales sans CRT et être capable d'augmenter le pool de créatine ou, à défaut, d'assurer les fonctions de la créatine.

Les complexes créatine-magnésium et phosphocréatine-magnésium (Cr-Mg and PCr-Mg-complex acetate, CPLX) (Figure 27) *:* ces dérivés présentent l'avantage de libérer de la créatine et de la phosphocréatine, deux molécules nécessaires pour la réserve énergétique cellulaire (Lunardi *et al*, 2006; Perasso *et al*, 2008). *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 (GPA) ou milieu sans chlorures). D'autre part, après une injection

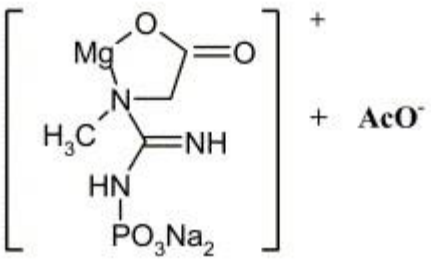


Figure 27 : Structure du complexe Phosphocréatine-Mg

Adapté d'après Lunardi *et al*, 2006.

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 (Perasso *et al*, 2009). Cet effet protecteur est directement proportionnel à l'augmentation de la concentration en créatine dans le tissu cérébral (Perasso *et al*, 2008). Cependant, aucune donnée expérimentale sur ces composés n'est disponible sur leur capacité de passage de la BHE sans CRT.

Le couplage de la créatine avec des acides aminés (creatinyl amino acid) : les créatinyl amino acides sont un ensemble de composés de conjugaison de la créatine avec des dérivés d'acides aminés. Ces conjugaisons modifient les propriétés physico-chimiques et biologiques de la créatine, ce qui permettrait le transport de la créatine par le transporteur de la molécule conjuguée (Burov *et al*, 2011). Burov *et al* ont ainsi créé une chimiothèque de composés dont la fonction acide carboxylique de la créatine est engagée dans une liaison peptidique avec un autre acide aminé. Parmi ces composés, les capacités neuroprotectrices d'un dérivé de la glycine (Cr-Gly-OEt), de la phénylalanine (Cr-Phe-NH_2), de la tyrosine (Cr-Tyr-NH_2) et du GABA (Cr-GABA-OEt) ont été déterminées *in vivo* dans un modèle murin d'hypoxie induite par $NaNO_2$ et un modèle murin d'ischémie cérébrale. Le Cr-GABA-OEt et le Cr-Phe-NH_2 montrent un effet neuroprotecteur modéré tandis que le Cr-Gly-OEt et le Cr-Tyr-NH_2 sont plus efficaces pour protéger les cellules cérébrales. De plus, une autre étude souligne que le Cr-Gly-OEt peut être incorporé dans les cellules quand le CRT est bloqué par du GPA (Garbati *et al*, 2014). Un autre dérivé, la Cr-éthylamide, présente cette même caractéristique, mais son passage serait plutôt dû à son caractère lipophile qui lui permettrait de traverser les membranes par diffusion.

Une autre étude a utilisé le couplage à des acides aminés pour développer des dérivés de la créatine (Adriano *et al*, 2017). En revanche, ces dérivés sont des sels de créatine où l'acide aminé n'est pas couplé de manière covalente avec la créatine. La Cr ascorbate

et la Cr gluconate ont montré un effet neuroprotecteur *in vitro* et peuvent être incorporées dans les cellules quand le CRT est bloqué par du GPA (Adriano *et al*, 2017).

Les esters de créatine (Figure 28) *:* plusieurs esters de créatine ont été développés pour leurs caractères plus lipophiles ce qui leur permettrait en théorie de traverser les membranes biologiques par diffusion. De plus, ils peuvent être pris en charge par des estérases cellulaires pour libérer la créatine dans les cellules.

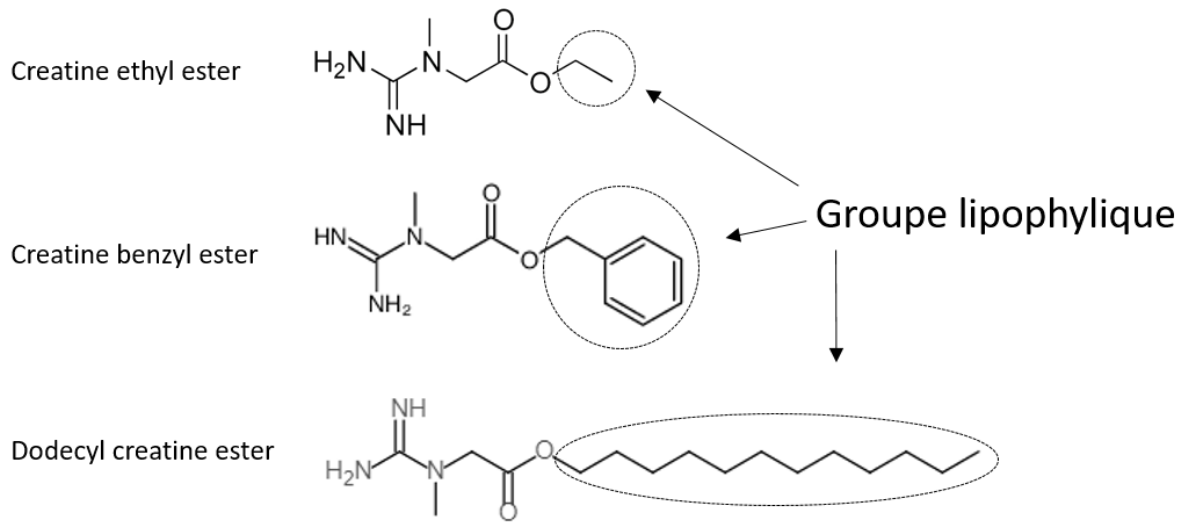


Figure 28 : Comparaison des structures des esters de créatine

L'ester éthylique de créatine était initialement prometteur puisqu'il présentait un effet neuroprotecteur *in vitro* sur des coupes d'hippocampe de souris (Adriano *et al*, 2011). Cependant, sa capacité à augmenter le pool de créatine cellulaire sans CRT diverge en fonction du modèle *in vitro* utilisé. Fons *et al* ont montré une augmentation de créatine lorsque l'ester éthylique de créatine était incubé dans des fibroblastes de patients (Fons *et al*, 2010). En revanche, dans un modèle de coupe de cerveau, cet ester, dont la chaine lipophile est courte, doit pénétrer moins bien dans les couches du tissu (Adriano *et al*, 2011). De plus, une autre étude a montré que l'ester éthylique de créatine est faiblement internalisé dans un modèle de culture primaire de neurones de rat (Trotier-Faurion *et al*, 2013). En outre, son administration par voie orale chez 4 patients CTD

pendant un an n'a pas permis d'augmenter les réserves de créatine et d'améliorer les fonctions cognitives (Fons *et al*, 2010). Cet ester est en effet peu stable dans les milieux aqueux puisqu'il est facilement converti en créatinine (Adriano *et al*, 2011).

L'ester benzylique de créatine peut augmenter la quantité de créatine intracellulaire après blocage du CRT par du GPA dans des coupes d'hippocampe de souris (Lunardi *et al*, 2006). Cependant, tout comme l'ester éthylique de créatine, l'ester benzylique de créatine n'est pas très stable puisqu'il se dégrade rapidement en créatinine.

L'ester éthylique de créatine diacétyle peut augmenter le pool de créatine suite au blocage du CRT et avoir une action neuroprotectrice sur des coupes de cerveau de souris (Adriano *et al*, 2018).

Trotier-Faurion *et al* ont également produit une chimiothèque de molécules d'esters gras de la créatine avec des chaines carbonées saturées entre 2 et 18 carbones (Trotier-Faurion *et al*, 2013). Les propriétés pharmacologiques de ces esters ont été évaluées grâce à trois modèles cellulaires *in vitro* :

- Un modèle *in vitro* de BHE de rat pour définir la capacité de ces molécules à être internalisées par les cellules endothéliales ainsi qu'à être transloquées vers le parenchyme cérébral.
- Un modèle de culture primaire de neurones corticaux de rat pour évaluer l'internalisation des différents esters de créatine de la chimiothèque dans les cellules cibles neuronales.
- Un modèle pathologique de fibroblastes de patients CTD pour valider le passage intracellulaire des esters en l'absence du CRT fonctionnel ainsi que leur bioconversion en créatine.

Les résultats indiquent que plus la chaîne carbonée de l'ester de créatine est longue, plus l'entrée dans les cellules endothéliales et dans les astrocytes est importante. Cependant, le plus long des esters de la chimiothèque, l'ester octadécylique (18 carbones), semble piégé dans la bicouche lipidique des cellules endothéliales. Ainsi,

l'ester dodécylique de créatine (12 carbones, DCE) est la prodrogue la plus intéressante de la chimiothèque puisqu'elle est capable d'être incorporée dans les cellules endothéliales et astrocytes du modèle de BHE ainsi que dans les cultures primaires de neurones. Le DCE est également capable de s'accumuler à l'intérieur des fibroblastes des patients CTD en augmentant la concentration intracellulaire de créatine, ce qui montre qu'il peut être pris en charge par des estérases cellulaires pour libérer de la créatine. De plus, lorsqu'il est administré par voie intranasale, cet ester de créatine peut améliorer les performances cognitives des souris *Slc6a8*$^{-/y}$ et augmenter les niveaux d'ATP dans le striatum et les marqueurs synaptiques impliqués dans la potentialisation à long terme (LTP) (Ullio-Gamboa *et al*, 2019).

La cyclocréatine (1-carboxylmethyl-2-iminoimidazolidine) (cCr) (Figure 29) *:* il s'agit d'un analogue cyclisé de la créatine qui a une structure presque planaire ce qui pourrait l'aider à traverser passivement les membranes (Kurosawa *et al*, 2012).

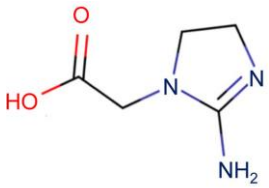


Figure 29 : Structure de la cyclocréatine

D'après Uemura *et al*, 2020.

Elle peut être phosphorylée et déphosphorylée par les créatine kinases. La cCr pourrait donc être utilisée directement par les cellules sous la forme du couple cCr/PcCr. Cependant, elle s'accumule davantage sous la forme phosphorylée (98 % sous forme PcCr dans des fibroblastes sains contre 50 % pour la PCr) (Gorshkov *et al*, 2019). Cela pourrait être dû à une augmentation du taux de conversion de la cCr en PcCr ou à une diminution du taux de conversion de la PcCr en cCr par rapport au couple Cr/PCr. L'accumulation de cCr dans les cellules est aussi plus faible *in vitro* et *in vivo* dans des modèles CTD par rapport aux sains, ce qui montre que le passage de ce dérivé repose principalement sur le CRT (Figure 30) (Kurosawa *et al*, 2012; Uemura *et al*, 2020). L'administration de cCr chez des souris *Slc6a8*$^{-/y}$ (KO total ou conditionné au cerveau) permet une amélioration des fonctions cognitives (Kurosawa *et al*, 2012; Cacciante *et*

al, 2020). Cependant, des études de toxicologies récentes ont démontré sa toxicité sur le long terme chez deux modèles sains (rat Sprague-Dawley et chien beagle) (Kale *et al*, 2020; Wallery *et al*, 2021). Ces études montrent une corrélation entre la dose de cCr et la fréquence des crises d'épilepsie chez les rats et que ces administrations engendrent des lésions microscopiques dans le cerveau, les testicules et la thyroïde (Kale *et al*, 2020). Chez les chiens, la cCr entraîne le développement de lésions au niveau des poumons, cœur, reins et muscles (Wallery *et al*, 2021). Les résultats de toxicité obtenus sur les animaux sains ont conduit à l'arrêt du développement de la cyclocréatine comme médicament.

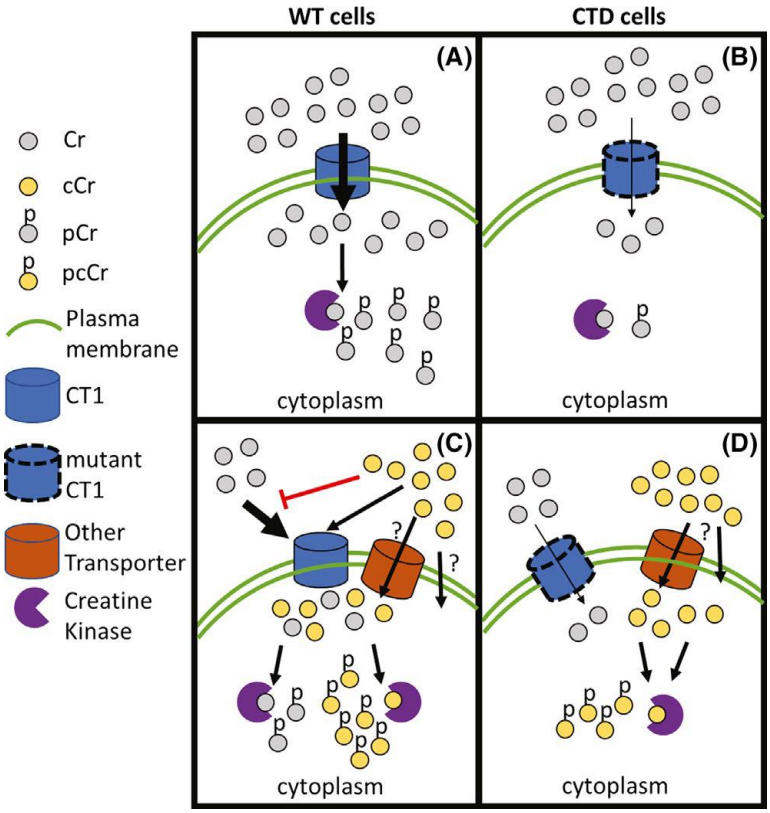


Figure 30 : Transport de la créatine et de la cyclocréatine dans les cellules avec ou sans CRT

(A) Dans les cellules saines, la Cr peut entrer dans la cellule via le CRT (CT1) et être phosphorylée par la créatine kinase. (B) Dans les cellules CTD, le CRT muté n'est pas fonctionnel, ce qui diminue les concentrations de Cr dans la cellule. (C) La cCr entre en compétition avec la Cr pour l'entrée cellulaire dans les cellules saines et réduit les concentrations intracellulaires de Cr. La cCr peut être phosphorylée par la créatine kinase. (D) L'entrée de cCr dans les cellules CTD est peut-être médiée par un autre transporteur ou par diffusion passive. D'après Gorshhov *et al*, 2019.

L'ester éthylique de l'acide diacétyl guanidinique (diacétyl GAAE) (Figure 31) : Adriano *et al* ont également développé un dérivé lipophile du GAA pour favoriser son incorporation dans les cellules (Adriano *et al*, 2018). Ce dérivé semble être protecteur lorsque le CRT est bloqué par du GPA, mais il n'augmente pas les niveaux de Cr et PCr dans le tissu. Il pourrait peut-être être directement utilisé comme système GAA/PhosphoGAA quand il n'y a pas de créatine. Cependant, l'apport de GAA est assez controversé puisque les crises d'épilepsies des patients GAMT ont été attribuées à l'accumulation de GAA dans le parenchyme cérébral. Adriano *et al* précisent que les preuves de la neurotoxicité du GAA ont été démontrées à des doses bien supérieures au maximum observé chez les patients. De plus, les auteurs ont montré que l'incubation de GAA et de diacétyl-GAAE sur des coupes d'hippocampe de souris, à des doses similaires aux patients GAMT, ne modifie pas la transmission synaptique et ne serait donc pas toxiques. Cependant, d'autres phénomènes pourraient être à l'origine du caractère épileptogène du GAA comme l'hypergermination axonale (Hanna-El-Daher *et al*, 2015). De plus, Adriano *et al* se focalisent sur une administration aiguë de GAA et de diacétyl-GAAE et n'étudient pas la toxicité d'une exposition chronique (Adriano *et al*, 2018). En effet, une autre étude a montré un effet négatif d'une exposition du GAA à long terme sur le développement des cellules cérébrales (Hanna-El-Daher *et al*, 2015).

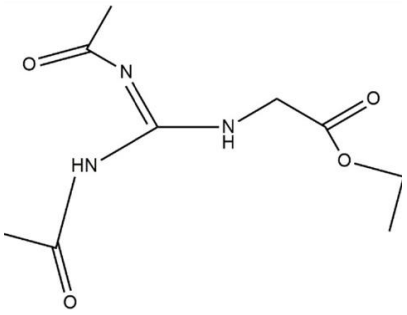


Figure 31 : Structure du diacétyl-GAAE

D'après Adriano *et al*, 2022.

1.3 Stratégie de vectorisation au cerveau

Certains dérivés de la créatine, comme les esters, peuvent être hydrolysés par des estérases plasmatiques. Pour pouvoir les administrer efficacement au cerveau, il ne suffit pas de développer une molécule lipophile qui traverse les membranes, il faut également utiliser une méthode d'administration qui protège le composé jusqu'à la cible. Ainsi, l'utilisation de nanocapsules de lipides a été testée pour protéger le DCE (Trotier-Faurion *et al*, 2015). Ces capsules peuvent traverser un modèle *in vitro* de BHE et entrer dans les cellules endothéliales. De plus, le DCE peut être directement libéré et incorporé dans les fibroblastes de patients pour augmenter le pool de créatine (Trotier-Faurion *et al*, 2015). Le DCE peut aussi être véhiculé dans une microémulsion administrée par voie nasale (Ullio-Gamboa *et al*, 2019). En effet, la voie nasale permet d'administrer un composé au SNC en contournant la BHE. Dans la cavité nasale, les molécules peuvent emprunter la voie des neurones olfactifs dans la partie supérieure de la cavité, ou la voie des nerfs trijumeaux dans l'épithélium respiratoire sur les parois latérales (Figure 32) (Wang *et al*, 2019b). Les molécules sont ensuite distribuées dans le cerveau.

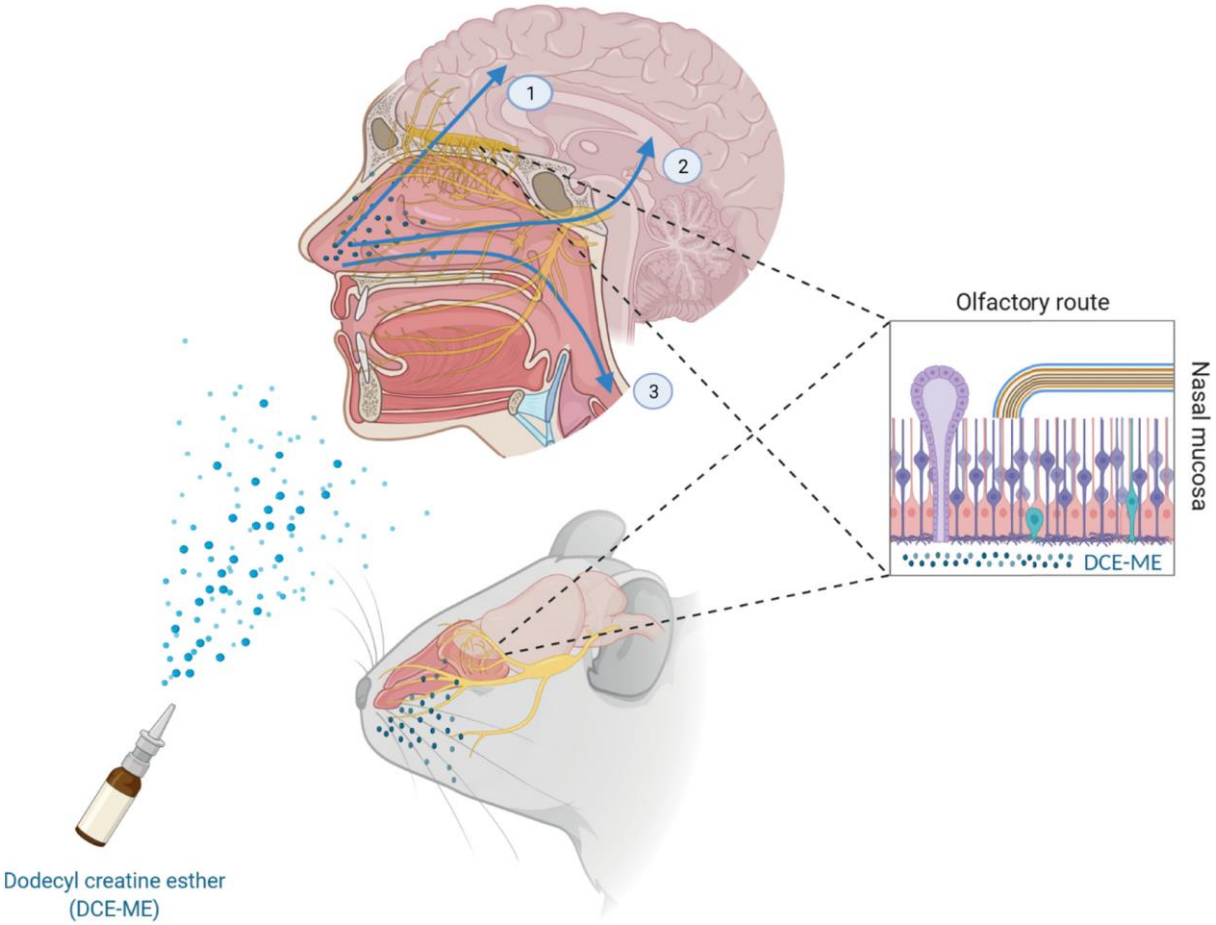


Figure 32 : Administration nasale de DCE chez l'humain et le modèle murin

Le médicament administré par voie nasale peut être acheminé au cerveau par (1) les nerfs olfactifs, (2) les nerfs trijumeaux, ou (3) par une voie indirecte via la circulation systémique. (ME : microémulsion) D'après Fernandes-Pires & Braissant, 2022

2. Production d'un transporteur SLC6A8 fonctionnel

Une autre stratégie pour restaurer le pool de créatine cérébrale est de restaurer la fonctionnalité du transporteur de la créatine.

2.1 Thérapie génique

Pour les maladies métaboliques héritées, la stratégie de thérapie génique repose sur l'utilisation des vecteurs viraux, de l'édition de génome et des thérapies ARN (Fernandes-Pires & Braissant, 2022). Les vecteurs viraux sont les plus intéressants dans le cadre des CCDS puisqu'il faut cibler le SNC, difficile d'accès, ainsi que les tissus

périphériques. Les vecteurs les plus utilisés sont le virus herpès simplex, les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV) ainsi que les vecteurs rétroviraux et lentiviraux. Les AAV sont petits, non-enveloppés et viennent de la famille des Parvoviridae. Sans un virus assistant, ils ne peuvent se répliquer. De plus, ils sont facilement manipulables pour insérer le transgène d'intérêt dans le virus, mais la taille du transgène est plus limitée que pour d'autres virus. Il existe plusieurs sérotypes (AAV1 à 10), chacun avec un tropisme cellulaire et une efficacité différente (Bourdenx *et al*, 2014). Pour traiter les patients CCDS, il faudrait un vecteur qui puisse traverser la BHE pour administrer le gène dans le SNC (Figure 33). Après une injection intraveineuse, le sérotype AAV9 est capable de traverser la BHE chez les souris et les chats, quel que soit l'âge de l'animal (Duque *et al*, 2009; Foust *et al*, 2009). La transduction se fait dans les neurones et les astrocytes. Le souci de l'utilisation de l'AAV9 chez l'humain est la présence d'anticorps neutralisant anti-AAV9, ainsi que la détermination de la dose à injecter aux patients pour éviter les effets secondaires tel qu'une hépatotoxicité (Fernandes-Pires & Braissant, 2022).

À ce jour, une seule étude a testé l'efficacité de la thérapie génique dans un modèle murin de CCDS (Khoja *et al*, 2022). Cette étude porte sur des souris GAMT$^{-/-}$ avec l'utilisation d'un vecteur AAV de sérotype rh10 pour exprimer GAMT dans les hépatocytes. Les souris traitées présentent une réduction de GAA dans le sang et les urines ainsi que des niveaux normaux de créatine plasmatique. Le pool de créatine est également augmenté dans le cerveau et le myocarde. Les souris GAMT$^{-/-}$ traitées ont également pris du poids et présentent une amélioration du comportement par rapport au souris GAMT$^{-/-}$ non traitées. Il est cependant difficile de conclure davantage puisque ce modèle de souris déficiente pour GAMT ne semble pas recréer la sévérité des symptômes des patients GAMT. De plus, les niveaux de GAA sont toujours relativement élevés dans le cerveau et les reins des souris GAMT$^{-/-}$ traitées. Sachant que l'accumulation de GAA cérébral aurait une action épileptogène chez les patients GAMT, une approche plus efficace serait d'exprimer le transgène de manière ubiquitaire et en utilisant un sérotype ayant une capacité accrue à traverser la BHE.

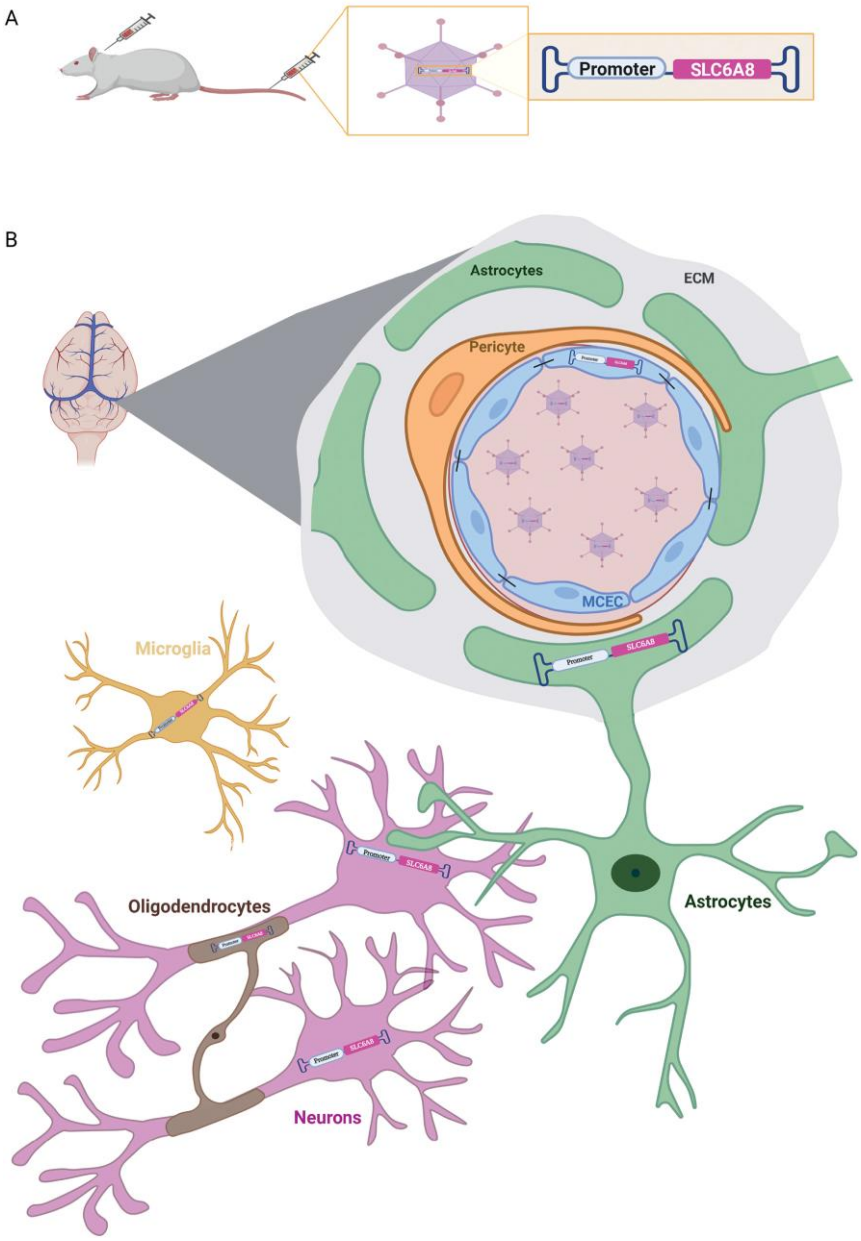


Figure 33 : Thérapie génique basée sur des vecteurs AAV

(A) Représentation d'un vecteur AAV, contenant le gène SLC6A8, injecté par voie systémique ou intrathécale. (B) Représentation de la BHE et des cellules du parenchyme cérébral exprimant SLC6A8 après transduction par le vecteur AAV. D'après Fernandes-Pires & Braissant 2022.

2.2 Repliement du transporteur SLC6A8

Dans la famille des SLC6, plusieurs mutations ont été décrites comme responsables d'un mauvais repliement des transporteurs de la dopamine (DAT, SLC6A3), de la glycine (GlyT2, SLC6A5), de la sérotonine (SERT, SLC6A4) et de la créatine (Freissmuth *et al*, 2018). Ces mutations peuvent se produire sur des résidus fortement conservés dans la famille SLC6 (Figure 34).

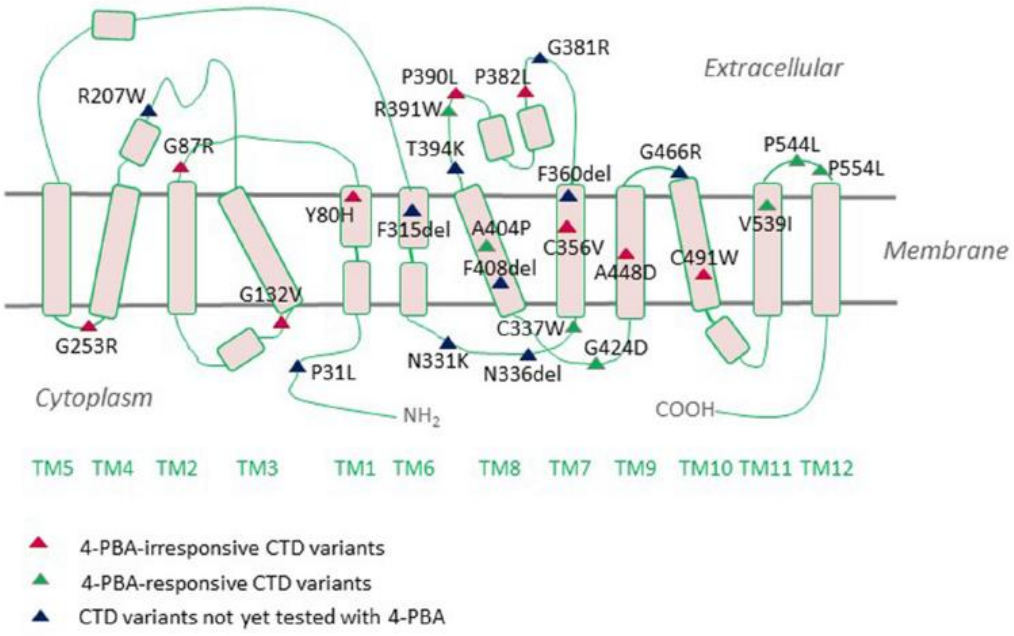


Figure 34 : Position des mutations des variants SLC6A8

Les mutations en rouge et vert provoquent un mauvais repliement du transporteur. D'après Farr *et al*, 2020.

Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment majeur de repliement des protéines qui contrôle activement la biosynthèse, l'assemblage et le trafic de la plupart des protéines sécrétées et membranaires (Hwang & Qi, 2018). Pour maintenir l'homéostasie protéique, les cellules doivent assurer la fidélité du repliement et de la maturation des protéines. Cependant, certaines conditions physiologiques et pathologiques peuvent entraîner un déséquilibre entre la demande de repliement des protéines et la capacité de repliement, ce qui entraîne une accumulation de protéines mal repliées dans le RE, avec pour conséquence un stress du RE. Pour maintenir l'homéostasie du RE, les cellules ont développé des systèmes de contrôle de la qualité

des protéines par l'action de différentes voies, notamment l'UPR (Unfolded Protein Response), l'ERAD (ER Associated Degradation) et l'autophagie (Hwang & Qi, 2018; Phillips *et al*, 2020) (Figure 35).

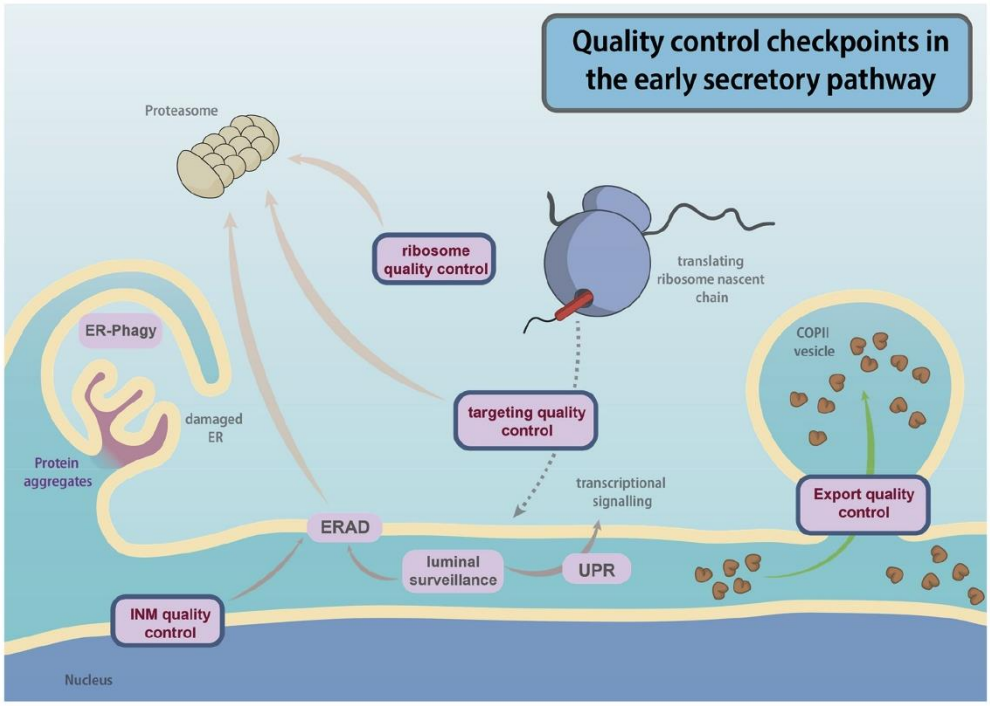


Figure 35 : Points de contrôle de la qualité des protéines dans le RE

Les protéines sécrétées et membranaires sont soumises à de multiples points de contrôle qualité lors de leur synthèse pour s'assurer de leur bon repliement et glycosylation. Ces voies comprennent notamment la dégradation de grandes régions du RE contenant des agrégats protéiques (autophagie du RE), l'induction de l'UPR (réponse aux protéines non repliées) transcriptionnelle en réponse au stress de repliement des protéines ; la dégradation protéasomale des substrats mal repliés et aberrants via l'ERAD (ER associated degradation). D'après Phillips *et al*, 2020.

Ainsi, les transporteurs dont la mutation entraîne un mauvais repliement sont bloqués dans le RE puis dégradés, et sont donc non fonctionnels puisqu'ils ne peuvent pas être acheminés sur leur lieu de fonction (e.g. la membrane plasmique) (Figure 36A). Le déficit de repliement d'une protéine peut être corrigé par des chaperonnes chimiques ou pharmacologiques qui facilitent un bon repliement et/ou la fuite des protéines mutantes de la machine de contrôle qualité du RE (Figure 36B) (El-Kasaby *et al*, 2019).

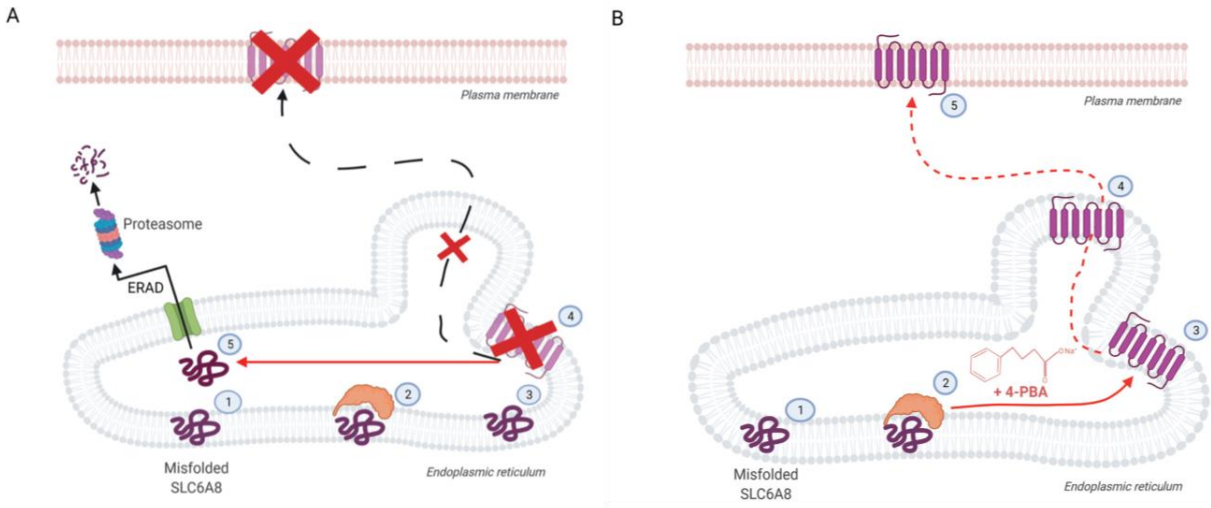


Figure 36 : Stratégie de repliement du transporteur de la créatine par des chaperonnes pharmacologiques

(A) Les protéines mal repliées restent liées à la calnexine (orange) et sont ensuite dégradées par le protéasome via le système de dégradation associé au réticulum endoplasmique (ERAD). (B) Des chaperonnes pharmacologiques, tel que le 4-PBA, peuvent se lier et stabiliser le CRT mutant mal replié pour permettre sa translocation à la membrane plasmique et ainsi regagner son activité. Adapté d'après Fernandes-Pires & Braissant, 2022.

Ainsi, le 4-phénylbutyrate (4-PBA) est une molécule qui agirait comme chaperonne hydrophobique interagissant avec les segments hydrophobes des protéines mal repliées pour les protéger de l'agrégation (El-Kasaby *et al*, 2019). Le 4-PBA pourrait également agir sur le stress du RE en modulant l'expression des chaperonnes heat shock via une action sur les histones déacétylases (HDAC) (El-Kasaby *et al*, 2019; Salazar *et al*, 2020). Ce composé pourrait donc avoir un effet neuroprotecteur en agissant au niveau épigénétique. De plus, il s'agit d'un composé approuvé pour un usage pédiatrique dans les troubles du cycle de l'urée puisqu'il agit comme capteur d'azote pour favoriser l'excrétion des déchets azotés (El-Kasaby *et al*, 2019). Il est également testé pour son action d'activation de la transcription de la β-globine dans la drépanocytose et pour son action sur le repliement de certains variants du transporteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) dans la mucoviscidose (El-Kasaby *et al*, 2019).

El-Kasaby *et al* ont ainsi montré que plusieurs mutants SLC6A8 sont piégés dans le RE et que le traitement au 4-PBA pouvait restaurer la localisation de certains variants à la membrane plasmique (Figure 37) (El-Kasaby *et al*, 2019). Salazar *et al* ont également montré que le traitement au 4-PBA peut augmenter la fonction du CRT sauvage par un mécanisme indépendant de la quantité de transporteurs (Salazar *et al*, 2020). Cette action pourrait être intéressante pour le traitement des patientes hétérozygotes CTD en potentialisant la fonction des CRT sains. Le 4-PBA semble être efficace chez un tiers des variants ayant un mauvais repliement du CRT (Salazar *et al*, 2020) (Figure 34). Cependant, certains variants peuvent porter une mutation qui impacte à la fois leur transport et leur fonction de transport de la créatine. Ainsi, une fois repliés correctement et acheminés à la membrane plasmique, ces CRT pourraient toujours être non-fonctionnels (Salazar *et al*, 2020).

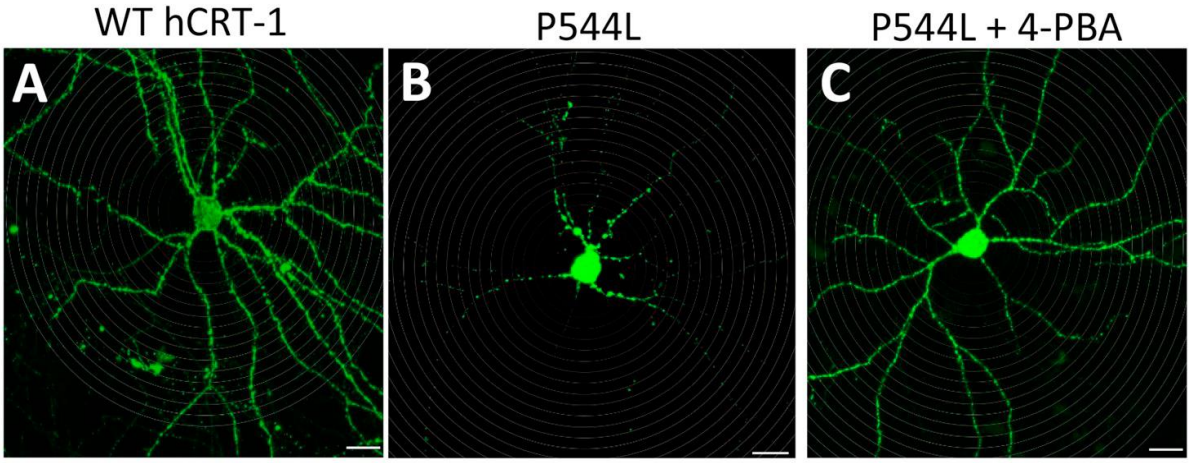


Figure 37 : Localisation du CRT WT et P544L dans des neurones de l'hippocampe de souris avec ou sans traitement au 4-PBA

(A) Le CRT sauvage est localisé à la membrane plasmique. (B-C) Le CRT mutant P544L, qui est piégé dans le RE (B), est relocalisé à la membrane plasmique après traitement avec du 4-PBA (C). D'après El-Kasaby *et al*, 2019.

2.3 Restauration de la traduction pour les mutations non-sens

Les mutations non-sens provoquent un arrêt précoce de la traduction en codant pour un codon STOP. Certains composés peuvent agir sur les ribosomes pour forcer la traduction dans ces conditions (Salazar *et al*, 2020). L'ataluren a ainsi été testé chez des patients atteints de mucoviscidose (Sermet-Gaudelus *et al*, 2010) et de la myopathie

de Duchenne (Namgoong & Bertoni, 2016). Ce candidat médicament permet aux ribosomes de lire les codons prématurés de l'ARNm pour produire des protéines fonctionnelles, et pourrait être intéressant à tester dans le cadre de certaines mutations non-sens du CTD (Salazar *et al*, 2020).

3. Molécules agissant sur la physiopathologie du CTD

Au lieu d'agir sur la restauration du pool de créatine, une autre stratégie serait de cibler les conséquences du manque de créatine cérébrale. Cette stratégie semble peu développée actuellement. En effet, la créatine ayant des rôles très divers, les conséquences du manque de créatine entrainent probablement plusieurs dérégulations pour lesquelles une seule molécule thérapeutique ne serait pas efficace. De plus, la physiopathologie du CTD étant relativement peu connue, trouver une cible thérapeutique peut s'avérer difficile.

Cette stratégie est pourtant intéressante puisque les symptômes des patients CTD sont communs à d'autres pathologies neurologiques. Les dérégulations moléculaires et cellulaires chez les patients CTD peuvent ainsi être similaires à d'autres déficiences intellectuelles et d'autres neuropathologies pour lesquelles des traitements sont aussi en cours de développement. Ces connexions avec d'autres neuropathologies peuvent ouvrir la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques.

De plus, il est possible que la restauration du pool de créatine ne soit pas suffisante pour réparer certaines lésions cérébrales. Pour améliorer leur déficit cognitif, les patients pourraient ainsi nécessiter une combinaison de thérapies qui favoriserait d'une part la restauration du pool de créatine, et ciblerait d'autre part un phénomène physiopathologique précis.

Ainsi, la bétaïne pourrait être une molécule d'intérêt pour le traitement des patients CTD. Schjelderup *et al* ont montré qu'une supplémentation en bétaïne chez deux patients CTD adultes semble améliorer, dans une certaine mesure, leurs fonctions

verbales ainsi que leur capacité à s'alimenter (Schjelderup *et al*, 2021). La bétaïne pourrait exercer un effet bénéfique en tant qu'osmolyte, mais aussi en tant que régulateur négatif du canal NKCC1 et donc en influençant la transmission GABAergique (Schjelderup *et al*, 2021). De plus, la bétaïne est un donneur de groupement méthyl pour la génération de méthionine qui permet la génération de SAM.

De plus, Ghirardini *et al* ont récemment montré qu'un traitement au Zolpidem améliore l'activité corticale de souris KO CRT (Ghirardini *et al*, 2023). Le Zolpidem est un agoniste des récepteurs $GABA_A$ contenant la sous-unité α, et qui permet donc d'activer les cibles synaptiques des interneurones PV+ qui développent moins de synapses dans les souris KO CRT. Ces résultats illustrent l'avantage de cibler une dérégulation de la physiopathologie du CTD, à savoir l'altération des circuits GABAergiques.

CHAPITRE 2 – OBJECTIFS

Le déficit en transporteur de la créatine (CTD) est une maladie génétique rare dans laquelle la perte de fonctionnalité du transporteur de la créatine conduit à une absence de créatine dans le cerveau et à des retards mentaux de développement majeurs chez les enfants. L'absence de créatine dans les cellules provoque des déficits énergétiques ayant des répercussions importantes en terme de physiologie, notamment neuronales. Cependant, les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires cérébraux affectés par l'absence de créatine chez les patients atteints du CTD restent très limitées alors qu'elles sont plus que nécessaires dans l'identification de nouvelles cibles potentielles pour des traitements pharmacologiques. Le rationnel de ce projet de thèse repose sur le développement de modèles cellulaires mimant le cerveau de patients CTD pour mieux appréhender le rôle de la créatine dans les dysfonctionnements cérébraux chez les patients atteints. L'objectif est d'identifier des signatures moléculaires d'une grande valeur translationnelle pour les études précliniques et cliniques. En effet, des études sur les déficits en biosynthèse de créatine ont montré que la supplémentation en créatine est capable d'améliorer les fonctions cognitives de patients atteints des déficits congénitaux de synthèse en créatine (Stöckler *et al*, 1994; Item *et al*, 2001; Schulze & Battini, 2007). Ainsi, comprendre le rôle de la créatine dans les dysfonctionnements cérébraux chez les patients CTD permettrait d'infirmer ou de confirmer la stratégie d'apport de la créatine au niveau cérébral dans l'amélioration des fonctions cognitives de patients CTD.

Dans ce contexte, nous avons développé et caractérisé ce nouveau modèle d'organoïdes cérébraux CTD pour déterminer les types cellulaires présents dans l'organoïde ainsi que le caractère pathologique du modèle et les régions cérébrales qu'il modélise. Les résultats de caractérisation des organoïdes cérébraux sont présentés dans la **partie 1 du chapitre Résultats & Discussions** et dans **l'article 1**. Nous avons par la suite utilisé ce modèle pour répondre à l'objectif principal et étudier les voies de signalisation dérégulées. La comparaison de ces résultats avec un modèle d'organoïdes

provenant de sujets sains, a permis de mettre en évidence un réseau de signalisation altéré ayant des similitudes avec d'autres neuropathologies à l'instar des troubles du spectre autistique, du syndrome de Down et du syndrome de l'X fragile. L'étude des voies de signalisation a permis de mettre en évidence des acteurs majeurs impactant la neurogenèse et la modulation de certaines protéines cérébrales en lien avec la symptomatologie CTD dans les organoïdes cérébraux. Les observations rapportées dans la **partie 2.1 du chapitre Résultats & Discussions** et dans les **articles 1 et 2** mettent en exergue de potentiels déficits de neurogenèse et de synaptogenèse comme cibles thérapeutiques.

La créatine ayant un rôle majeur dans le métabolisme énergétique cellulaire et tout particulièrement au niveau neuronal où les besoins sont élevés, la question de l'impact de l'absence de créatine sur les autres processus impliqués dans la bioénergétique peut se poser. Nous nous sommes intéressés à l'implication du métabolisme glucidique dans la physiopathologie du CTD et son utilisation comme biomarqueur potentiel du CTD. Nous nous sommes également intéressés au réseau mitochondrial où siège le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative. Ces observations sont rapportées dans la **partie 2.2 du chapitre Résultats & Discussions** et dans **l'article 3**.

Un des mécanismes susceptibles de moduler l'expression d'un grand nombre de protéines identifiées dans le cadre de cette thèse sont les modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, des ARN ou des histones. Outre l'impact sur l'expression génique, la méthylation se trouve être également la dernière étape de synthèse endogène de la créatine. En effet, la synthèse endogène de créatine nécessite l'utilisation de la S-adénosylméthionine qui est également utilisée pour la méthylation d'autres substrats (Serefidou *et al*, 2019). L'hypothèse est donc qu'en absence d'incorporation de créatine, des modifications s'opèrent au niveau de la synthèse endogène de créatine conduisant à des modulations de phénomènes de méthylation et donc à un impact sur l'expression génique. Nous avons donc caractérisé dans ce projet de thèse les modifications épigénétiques dans les organoïdes cérébraux de

patients CTD. Les résultats sont présentés dans la **partie 2.3 du chapitre Résultats & Discussions** et dans **l'article 4**.

Soucieux d'infirmer et ou de confirmer le rôle prépondérant de la créatine dans ces perturbations physiologiques que ce soit au niveau de la neurogenèse, du métabolisme du glucose ou des phénomènes épigénétiques, notre réflexion s'est portée sur l'impact de la réinstallation de niveau normaux de créatine. Deux stratégies ont été utilisées pour restaurer les niveaux intracellulaires de créatine : une réintroduction du transporteur fonctionnel de la créatine dans les organoïdes cérébraux ou l'apport de la créatine par l'utilisation d'une prodrogue de la créatine, l'ester dodécylique de créatine (DCE). Le DCE est un dérivé lipophile de la créatine qui peut traverser les membranes biologiques et augmenter la concentration de créatine dans les cellules de patients CTD (Trotier-Faurion *et al*, 2015). De plus, lorsqu'il est administré par voie intranasale ou intracérébroventriculaire, ce dérivé augmente la concentration de créatine cérébrale et améliore les fonctions cognitives des souris KO CRT (Ullio-Gamboa *et al*, 2019). Les résultats des deux stratégies de restauration des niveaux intracellulaires de créatine sont rapportés dans chacune des parties et articles correspondant aux grandes dérégulations observées.

CHAPITRE 3 – DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

La stratégie expérimentale développée au cours de ce projet de thèse est résumée dans la figure (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Pour obtenir notre modèle, des fibroblastes de trois patients possédant différentes mutations du gène *Slc6a8* (P1 : c1006_1008AAC pAsn336del ; P2 : c1487_1500delGAG pGly499del ; P3 : c1221_1223delTTC pGly414del) ont été prélevés et reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (iPSC). La pluripotence de ces iPSC a été démontrée par des expériences *in vitro* (présence des facteurs SOX2, OCT4, NANOG, SSEA4 et TRA1-60) et *in vivo* (formation des trois feuillets embryonnaires dans des tératomes murins). Des expériences d'incorporation de créatine ont montré la non-fonctionnalité du CRT dans ces iPSC. Ces cellules CTD ont ensuite été utilisées pour former des corps embryoïdes par la technique de la goutte pendante d'après le protocole de Lancaster et Knoblich (Lancaster & Knoblich, 2014b) avec des modifications mineures de Nassor *et al* (Nassor *et al*, 2020). Après plusieurs jours de culture et l'utilisation d'un milieu favorisant l'induction neurale, les corps embryoïdes ont été enrobés dans une goutte de matrigel pour soutenir l'expansion de bourgeons du neuroectoderme. Après deux mois de culture, le tissu s'est développé dans tout le matrigel et forme un organoïde cérébral. La caractérisation de ce modèle, par immunofluorescence sur coupe et RT-PCR, a permis de déterminer les types cellulaires présents dans l'organoïde ainsi que sa structure. Le maintien de la non-fonctionnalité du CRT a été démontré par un test d'incorporation de la créatine. Pour valider ces résultats, nous avons introduit le gène *Slc6a8* sain dans les iPSC de patients de manière à exprimer le CRT fonctionnel ainsi que la protéine fluorescente verte (GFP). Les cellules ayant une forte expression de la GFP, et donc du CRT, ont été sélectionnées pour former des organoïdes cérébraux CTD-rescue. Les iPSC et les organoïdes issues de cette expérience rescue constituent ainsi un outil pour confirmer les résultats obtenus sur les organoïdes CTD.

Pour identifier les voies de signalisation impactée par le manque de créatine, nous avons comparé le protéome des organoïdes sains vs CTD par spectrométrie de masse

en tandem couplé à une chromatographie liquide. Nous avons ainsi généré un jeu de données protéomiques de 4219 protéines. Les analyses bio-informatiques de ce jeu de données ont permis d'identifier un panel de protéines différentiellement abondantes entre les organoïdes sains vs CTD. Puis, les résultats ont été validés par des approches ciblées (western-blot et RT-PCR) sur de nouvelles productions d'organoïdes CTD et sur les organoïdes CTD-rescue.

Nous nous sommes également concentrés sur le métabolisme énergétique en évaluant la consommation de glucose dans le cerveau des souris KO CRT (traitées ou non avec du DCE) par l'utilisation du [^{18}F]FDG (fluorodésoxyglucose, analogue du glucose, radiomarqué au ^{18}F) et de l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP). La TEP est une méthode d'imagerie peu invasive qui permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe grâce aux émissions produites par les positons issus de la désintégration d'un produit radioactif injecté au préalable. Le FDG étant un analogue du glucose qui est internalisé dans les cellules par les transporteurs GLUT, la TEP au [18F]FDG permet d'évaluer la consommation de glucose dans le cerveau *in vivo* (Guedj *et al*, 2022). Nous avons ensuite analysé par RT-PCR et western-blot les voies de signalisation impactées en lien avec le métabolisme du glucose dans le modèle murin et nous avons vérifié ces résultats dans les organoïdes cérébraux humains CTD.

Pour étudier les modifications épigénétiques, nous nous sommes focalisés sur les processus de méthylation de l'ADN en mesurant le taux de 5-méthylcytosine (5-mC) sur des extraits d'ADN d'organoïdes cérébraux et des cerveaux de souris KO CRT (traitées ou non avec du DCE).

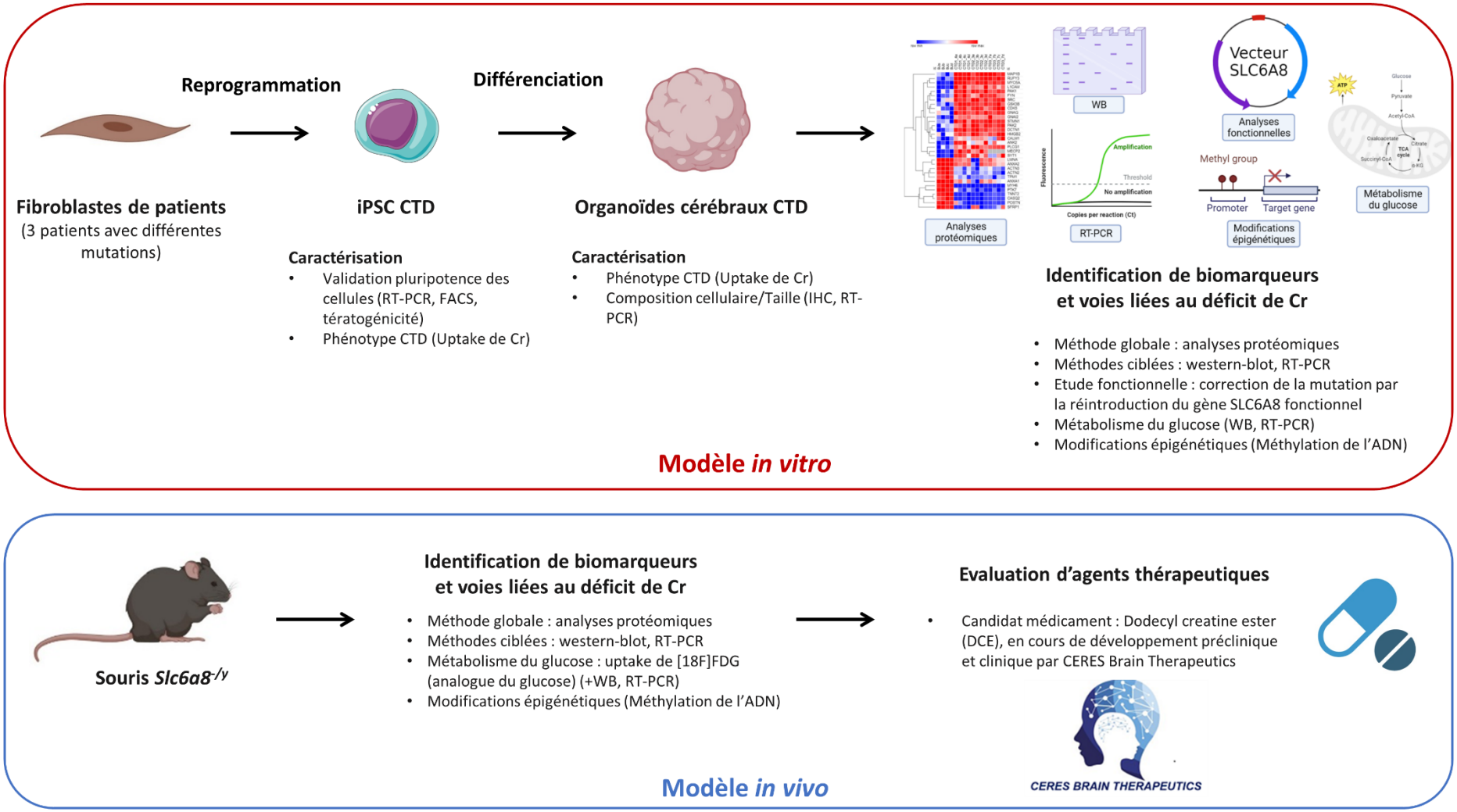


Figure 38 : Stratégie expérimentale développée au cours de ce projet de thèse

CHAPITRE 4 – RÉSULTATS & DISCUSSIONS

Ce chapitre comporte deux parties qui résument les résultats présentés dans quatre articles publiés ou en cours de soumission, ainsi qu'un brevet européen. La 1re partie résume l'obtention et la caractérisation du modèle d'organoïdes cérébraux CTD humains. La 2e partie aborde l'étude de la physiopathologie du CTD grâce à l'utilisation du nouveau modèle d'organoïdes CTD et de modèles de souris KO CRT.

Ce chapitre suit le plan suivant :

Partie 1 : Obtention et caractérisation des organoïdes cérébraux CTD

1. Contexte
2. Article 1 (publié dans le journal *eLife*)
3. Principaux résultats et résultats complémentaires
4. Discussion

Partie 2 : Étude de la physiopathologie du CTD

1. Régulation de la neurogenèse
    1.1 Contexte
    1.2 Article 1 (cf. Partie 1)
    1.3 Article 2 (publié dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience*)
    1.4 Brevet européen (PR91039_EP)
    1.5 Principaux résultats et résultats complémentaires
2. Métabolisme du glucose
    2.1 Contexte
    2.2 Article 3 (soumis dans le journal *Neuropharmacology*)
    2.3 Principaux résultats et résultats complémentaires
3. Processus de méthylation
    3.1 Contexte
    3.2 Article 4 (prévu pour soumission dans le journal *eLife*)
    3.3 Principaux résultats et résultats complémentaires
4. Discussion

Partie 1 : Obtention et caractérisation des organoïdes cérébraux CTD

1. Contexte

L'absence de créatine dans le cerveau des patients CTD entraîne une déficience intellectuelle modérée à sévère avec un retard de la parole et du langage ainsi qu'une attitude pseudo-autistique, des troubles du mouvement et de l'épilepsie (Salomons *et al*, 2001, 2003). À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour traiter les patients CTD. L'absence de CRT fonctionnel dans le cerveau des patients est un obstacle important à l'administration de créatine dans les cellules du cerveau de manière à améliorer les fonctions cérébrales (Ohtsuki *et al*, 2002; van de Kamp *et al*, 2014). La supplémentation en créatine alimentaire n'étant pas efficace dans le cadre du CTD, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires cérébraux affectés par l'absence de créatine chez les patients atteints du CTD restent très limitées alors qu'elles sont plus que nécessaires dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie et dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bien que plusieurs modèles murins CTD aient été développés (Tableau 1 et Tableau 2), la plupart des études se sont concentrées sur la description des déficits comportementaux et cognitifs causés par un manque de créatine dans le cerveau et n'ont pas étudié les mécanismes moléculaires associés à ces déficits comportementaux (Skelton *et al*, 2011; Baroncelli *et al*, 2014). Nous avons récemment corrélé les fonctions cognitives d'un modèle de souris KO CRT avec des analyses protéomiques de leur tissu cérébral (Mabondzo *et al*, 2023). Nous avons ainsi observé la régulation de protéines impliquées dans la synaptogenèse et dans la migration neuronale tel que NCAM1 (Neural Cell Adhesion Molecule 1). Cependant, la pertinence de ces observations exige une validation chez les patients CTD. En effet, bien que ces modèles murins semblent récapituler le phénotype des patients CTD, les différences inter-espèces compliquent

l'extrapolation des résultats à l'être humain. En outre, les échantillons post-mortem humains peuvent être difficiles à obtenir et manquent souvent de contrôles appropriés, ce qui limite l'étude des mécanismes moléculaires. Les cultures cellulaires humaines classiques, quant à elles, sont souvent considérées comme non physiologiques de par l'utilisation de cellules immortalisées, ainsi que l'absence de modélisation de l'architecture du tissu et des interactions des différents types cellulaires. Les cellules en monocouche peuvent ainsi perdre leur phénotype originel et leurs caractéristiques fonctionnelles, impactant ainsi la pertinence de leurs réponses biologiques. Il est donc important de développer des modèles biologiques pertinents pour une meilleure compréhension de la physiopathologie du CTD. La technologie de reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ainsi que leur différenciation en organoïdes cérébraux offre une telle possibilité. En effet, les organoïdes cérébraux sont des modèles 3D, comportant plusieurs types cellulaires, qui récapitulent la structure et les fonctions principales du cerveau. Puisqu'il peut être développé avec des iPSC reprogrammées à partir de cellules de patients, ce type de modèle peut conserver le fond génétique du patient et permettre de faire de la médecine personnalisée.

Ainsi, dans ce projet de thèse, nous avons pu avoir accès aux fibroblastes de trois patients CTD grâce à un don du Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme de l'Hôpital Necker à Paris. Les mutations de ces patients ainsi que leurs phénotypes ont précédemment été décrits (Valayannopoulos *et al*, 2013) :

- Patient 1 : c1006_1008delAAC (pAsn336del), 9 ans présentant un léger retard mental, un retard de langage, des difficultés d'apprentissage, un léger trouble du comportement et une hypotonie faciale
- Patient 2 : c1497_1500delGAG (pGly499del), 10 ans présentant un léger retard psychomoteur, un retard de langage, des crises d'épilepsie, de l'impulsivité, une hypotonie faciale et du tronc.

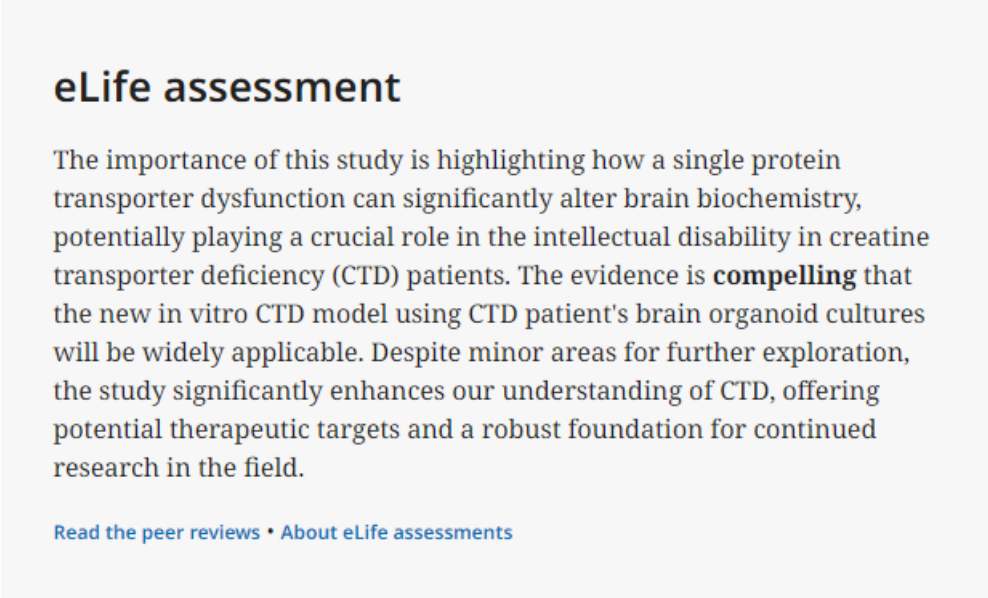
- Patient 3 : c1221_1223delTTC (pGly414del), 3 ans, sans langage, comportement autistique avec hyperactivité et instabilité émotionnelle.

Nous avons généré des iPSC à partir des fibroblastes de ces patients et les avons utilisées pour générer des organoïdes cérébraux CTD, en utilisant des méthodes publiées précédemment (Nassor *et al*, 2020; Pavoni *et al*, 2018; Lancaster & Knoblich, 2014b). L'obtention et la caractérisation de ce nouveau modèle d'organoïdes cérébraux CTD font l'objet d'un article publié dans le journal *eLife* (Article 1). Dans cet article, le modèle est ensuite utilisé pour étudier la physiopathologie du CTD. Cet aspect sera discuté plus loin dans la partie 2.1 Régulation de la neurogenèse.

2. Article 1 : Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency

Cet article résume les résultats de la reprogrammation des iPSC à partir des fibroblastes de patients CTD, l'obtention et la caractérisation des organoïdes cérébraux CTD ainsi que la comparaison des protéomes d'organoïdes sains vs CTD. Les résultats de l'étude de la physiopathologie du CTD grâce à ces comparaisons feront l'objet de la Partie 2 du chapitre Résultats, et en particulier de la partie 2.1 Régulation de la neurogenèse.

L'article 1 est publié dans le journal *eLife* (version preprint évaluée, 22 juin 2023). La version présentée dans ce manuscrit est la version révisée.



eLife assessment

The importance of this study is highlighting how a single protein transporter dysfunction can significantly alter brain biochemistry, potentially playing a crucial role in the intellectual disability in creatine transporter deficiency (CTD) patients. The evidence is **compelling** that the new in vitro CTD model using CTD patient's brain organoid cultures will be widely applicable. Despite minor areas for further exploration, the study significantly enhances our understanding of CTD, offering potential therapeutic targets and a robust foundation for continued research in the field.

Read the peer reviews • About eLife assessments

Les tableaux (Table 1, Supplementary Tables S1-S7) sont disponibles sur le site Biorxiv : https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.06.01.543271v1.supplementary-material

Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency

Léa Broca-Brisson[1], Rania Harati[2,3], Clémence Disdier[4], Orsolya Mozner[5], Romane Gaston-Breton[1], Auriane Maïza[1], Narciso Costa[1], Anne-Cécile Guyot[1], Balazs Sarkadi[5], Agota Apati[5], Matthew R Skelton[6], Lucie Madrange[7], Frank Yates[7], Jean Armengaud[8], Rifat A. Hamoudi[3,9,10,11,#] and Aloïse Mabondzo[1,#,*]

Affiliations

[1]Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette cedex 91191, France.

[2]Department of Pharmacy Practice and Pharmacotherapeutics, College of Pharmacy, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[3]Sharjah Institute for Medical Research, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[4]CERES BRAIN Therapeutics, Paris, France. ICM-Hôpital Pitié-Salpétrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

[5]Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, ELKH, and Doctoral School of Molecular Medicine, Semmelweis University, Budapest Hungary.

[6]Department of Pediatrics, University of Cincinnati College of Medicine and Division of Neurology, Cincinnati Children's Research Foundation, United States

[7]Sup'Biotech/Service d'Etude des Prions et des Infections Atypiques (SEPIA), Institut François Jacob, CEA, Université Paris Saclay, 92265, Fontenay-aux-Roses, France.

[8]Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

[9]Clinical Sciences Department, College of Medicine, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[10]Division of Surgery and Interventional Science, University College London, London, United Kingdom.

28 [11]ASPIRE Precision Medicine Research Institute Abu Dhabi, University of Sharjah, Sharjah, United Arab
29 Emirates.

# These authors contributed equally to the work

***Corresponding author**: Dr Aloïse Mabondzo, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, LENIT, Gif-sur-Yvette cedex 91191, France Phone: 33 1 69081321; E-mail: aloise.mabondzo@cea.fr.

Abstract

Creatine transporter deficiency (CTD) is an X-linked disease caused by mutations in the SLC6A8 gene. The impaired creatine uptake in the brain results in intellectual disability, behavioral disorders, language delay, and seizures. In this work, we generated human brain organoids from induced pluripotent stem cells of healthy subjects and CTD patients. Brain organoids from CTD donors had reduced creatine uptake compared with those from healthy donors. The expression of neural progenitor cell markers SOX2 and PAX6 was reduced in CTD derived organoids, while GSK3β, a key regulator of neurogenesis, was up-regulated. Shotgun proteomics combined with integrative bioinformatic and statistical analysis identified changes in abundance of proteins associated with intellectual disability, epilepsy, and autism. Re-establishment of the expression a functional SLC6A8 in CTD-derived organoids restored creatine uptake and normalized the expression of SOX2, GSK3β and other key proteins associated with clinical features of CTD patients. Our brain organoid model opens new avenues for further characterizing the CTD pathophysiology and supports the concept that reinstating creatine levels in patients with CTD could result in therapeutic efficacy.

Summary Heading: Therapeutic targets associated with Creatine Transporter Deficiency

Keywords: Brain organoids, Creatine Transporter Deficiency, Molecular pathways, Neurogenesis
Subject: Genetic Disease; Neuroscience

Introduction

Creatine transporter deficiency (CTD) is a devastating neurological disorder that results in moderate to severe intellectual disability (ID), epilepsy, and a lack of language development (Cecil et al., 2001; deGrauw et al., 2003; Farr et al., 2020; Salomons et al., 2003). Mutations in the *SLC6A8* gene reduces or eliminates creatine transporter (CRT, SLC6A8) production and impairs creatine (Cr) uptake, preventing brain Cr accumulation. Individuals with CTD may have mild generalized muscular atrophy, dysmorphic facial features, microcephaly, and gastrointestinal disturbances (Stockler et al., 2007; van de Kamp et al., 2014). This neglected disorder has been estimated to cause between 1-3% of all X-linked ID (van de Kamp et al., 2014) and about 1% of cases with ID of unknown etiology (Clark et al., 2006). Currently there is no efficient treatment for CTD, and the affected males require lifelong familial or institutional care, representing a significant economic burden for both the individual and the society (Fernandes-Pires and Braissant, 2022).

The lack of functional CRT in the brain represents a significant roadblock in improving the clinical outcome of CTD patients (Ohtsuki et al., 2002; van de Kamp et al., 2014). Several combinations of nutritional supplements or Cr precursors l-arginine and l-glycine, have been studied as therapeutic approaches for CTD, but they have shown limited success (Bruun et al., 2018; Valayannopoulos et al., 2013), , compelling development of alternative strategies for treatment of CTD. Mechanistic understanding of how and where Cr functions in the brain is poorly documented although would be crucial to develop efficient therapies. While several rodent models of CTD have been developed, most studies focused on the description of behavioral and cognitive deficits caused by a lack of brain Cr and have not investigated the molecular underpinnings of this disorder. In addition, while these models do appear to recapitulate the phenotype of humans with CTD (Baroncelli et al., 2014; Duran-Trio et al., 2021; Skelton et al., 2011), the important translational gap between rodents and humans needs to be addressed. In the case of this disorder, human post-mortem samples may be difficult to obtain and frequently lack proper controls, thus limiting the investigation of molecular mechanisms. Thus, there is a great need for a relevant biological model to bridge the translational gap in our understanding of CTD. The generation of a comprehensive human model system, recapitulating some of the clinical

78 features of CTD and providing translationally relevant data, would be a significant advancement in our
79 potential to explore the molecular pathomechanism of CTD and validate treatment methodologies. The
80 recent development of specific brain organoids derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs)
81 provides such a possibility.
82 In the present work we have generated iPSCs from fibroblasts of three CTD patients, using previously
83 published methods (Nassor et al., 2020; Pavoni et al., 2018). We examined the morphology, mRNA
84 expression, and proteomic profile of the obtained brain organoids. Several pathways have been
85 identified related to brain development that are altered in CTD derived brain organoids. Transfecting a
86 functional *SLC6A8* gene into CTD patient-derived iPSCs rescued Cr uptake and normalized much of
87 the proteomic and other pathological features. This study establishes for the first time the use of human
88 CTD brain organoids as a high-fidelity model for understanding the pathophysiology of this devastating
89 disease. The use of human brain organoids from CTD patients is technically innovative and, together
90 with the proteomic studies, provides new information on the cellular basis of cerebral Cr and the
91 molecular mechanism underlying the onset of the CTD phenotype. Here we also provide a database of
92 the cell-specific alterations in CTD-related molecular pathways of translational value, relevant for
93 treatment design.
94
95 **Results**
96
97 **Generation and characterization of CTD brain organoids**
98
99 To develop CTD brain organoids, we generated iPS cell lines from the fibroblasts of three CTD patients
100 (CTD 1-4, CTD 2-3 and CTD 3-7). Control iPSCs were derived from the fibroblasts of three healthy
101 volunteers (BJ, SP and PK(Pavoni et al., 2018; Roux et al., 2019; Trotier-Faurion et al., 2013)). All
102 *SLC6A8* gene mutations and the disease phenotypes were described in detail by Valayannopoulos *et*
103 *al.*(Valayannopoulos et al., 2013).
104 We found that all iPSC lines expressed the pluripotency factors SOX2, NANOG, and OCT4, unlike
105 fibroblasts (Fig S1A), as well as the pluripotency marker cell surface antigens SSEA4 and TRA1-60
106 (Fig S1B). In addition, the iPSC lines generated all three embryonic germ layers (ectoderm, endoderm

and mesoderm) in teratoma formation (Fig S1C). As shown in Figures 1A-D, basal Cr levels (0) were 4 to 8 times lower in CTD-derived iPSCs compared with control iPSCs. To confirm the reduced Cr uptake, we supplemented iPSCs with 25, 75, or 125 μM of Cr. Healthy iPSCs exhibited a dose-dependent Cr uptake (Fig 1A). However, the amount of Cr in CTD-derived iPSCs was similar at any concentration of Cr-supplemented media, further demonstrating the lack of a functional SLC6A8 (Fig 1A). These experiments clearly demonstrated that the CRT is necessary for Cr uptake into patient-derived iPSCs.

To examine the specific role of the CRT, we generated CTD-rescue iPSCs by transfecting a functional *SLC6A8* gene into the CTD patient-derived iPSCs. We used a transposon-based stable system for expressing *SLC6A8* along with green fluorescent protein (eGFP) for the selection and cloning of the transporter-expressing iPSCs (Fig S2A and B). The CTD-rescue iPSCs transported Cr from the media, even exceeding the uptake rate seen in the healthy control-derived iPSCs (Fig 1B-D).

Healthy and CTD patient-derived iPSCs were differentiated into brain organoids (Fig 1E). In agreement with our previous results, as well as those in the literature(Nassor et al., 2020; Pavoni et al., 2018), the iPSC-derived brain organoids showed an expression pattern consistent with a telencephalic regionalization (Fig 1F). When following the organoid development, there were no differences in the growth pattern or diameter of healthy and CTD brain organoids (Fig 1G). We assessed the intra and interproduction variability of the generated organoid models by comparing the size of the brain organoids in the different experiments (Fig S3) and found an intraproduction variation of 9 to 27%, and an interproduction variability of 13%.

Consistent with the iPSCs, CTD brain organoids had reduced Cr levels at basal conditions (0) and when supplemented with 75 μM Cr media (Fig 1H and I). We also used iPSCs from CTD patients stably expressing a functional SLC6A8 protein and derived brain organoids from these cells. SLC6A8 expressing brain organoids showed GFP fluorescence in the whole area of the organoid (Fig S2C). The basal Cr concentration in SLC6A8 expressing brain organoids was comparable with the organoids obtained from healthy controls. Further, media Cr supplementation increased the intracellular Cr levels in these organoids, suggesting that they have a functional SLC6A8 protein (Fig 1H and I). These

experiments demonstrated that the CTD-derived brain organoids exhibit a functional deficit in creatine uptake, and this deficiency can be overcome by the re-establishment of a functional CRT.

CTD brain organoids show dysregulation of neurogenesis

To explore the potential cell-specific changes associated with CTD pathology, we examined the expression of several neuronal and developmental markers in the brain organoids using immunohistochemistry (IHC) and real-time PCR (RT-PCR). As shown in Figure 2A, IHC identified major cellular markers both in the two months old healthy-derived and CTD-derived organoids. Brain organoids expressed markers for neural progenitor cells (SOX2 and PAX6), intermediate progenitors (β-III tubulin), immature neurons (TBR1), mature neurons (MAP2 and NeuN), and astrocytes GFAP (Fig 2A). Distinct SOX2 and PAX6 positive progenitor cells were distributed surrounding ventricle-like structures (Fig 2A). In addition, brain organoids expressed the post-synaptic marker PSD95 (Fig 2A). Although all markers were observed in both groups, there were noticeable differences in the morphology of the CTD organoids compared with the control. The expression of progenitor cell markers SOX2 and PAX6 in the healthy and CTD brain organoids showed that the ventricle-like structures were less organized and defined in the CTD brain organoids.

These morphological studies were extended by examining mRNA expression levels of specific marker genes. Consistent with the morphological alterations, CTD organoids had lower mRNA expression of the neural progenitor markers SOX2 ($0.0061<p<0.0408$) and PAX6 ($0.0001<p<0.0019$), compared with the control (Fig 2B). To determine if this led to dysregulated differentiation of progenitor cells, we quantified the mRNA expression of GABAergic (GABBR1) and glutamatergic (GRIA2) markers. We found a significant reduction in the mRNA expression of the GABAergic [GABBR1 ($p=0.0392$)] and glutamatergic markers [GRIA2 ($0.0041<p<0.0487$), as well as of vGluT1 ($0.0001<p<0.0241$)], in the CTD brain organoids, compared with controls (Fig 2B). These findings suggest that a loss of progenitor cells (SOX2+, PAX6+) leads to dysregulation of neuronal differentiation with reduction of GABAergic and glutamatergic neuron generation.

Next, we characterized the impact of loss of SOX2 and PAX6 progenitor cells on synapse formation by measuring mRNA expression levels of PSD95 and CREB in the brain organoids (Fig 2B). We found a significant down regulation of PSD95 and CREB mRNA in CTD brain organoids, as compared to the controls ($0.0011<p<0.0060$ and $p=0.0433$, respectively). Together, these results suggest that CTD brain organoids are well organized, showing the diversity of cell types but demonstrate a deficient neurogenesis. These findings are consistent with the data in a murine CTD model showing a decrease in synaptic markers associated with cognitive deficit(Ullio-Gamboa et al., 2019) as well as the reduced mRNA expression of SOX2 seen here (Fig S4).

Proteomics and Gene Set Arrangement (GSEA) analyses in healthy and CTD brain organoids shows pathways involved in neurogenesis dysregulation

For an in-depth analysis of the proteins from CTD brain organoids associated with the deficit of neurogenesis in CTD patients, we carried out label-free shotgun proteomics measurements in samples obtained from healthy and CTD brain organoids (Fig S5). High-resolution tandem mass spectrometry on the 16 biological samples generated a very large dataset comprising a total of 943,656 MS/MS spectra. A total of 32,181 peptide sequences were listed, allowing to monitor the abundance of 4219 proteins (Table S1). Following unsupervised filtering and normalization(Hachim et al., 2020; Hamoudi et al., 2010), significant changes in protein abundances between CTD-derived and healthy brain organoids were identified using a modification of the R package for ROTS(Suomi et al., 2017). A total of 2,468, 2,492, and 2,479 proteins from CTD patient organoids 1, 2, and 3, respectively, were selected as the most confident (Table S2). Reproducibility plots, PCA, volcano plots, and heatmaps generated using unsupervised hierarchical clustering, assessing the degree and quality of data separation between the different groups, are presented in Figure 3A-R. The differential expression analysis of the normalized and filtered proteins between healthy and brain organoids from CTD patients, identified 712, 658, and 597 proteins as significantly altered in brain organoids from patient 1, 2, and 3, respectively (p *value* < 0.05 and FDR ≤ 0.25) (Table S3). A total of 510 proteins were altered in all

three CTD patients compared with the healthy brain organoids, while 116, 52, and 21 proteins were found to be specifically altered only in patient 1, 2, and 3, respectively (Fig 3S-U).

To identify the enriched pathways altered in CTD brain organoids, absolute GSEA was performed on the following three pairs of conditions: Healthy (BJ) vs brain organoids from CTD patient (CTD1_4); Healthy (BJ) vs brain organoids from CTD patient (CTD2_3); Healthy (BJ) vs iPSC brain organoids from CTD patient (CTD3_7). The analysis identified that 22, 199, 10, 388, and 323 pathways derived from c2, c3, c4, c5, and c7, respectively, are significantly enriched in BJ vs CTD1_4; 32, 199, 8, 416, and 498 pathways derived from c2, c3, c4, c5, and c7 are significantly enriched in BJ vs CTD2_3; and 26, 182, 8, 474, and 541 pathways derived from c2, c3, c4, c5, and c7 are significantly enriched in BJ vs CTD3_7. An example of representation of the output from the GSEA for each gene set is shown in Figure 4. For each significant pathway, enriched protein were identified and their recurrence or frequency in other pathways among all studied proteins was searched. Proteins frequency can be defined as the number of times a protein occurs across all the enriched components from the significantly enriched pathways. The proteins with the highest frequency across the multiple significant pathways using the 90-percentile as cut-off were selected. This frequency analysis identified 142 differentially abundant proteins occurring frequently across all enriched pathways (Table 1).

Stepwise regression statistical modeling identified GSK3β and SRC cascade signaling associated with CTD brain organoids

GSEA and frequency analysis (90-percentile cut-off) identified 142 differentially abundant proteins occurring frequently across all enriched pathways (Table 1). A heatmap showing the abundance levels of the 142 proteins in the top 90 percentile is represented in Figure 5A. To further reduce the set of available proteins, the 142 proteins identified from the GSEA and the frequency analysis were sorted according to fold change; the most abundant proteins with fold change (-3<fold change>+3) (48 proteins) and detected with at least 10 MS/MS spectra (32 proteins) were retained (Table S4). A heatmap showing the relative abundance of the 32 selected proteins is represented in Figure 5B. Among the 32 proteins highlighted, 20 proteins are upregulated in CTD vs healthy brain organoids, and 12 proteins are downregulated.

An ENRICHR analysis was then performed on these selected proteins to identify those potentially related to the clinical features of CTD patients (Table S5). The ENRICHR analysis on the 32 selected proteins revealed that the GSK3β and SRC cascade signaling has the highest frequency (Table S5). Noteworthily, 21 proteins are related to autism spectrum disorders (e.g. PAK2), intellectual disability (e.g. PAK1), neurodevelopmental disorders (e.g. GSK3β) and epileptic encephalopathies (e.g. MAP1B) (Table S6).

The interplay between GSK3β cascade and neurogenesis deficit in CTD brain organoids

The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) webtool was used to further examine the significant enrichments of protein-protein interactions and establish pathways involved in CTD pathophysiology. The connections between the top proteins involved in the clinical features of CTD patients are shown in Figure 5C. We focused on GSK3β pathway because this key kinase is implicated in many cellular processes such as neurogenesis(Hur and Zhou, 2010; Kim et al., 2009). Ser9 phosphorylation in GSK3β is known to inhibit the kinase activity. We systematically analyzed the level of inactive kinase by immunoblot with a specific antibody. There was a significant reduction in Ser9-phosphorylation in GSK3β in CTD brain organoids compared with healthy brain organoids ($0.0034<p<0.0426$) (Fig 6A and B) as well as a significant reduction in SOX2 abundance in the same CTD brain organoids ($p=0.0146$) (Fig 6C and D). Moreover, we confirmed the increased abundance of two proteins highlighted by proteomics analysis, PAK1 ($p=0.0034$) and MAP1B ($p=0.0331$), with an additional healthy cell line (SP) and new productions of CTD brain organoids (Fig 6E-H). PAK1 and MAP1B abundance ($p=0.0173$) were decreased in the *SLC6A8*-expressing CTD-derived organoids (Fig 6E-H), while Ser9-phosphorylation in GSK3β and SOX2 abundance ($0.0003<p<0.0072$) were increased (Fig 6I-L). This suggest that these changes are mediated through the loss of the functional transporter and pointed out the major role of Cr in the regulation of cerebral proteins in CTD brain organoids.

Discussion

The aim of this study was to establish a new translational model for CTD to better characterize the pathophysiology of this disease. We generated brain organoids derived from iPSCs of CTD patients. As predicted, the iPSCs and brain organoids from CTD patients were not able to transport Cr into the cells from the media. The iPSC-derived CTD brain organoids showed similar size and cell type diversity to those obtained from healthy donors, however, they showed decreased expression of neurogenesis-related markers. Normal brain organoids are composed of mature and developing neurons, as well as astrocytes(Lancaster et al., 2013; Nassor et al., 2020; Pavoni et al., 2018). The organoids derived from CTD patients show a similar composition with neural progenitor cells located in ventricle-like structures marked by SOX2 and PAX6, and immature and mature neurons marked by TBR1 and NeuN that have migrated from the ventricles. The transcription factors (SOX2 and PAX6) are critical regulators of neuronal stem cell differentiation and proliferation, ensuring the successful process of neurogenesis(Cimadamore et al., 2013; Manuel et al., 2015). SOX2 mutations are associated with intellectual disabilities(Dennert et al., 2017), seizures and defective hippocampal development(Mercurio et al., 2021).

In addition to the decreased expression of the progenitor markers, we show that CTD-derived organoids have reduced expression of GABAergic (GABBR1), glutamatergic (GRIA2) and postsynaptic (PSD95) markers, suggesting a reduction in synaptogenesis. This is in agreement with our findings in *Slc6a8* knockout (*Slc6a8*$^{-/y}$) mice that showed reduced mRNA expression of PSD95 and CREB(Ullio-Gamboa et al., 2019). Reduced cortical spine density and reductions in protein levels of several synaptic markers have been observed in the brains of *Slc6a8*$^{-/y}$ mice and rats (Chen et al., 2021; Duran-Trio et al., 2022). Thus our CTD brain organoid model recapitulates the altered neurogenesis seen in murine CTD models and this impaired neurogenesis may lead to the cognitive deficits in CTD. Udobi *et al* showed that developmental deletion of the *Slc6a8* gene in mice is necessary to gain the same cognitive deficits seen in the constitutive *Slc6a8*$^{-/y}$ mice, providing further evidence for the importance of Cr in brain development(Udobi et al., 2019). Our findings are in agreement with previous observations in Down syndrome, showing the defect in neurogenesis and consequently the diminished proliferation and decreased expression of layer II and IV markers in cortical neurons in the subcortical regions(Tang et al., 2021).

We performed proteomic analysis to identify proteins and molecular pathways that may be disrupted in CTD. Organoids from CTD patients showed altered expression of several proteins compared with normal brain organoids. We highlighted 32 proteins with altered abundance in comparison with healthy brain organoids. Among these 32 proteins, 21 proteins have already been related to autism spectrum disorders, intellectual disability, neurodevelopmental disorders, and epileptic encephalopathies (Table S6). These altered, relevant protein expression patterns indicate that CTD brain organoids may appropriately reflect the molecular physiopathology of the patients. We used a stepwise regression statistical model and ENRICHR analysis to reveal that two key pathways, GSK3β and SRC, were altered in CTD brain organoids. The search tool for the retrieval of interacting genes (STRING) web tool confirmed that the two pathways were associated to the most abundant proteins involved in neurodevelopmental disorders.

Next, we performed a functional study on the relationship between GSK3β and neurogenesis deficit in CTD organoids. GSK3β is a constitutively active key kinase, negatively regulated by phosphorylation at Ser9(Hur and Zhou, 2010). GSK3, having a broad range of substrates, regulates a wide spectrum of cellular processes, including neurogenesis, neuronal polarization, and axon growth during brain development(Hur and Zhou, 2010). This regulation occurs either by direct action or through transcriptional modulations. As an example, active GSK3β directly modulates microtubule dynamics by phosphorylating microtubule-associated proteins (MAPs)(Rippin and Eldar-Finkelman, 2021), such as MAP1B which was highlighted in our proteomic analysis. MAP1B in turn participates in the regulation of the structure and physiology of dendritic spines in glutamatergic synapses(Tortosa et al., 2011). GSK3β can also modulate gene expression by controlling the level, nuclear localization and the DNA binding of transcription factors, thus indirectly regulating neurogenesis(Hur and Zhou, 2010). As an example, the cAMP response element-binding protein (CREB) is a substrate of GSK3(Hur and Zhou, 2010). Thus, the overactivation of GSK3β in CTD brain organoids is consistent with our observations in a CTD mouse model, where we showed that CREB was downregulated at the transcriptional level(Ullio-Gamboa et al., 2019). Numerous studies have shown that modulation of GSK3β activity can regulate neural progenitor homeostasis(Dohare et al., 2019; Guyot et al., 2020; Hur and Zhou, 2010; Jurado-Arjona et al., 2016; Kim et al., 2009) and GSK3 is also implicated in energy homeostasis,

apoptosis and autophagy, as well as in interactions with neurodegeneration-linked proteins(Hernandez et al., 2013).

The overactivation of GSK3β in our CTD brain organoids was associated with a decreased level of neural progenitor and synaptic markers as compared to the normal organoids. We document here that this phenotype is rescued by the re-establishment of a functional SLC6A8 transporter, restoring Cr uptake in the CTD brain organoids. The introduction of a functional Cr transporter in the CTD-rescue organoids leads to a reduction of GSK3β activation, a restoration of the SOX2 progenitor marker level, as well as of the highlighted proteins link to intellectual disabilities such as PAK1 and MAP1B. Alterations in GSK3 activity have been associated with many neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, and neurodevelopmental diseases such as autism spectrum disorders(Hernandez et al., 2013; Rizk et al., 2021). Although the link between creatine level and GSK3β activation needs to be further examined, modulation of GSK3β activity may represent an interesting target for the treatment of this devastating intellectual disability disease.

In summary, our iPSC-derived brain organoid model recapitulate the key features of the neurodevelopmental deficits observed in CTD patients. We examined morphological and mRNA expression alterations potentially connected to the pathology of CTD. The extensive proteomics analysis pointed out 32 proteins linked to the GSK3β and SRC cascades and 21 proteins potentially associated with the clinical features of CTD patients. Using targeted molecular methodologies, we demonstrated that the altered GSK3β pathway most likely has a significant role in the mechanisms leading to a defective neurogenesis in the CTD brain organoids. The main findings of our study in CTD brain organoids are schematically summarized in Figure 7. We suggest that the human cellular organoid model presented here helps to understand the pathogenesis of CTD, and particularly the impact of the decreased creatine uptake into the brain on the regulation of proteins associated with the clinical features of CTD patients. Analysis of protein expression expand the knowledge about the consequences of CRT deletion and the effects of Cr replenishment, revealing new information on the molecular mechanism underlying the onset of CTD phenotype. We provide a database of the cell-specific alterations in molecular pathways of translational value relevant for treatment design. We believe that this new model of CTD patient-derived brain organoids represents an important

translatable tool to examine potential treatment modalities. We generated CTD brain organoids from three families. As all patients' mutations in this study are a deletion of one amino acid, it could be interesting to generate CTD brain organoids from cells with other types of mutations to evaluate their impact on the CTD pathophysiology.

Materials and Methods

Derivation of patient's fibroblasts

BJ primary fibroblasts were obtained from ATCC (CRL-2522). SP fibroblasts were isolated from normal placenta according to the protocol study approved by the local ethics committee (Advisory Committee for the Protection of Persons in Biomedical Research Cochin Hospital, Paris, n°18-05). Human fibroblasts from CTD patients, were obtained from skin biopsy specimens and were 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 were studied. Informed and a written consent was obtained from all anonymized human CTD subjects, and experiments were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All the mutations were previously described by Valayannopoulos *et al*(Valayannopoulos et al., 2013):

- Patient 1: c1006_1008delAAC (pAsn336del): 9 years old showing mild mental retardation, speech delay, learning difficulties, mild behavioral impairment and facial hypotonia.
- Patient 2: c1497_1500delGAG (pGly499del): 10 years old showing mild psychomotor retardation, speech delay, seizures, impulsivity, facial and trunk hypotonia.
- Patient 3: c1221_1223delTTC (pGly414del): 3 years old showing no speech, autistic behavior with hyperactivity and emotional instability.

After 1-2 weeks, fibroblasts outgrowths from the explants were passaged and maintained as described previously(Trotier-Faurion et al., 2015) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% inactivated foetal bovine serum (FBS, Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin/neomycin (PSN, Life Technologies), 1% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), and 1% L-glutamine (Life Technologies).

iPSC generation and characterization

Reprogramming. Fibroblasts were reprogrammed using the Sendai virus reprogramming method as recommended by the manufacturer (Life Technologies). Briefly, fibroblasts were infected using SeV vectors encoding OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC on day 0. Two days later, cells were trypsinized and picked up onto two 10-cm gelatin-coated culture dishes that had been seeded with irradiated

mouse embryonic fibroblasts (irrMEFs, GlobalStem). The cultures were maintained in human embryonic stem cell (hESC) medium containing DMEM/F12 (Gibco), 20% KnockOut Serum Replacement (Gibco), 1% minimum essential medium (MEM) nonessential amino acid (Gibco), 1 mM l-glutamine (Gibco), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and 10 ng/mL of basic fibroblast growth factor (bFGF, STEMCELL technologies). Clones were picked starting on 20 days post infection and expanded on irrMEFs before being adapted to feeder-free conditions.

hiPSC Culturing. All iPSCs cell lines were maintained on hESC-qualified Matrigel (Corning) in mTeSR^{TM}1 medium (STEMCELL Technologies) and passaged using mechanical dissociation at the beginning of the establishment of the cell line. Then cells were passaged using ReLeSR^{TM} (STEMCELL Technologies).

Teratoma Formation. To examine the developmental potential of reprogrammed clones *in vivo*, iPSCs grown on feeder free system were collected by dispase treatment and injected into hind limb muscle of 8-week-old immunodeficient NOD-scid IL2rγnull (NSG) mice (approximately 1×6-well plate at 70% confluence for each injection). After five to ten weeks, teratomas were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde. Samples were embedded in paraffin and processed with hematoxylin and eosin staining. All studies were done with compliance with animal welfare regulations.

Assessment of Pluripotency. The pluripotency characteristics of iPSC was demonstrated (i) by assessing the presence of pluripotency marker (OCT4, SOX2, NANOG) by RT-PCR (see methods below) and (ii) by measuring the expression of pluripotency surface antigen (SSEA4 1:20, Invitrogen, 12-8843-42, and TRA1-60 1:20, Invitrogen, 12-8863-82) by flow cytometry. iPSCs were harvested by accumax treatment for 5 min until the cells detach. Cells were then fixed in paraformaldehyde 4% for 8 min. After two PBS1X washes, cells were blocked with 10% of goat serum in PBS1X (10%PBSG) for 20 min at room temperature. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 10%PBSG. IgG controls (1:20, Invitrogen, 12-4742-42) were used at the same concentration. Cells were then washed twice with PBS1X-5%SVF and resuspended in FACS Flow for analysis on a BD FACSCalibur flow cytometer.

Generation of iPS cells stably expressing SLC6A8

388 The full length *SLC6A8* cDNA was purchased from Addgene (pDONR221_SLC6A8, #131915) and
389 cloned into an eGFP containing Sleeping Beauty transposon vector (p10-CAG-SLC6A8-IRES2-eGFP), where the
390 SLC6A8 and eGFP were connected by an IRES2 sequence, providing simultaneous, but independent
391 expression of the two proteins.
392 The p10-CAG-SLC6A8-IRES2-eGFP vector was electroporated together with the SB 100X
393 transposase(Mátés et al., 2009) into control and disease related iPSC lines in Amaxa® 4D-
394 Nucleofector® using P4 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit (Lonza) with the CM133 program. After 7
395 days of transfection each clone was sorted based on the GFP fluorescence using BD FACSAria™ Cell
396 Sorter then plated onto Matrigel®-coated plates (Corning), in mTeSR1 (Stem Cell Technologies)
397 medium containing 10 µM Y27632-2HCl (Selleckchem). Stabilized SLC6A8 and eGFP expressing
398 clones were expanded and screened for GFP expression and for pluripotency by measuring SSEA4-
399 APC expression by flow cytometry. The cells were labeled with anti-human SSEA-4 APC-conjugated
400 antibody (1:100, R&D Systems) at 37°C for 30 minutes. Propidium iodide (ThermoFisher Scientific)
401 staining was employed for gating out the positively labelled dead cells. A control measurement with
402 isotype-matched control (1:100, R&D Systems) was included. For selecting clones of SLC6A8 and
403 eGFP expressing iPSC lines, single cell suspensions were prepared using Accutase and then the GFP
404 expressing single cells were plated in Matrigel®-coated 96-well plates in mTeSR1 medium containing
405 10 µM Y27632-2HCl, using BD FACSAria™ Cell Sorter. The clones were expanded in mTeSR1
406 medium. Surviving clones used for further experiments were selected based on pluripotent morphology
407 and bright GFP fluorescence.
408

409 **Brain organoid generation and culture**

410 We followed the protocol published by Lancaster & Knoblich with minor modifications from Pavoni *et al*
411 and Nassor *et al*(Lancaster and Knoblich, 2014; Nassor et al., 2020; Pavoni et al., 2018). At day 0,
412 iPSCs were dissociated and counted. Hanging drops of 20 µl of embryoid body medium containing
413 15000 cells per drop were cultured on a Petri dish cover to allow them to aggregate before being
414 collected and placed in a well of a non-treated 24-well plate (Sarstedt). Media changes, neural
415 induction and neural differentiation were performed following the published protocol(Lancaster and

Knoblich, 2014; Nassor et al., 2020; Pavoni et al., 2018) with the use of an organoid embedding sheet for the matrigel embedding step (STEMCELL Technologies). Brain organoids were used at 2 months-old.

Creatine uptake and quantification

iPSCs were passaged using accumax (Sigma) and seeded at 300,000 cells/well in a 6-well plate. When iPSC reached confluence, they were incubated with or without Cr-supplemented medium for 1h, then harvested using accumax. Cr levels were quantified using Cr quantification kit (Sigma, MAK079), either the colorimetric or fluorometric version of the kit. For the colorimetric test, absorbance was measured at 570 nm with a BioTek Epoch microplate spectrophotometer (Agilent Technologies). For the fluorometric test, fluorescence intensity (λex = 535nm, λem = 587 nm) was measured with a SpectraMax M5 Multimode Plate Reader (Molecular Devices).Brain organoids were incubated with or without Cr-supplemented medium for 6h. Cr levels were quantified using the same method as for iPSCs, with the exception of lysis for which Precellys Evolution tissue homogenizer (Bertin) was used. Cr levels in samples were normalized by total protein quantification (Bradford assay).

Immunofluorescence

Brain organoids were fixed in 4% paraformaldehyde for 45 min. After two washes in PBS, organoids were moved to 30% sucrose solution overnight at 4°C. Organoids were then embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound and flash frozen at -80°C. Sections (20 µm) were cut with a cryostat (HM560 Microm Microtech). After permeabilisation with 0.3% Triton and blocking with 2% goat serum (Gibco, 16210064) and 1% bovine serum albumin (BSA), sections were incubated for 1h with the following primary antibodies: SOX2 1:100 (Abcam, ab93689), PAX6 1:100 (Sigma-Aldrich, AMAb91372), βIII-tubulin 1:500 (Sigma-Aldrich, T8578), TBR1 1:100 (Abcam, ab31940), PSD95 1:500 (Sigma-Aldrich, MABN68), NeuN 1:100 (Sigma-Aldrich, MAB377), MAP2 1:100 (Sigma-Aldrich, ZRB2290), GFAP 1:200 (Sigma-Aldrich, G3893). After PBS washes, DAPI (100-1000 ng/ml) and secondary antibodies labelled with Alexa Fluor 488 or 594 1:500 (Invitrogen, #A-11037, #A-11029) were incubated for 1h. Slides were mounted using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma

Aldrich). Images were acquired using a microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss), Objective 10X, and analysed using Fiji software.

RNA extraction, RT-PCR

Total RNA was isolated from brain organoids with RNeasy Plus Universal Tissue Mini kit (Qiagen) and Precellys Evolution tissue homogenizer (Bertin). The concentration and purity of RNA samples were checked using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer at 260 and 280 nm (NanoDrop Technologies); the A260/280 ratio ranged from 1.8 to 2.2. One µg of total RNA was converted to cDNA using random primers in a volume of 20 µl using an RT2 HT first stand kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. cDNA was diluted with sterile water to a final volume of 200 µL. Quantitative expression of markers were determined using 2 µl of diluted cDNA for each primer (Table S7) set at 10 µM using iQ SYBR Green Supermix (Biorad) in a final volume of 12 µl. Thermocycling was carried out in CFX96 RT-PCR detection system (Bio-Rad) using SYBR green fluorescence detection. The amplification cycle used was as follows: 10 min at 95 °C, followed by 40 amplification cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s and 72 °C for 30 s to reinitialize the cycle again. The specificity of each reaction was also assessed by melting curve analysis to ensure primer specificity. Relative gene expression values were calculated as $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is the difference between the cycle threshold (CT) values for genes of interest and housekeeping gene (GAPDH).

Proteolysis and mass spectrometry analysis

Total pelleted cell material was supplemented with lithium dodecyl sulfate lysis buffer (Invitrogen) following the ratio of 25 µl of buffer per mg of material. Glass and silica beads (200 mg) were added to each sample, which was then subjected to 10 cycles of bead beating at 10,000 rpm for 30 sec followed by 30 sec halt with a Precellys device (Bertin technologies) as previously described(Hayoun et al., 2019). The supernatants were transferred to a new tube and incubated at 99°C for 5 min. A volume of 20 µl of each sample was loaded on a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel. Then, the proteins were separated by a short electrophoresis migration (5 min) at 200 V on with MES/SDS 1X (Invitrogen) as running buffer. Gels were stained for 5 min with SimplyBlue SafeStain (Thermo) and then washed overnight

with water with gentle agitation. The polyacrylamide band containing the whole proteome from each sample was excised, treated, and proteolyzed with trypsin as recommended(Rubiano-Labrador et al., 2014). Peptides (300 ng) were analyzed by liquid chromatography−tandem mass spectrometry (LC−MS/MS) using an Ultimate 3000 nano-LC system coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific) operated essentially as described previously(Klein et al., 2016) Peptides were eluted from the reverse phase chromatography column for 90 min with an acetonitrile gradient and the mass spectrometer was operated in Top20 mode, with a 10 s dynamic exclusion time for the analysis of fragmented peptides.

MS/MS spectra interpretation and differential proteomics. MS/MS spectra were assigned using the Mascot software version 2.6.1 (Matrix Science) and the *Homo sapiens* SwissProt database. The maximum of missed cleavages, primary ions tolerance, and secondary ions tolerance were set at 2, 5 ppm, and 0.02 Da, respectively. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine were considered as fixed and variable modification, respectively. Peptides were identified at a p-value below 0.05 and proteins were selected when at least two distinct peptides were identified (false discovery rate below 1%). Mass spectrometry proteomics data corresponding to the 16 nanoLC-MS/MS runs are available from the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (https://www.ebi.ac.uk/pride/) under dataset identifiers PXD040185 and 10.6019/PXD040185.

Bioinformatics analysis of proteomic data

Raw data normalization and filtering

To identify the proteins differentially abundant between healthy and IPSC-CTD derived brain organoids, raw proteomic data were normalized and filtered using an in-house script constructed using R programming language. Briefly, the Variance Stabilizing Normalization (VSN)(Motakis et al., 2006) was applied to normalize the data and remove the background noise. An unsupervised variation filter was then applied where any four samples with MS/MS spectral count detected were included(Hamoudi et al., 2010).

Proteomics data analysis to identify the list of differentially expressed proteins between healthy and CTD brain organoids

The differential expression analysis of the proteins between healthy and CTD brain organoids was carried out using modification of the R package for Reproducibility-Optimized Test Statistic (ROTS) to eliminate the bias in the data(Suomi et al., 2017). Differential expression was assessed between the following three pairs of conditions: Healthy (BJ) vs brain organoids from CTD patient (CTD1_4); Healthy (BJ) vs brain organoids from CTD patient (CTD2_3); Healthy (BJ) vs brain organoid from CTD patient (CTD3_7). The data was sorted according to *p value* based on Fold Discovery Rate (FDR). The differentially expressed proteins were selected by $p\ value < 0.05$ and FDR ≤ 0.25. The quality of the data separation between the various groups was assessed using Reproducibility plots and Principal Component Analysis (PCA). The identified differentially expressed proteins were visualized using volcano plots and heatmaps. The heatmaps were generated using unsupervised hierarchical clustering carried out with Ward linkage and Euclidean distance measure to assess the degree of proteomic profile separation between the different groups. The flowchart of the entire bioinformatics analysis workflow is shown in Figure S5.

Pathways analysis using Absolute Gene Set Enrichment Analysis

Absolute Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was adapted to identify the cellular activated pathways using enriched proteins in CTD brain organoids compared to healthy brain organoids. The GSEA was carried out as described in Hamoudi *et al* and Harati *et al*(Hamoudi et al., 2010; Harati et al., 2021) searching through more than 10,000 different cellular pathways obtained across well-annoted gene sets (c2_cp; c3_tft; c4_cgn; c5_bp; c5_mf; c7) obtained from the Broad's Institute database (https://www.gsea-msigdb.org). The pathways identified through the GSEA were sorted according to the nominal *p value* (< 0.05) as previously described(Hamoudi et al., 2010; Subramanian et al., 2005). The significantly enriched pathways in CTD brain organoids in comparison with health organoids were selected based on $p\ value < 0.05$. The list of enriched genes was then identified for each significant pathways and their recurrence in other pathways among all studied gene sets was searched as previously described(Hamoudi et al., 2010; Harati et al., 2021). The genes with the highest frequency

across the multiple significant pathways (top 90-percentile cut-off; a total of 142 proteins) were selected for subsequent analysis.

Identification of key proteins associated with key features of CTD patients

The GSEA and frequency analysis (top 90-percentile cut-off) identified 142 differentially expressed proteins occurring frequently across all enriched pathways. To further reduce the set of available proteins, the most abundant proteins with spectral count higher than 10 were selected, and the fold change CTD brain organoids in comparison with healthy brain organoids was determined. Proteins with fold change ≥ 3 were considered as upregulated and fold change ≤ -3 as downregulated. This abundance and fold change analysis identified 32 abundant proteins as significantly up- or downregulated in CTD brain organoids in comparison with health organoids and in potential relation with cognitive functions. In order to identify potential functions of the differentially expressed proteins, the 32 proteins significantly altered in CTD brain organoids in comparison with health organoids were subjected to a disease-related pathway analysis carried out using Enrichr followed by a frequency analysis(Chen et al., 2013; Kuleshov et al., 2016) focusing on the following sets : BioCarta_2016, Elsevier_Pathway_Collection, GO_Biological_Process_2021, GO_Molecular_Function_2021, KEGG_2021_Human, MSigDB_Hallmark_2020, WikiPathways_2021_Human, ClinVar_2019, DisGeNET, Jensen_DISEASES, OMIM_Disease. Relevant pathways are selected based on a $p < 0.05$ cut-off.

Statistical analysis of the differentially abundant proteomics data

In order to identify the patterns of differentially abundant proteins, the data identified by ENRICHR analysis was used to construct a multivariate statistical model using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons between the healthy and CTD brain organoids.

Western blotting

Western blotting was used to detect the abundance of GSK3β, pSer9-GSK3β, SOX2, PAK1 and MAP1B. Briefly, brain organoids were homogenized in freshly prepared lysis buffer of TBS 1X (Biorad)

supplemented with 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail 1X (cOmplete, Roche) and a mix of anti-phosphatase inhibitors 1X (ammonium molybdate, sodium glycerophosphate, sodium fluoride, sodium pyrophosphate, sodium orthovanadate) using a Precellys Evolution tissue homogenizer (Bertin). The samples were then centrifuged at 10000g for 20 min to produce lysate for electrophoresis. 10 µg of proteins in Laemmli buffer and protein standard were loaded on 4%-15% Criterion TGX Stain-Free protein gel in running buffer TGS 1X (all from Bio-Rad) and transferred to a 0.2 µm PVDF membrane with the Trans-Blot Turbo RTA Midi Transfer Kit (Bio-Rad). Membranes were blocked for 30 min in 5% low-fat milk in TBS-Tween 20 0.1% at room temperature. Blots were probed overnight at 4°C with the following specific primary antibodies: GSK3β 1:1000 (Cell Signaling, #9336), pSer9-GSK3β 1:500 (BD Biosciences, 610201), SOX2 1:200 (Abcam, ab93689), PAK1 1:1000 (Cell signaling, #2602), MAP1B 1:1000 (Sigma-Aldrich, M4525), and α-tubulin 1:4000 (Sigma-Aldrich, T6199). Primary antibodies were detected by horseradish peroxidase secondary antibodies diluted 1:10000 in 5% low-fat milk in TBS-Tween 20 0.1% at room temperature. For protein detection, membranes were exposed to the Immobilon Crescendo or Forte Western HRP substrate (Millipore) in a chemidoc touch imaging system for a measurable exposure time (Bio-Rad) and quantified with Image Lab Software (Bio-Rad).

Statistics

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 9.3 program. Experimental comparisons with multiple groups were analyzed using one-way ANOVA with the Tukey's or Dunnett's multiple comparison test for post hoc analysis. For comparison of two groups, two-tailed Student's test was performed. A p-value of 0.05 or less was considered significant.

577 **Author contributions**

578 AM was responsible for project administration, conceptualization, funding acquisition and writing of the
579 manuscript. LBB conducted iPSCs differentiation and brain organoid studies. RaH and RiH conducted
580 mathematical and statistical modeling of the proteomics data as well as bioinformatics analysis. JA
581 designed and conducted the proteomic experiments. FY and LM conducted reprogramming of
582 fibroblasts into iPSCs. NC conducted RT-PCR. AuM, LBB and RGB conducted WB and
583 immunohistochemistry studies. BS, AA and OM conducted rescue iPSCs genesis experiment. ACG
584 conducted brain organoid culture. MS conducted *in vivo* experiments.
585 MS, LBB, JA, RiH, CD, BS, AA participated in the writing and review of the manuscript. All authors
586 contributed to the article and approved the submitted version.
587

588 **Acknowledgements**

589 This study was supported by the association Xtraordinaire and the Association for Creatine
590 Deficiencies (ACD) as well as the CEA. The authors thank Mélodie Kielbasa, Guylaine Miotello, and
591 Jean-Charles Gaillard (CEA) for their expert help with proteomic sample preparation and tandem
592 mass spectrometry. The authors thank Iris Lemeunier (CEA) and Rafika Jarray (Sup'Biotech) for
593 preliminary experiment on CTD iPSC, and Elisa Bardou (CEA) for imaging. We are grateful to the
594 patients included in this study.
595

596
597 **Conflict of interest**
598
599 The authors declare that they have no conflict of interest.
600

601 **Data availability**

602 Mass spectrometry proteomics data corresponding to the 16 nanoLC-MS/MS runs were deposited at
603 the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (https://www.ebi.ac.uk/pride/)
604 under dataset identifiers PXD040185 and 10.6019/PXD040185.
605

606 Additional information

607 Mass spectrometry & proteomics data: The reviewers may access this currently private dataset using

608 https://www.ebi.ac.uk/pride/ website with reviewer_pxd040185@ebi.ac.uk as the username and

609 X8XHkHZV as password.

610

611

612 **References**

613

614 Baroncelli L, Alessandrì MG, Tola J, Putignano E, Migliore M, Amendola E, Gross C, Leuzzi V, Cioni G,
615 Pizzorusso T. 2014. A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Res* **3**:228.
616 doi:10.12688/f1000research.5369.1
617 Bruun TUJ, Sidky S, Bandeira AO, Debray F-G, Ficicioglu C, Goldstein J, Joost K, Koeberl DD, Luísa
618 D, Nassogne M-C, O'Sullivan S, Õunap K, Schulze A, van Maldergem L, Salomons GS,
619 Mercimek-Andrews S. 2018. Treatment outcome of creatine transporter deficiency: international
620 retrospective cohort study. *Metab Brain Dis* **33**:875–884. doi:10.1007/s11011-018-0197-3
621 Cecil KM, Salomons GS, Ball WS, Wong B, Chuck G, Verhoeven NM, Jakobs C, DeGrauw TJ. 2001.
622 Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine
623 transporter defect? *Ann Neurol* **49**:401–404. doi:10.1002/ana.79
624 Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A. 2013. Enrichr:
625 interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*
626 **14**:128. doi:10.1186/1471-2105-14-128
627 Chen H-R, Zhang-Brotzge X, Morozov YM, Li Y, Wang S, Zhang HH, Kuan IS, Fugate EM, Mao H, Sun
628 Y-Y, Rakic P, Lindquist DM, DeGrauw T, Kuan C-Y. 2021. Creatine transporter deficiency
629 impairs stress adaptation and brain energetics homeostasis. *JCI Insight* **6**:e140173.
630 doi:10.1172/jci.insight.140173
631 Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang C-T, Terskikh AV. 2013. SOX2-LIN28/let-7 pathway
632 regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*
633 **110**:E3017-3026. doi:10.1073/pnas.1220176110
634 Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE, Salomons
635 GS. 2006. X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental
636 retardation of unknown etiology. *Hum Genet* **119**:604–610. doi:10.1007/s00439-006-0162-9
637 deGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C. 2003. The clinical syndrome of
638 creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* **244**:45–48.
639 Dennert N, Engels H, Cremer K, Becker J, Wohlleber E, Albrecht B, Ehret JK, Lüdecke H-J, Suri M,
640 Carignani G, Renieri A, Kukuk GM, Wieland T, Andrieux J, Strom TM, Wieczorek D, Dieux-
641 Coëslier A, Zink AM. 2017. De novo microdeletions and point mutations affecting SOX2 in three
642 individuals with intellectual disability but without major eye malformations. *Am J Med Genet A*
643 **173**:435–443. doi:10.1002/ajmg.a.38034
644 Dohare P, Kidwai A, Kaur J, Singla P, Krishna S, Klebe D, Zhang X, Hevner R, Ballabh P. 2019.
645 GSK3β Inhibition Restores Impaired Neurogenesis in Preterm Neonates With Intraventricular
646 Hemorrhage. *Cereb Cortex* **29**:3482–3495. doi:10.1093/cercor/bhy217
647 Duran-Trio L, Fernandes-Pires G, Grosse J, Soro-Arnaiz I, Roux-Petronelli C, Binz P-A, De Bock K,
648 Cudalbu C, Sandi C, Braissant O. 2022. Creatine transporter-deficient rat model shows motor
649 dysfunction, cerebellar alterations, and muscle creatine deficiency without muscle atrophy. *J*
650 *Inherit Metab Dis* **45**:278–291. doi:10.1002/jimd.12470
651 Duran-Trio L, Fernandes-Pires G, Simicic D, Grosse J, Roux-Petronelli C, Bruce SJ, Binz P-A, Sandi
652 C, Cudalbu C, Braissant O. 2021. A new rat model of creatine transporter deficiency reveals
653 behavioral disorder and altered brain metabolism. *Sci Rep* **11**:1636. doi:10.1038/s41598-020-
654 80824-x

655 Farr CV, El-Kasaby A, Freissmuth M, Sucic S. 2020. The Creatine Transporter Unfolded: A Knotty
656 Premise in the Cerebral Creatine Deficiency Syndrome. *Front Synaptic Neurosci* **12**:588954.
657 doi:10.3389/fnsyn.2020.588954
658 Fernandes-Pires G, Braissant O. 2022. Current and potential new treatment strategies for creatine
659 deficiency syndromes. *Mol Genet Metab* **135**:15–26. doi:10.1016/j.ymgme.2021.12.005
660 Guyot A-C, Leuxe C, Disdier C, Oumata N, Costa N, Roux GL, Varela PF, Duchon A, Charbonnier JB,
661 Herault Y, Pavoni S, Galons H, Andriambeloson E, Wagner S, Meijer L, Lund AK, Mabondzo A.
662 2020. A Small Compound Targeting Prohibitin with Potential Interest for Cognitive Deficit
663 Rescue in Aging mice and Tau Pathology Treatment. *Sci Rep* **10**:1143. doi:10.1038/s41598-
664 020-57560-3
665 Hachim MY, Hachim IY, Talaat IM, Yakout NM, Hamoudi R. 2020. M1 Polarization Markers Are
666 Upregulated in Basal-Like Breast Cancer Molecular Subtype and Associated With Favorable
667 Patient Outcome. *Front Immunol* **11**:560074. doi:10.3389/fimmu.2020.560074
668 Hamoudi RA, Appert A, Ye H, Ruskone-Fourmestraux A, Streubel B, Chott A, Raderer M, Gong L,
669 Wlodarska I, De Wolf-Peeters C, MacLennan KA, de Leval L, Isaacson PG, Du M-Q. 2010.
670 Differential expression of NF-kappaB target genes in MALT lymphoma with and without
671 chromosome translocation: insights into molecular mechanism. *Leukemia* **24**:1487–1497.
672 doi:10.1038/leu.2010.118
673 Harati R, Vandamme M, Blanchet B, Bardin C, Praz F, Hamoudi RA, Desbois-Mouthon C. 2021. Drug-
674 Drug Interaction between Metformin and Sorafenib Alters Antitumor Effect in Hepatocellular
675 Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol* **100**:32–45. doi:10.1124/molpharm.120.000223
676 Hayoun K, Gouveia D, Grenga L, Pible O, Armengaud J, Alpha-Bazin B. 2019. Evaluation of Sample
677 Preparation Methods for Fast Proteotyping of Microorganisms by Tandem Mass Spectrometry.
678 *Front Microbiol* **10**:1985. doi:10.3389/fmicb.2019.01985
679 Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. 2013. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease.
680 *J Alzheimers Dis* **33 Suppl 1**:S141-144. doi:10.3233/JAD-2012-129025
681 Hur E-M, Zhou F-Q. 2010. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* **11**:539–551.
682 doi:10.1038/nrn2870
683 Jurado-Arjona J, Llorens-Martín M, Ávila J, Hernández F. 2016. GSK3β Overexpression in Dentate
684 Gyrus Neural Precursor Cells Expands the Progenitor Pool and Enhances Memory Skills. *J Biol*
685 *Chem* **291**:8199–8213. doi:10.1074/jbc.M115.674531
686 Kim W-Y, Wang X, Wu Y, Doble BW, Patel S, Woodgett JR, Snider WD. 2009. GSK-3 is a master
687 regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci* **12**:1390–1397. doi:10.1038/nn.2408
688 Klein G, Mathé C, Biola-Clier M, Devineau S, Drouineau E, Hatem E, Marichal L, Alonso B, Gaillard J-
689 C, Lagniel G, Armengaud J, Carrière M, Chédin S, Boulard Y, Pin S, Renault J-P, Aude J-C,
690 Labarre J. 2016. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts.
691 *Nanotoxicology* **10**:1555–1564. doi:10.1080/17435390.2016.1244299
692 Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL,
693 Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. 2016.
694 Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids*
695 *Res* **44**:W90-97. doi:10.1093/nar/gkw377
696 Lancaster MA, Knoblich JA. 2014. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells.
697 *Nat Protoc* **9**:2329–2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
698 Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM,
699 Jackson AP, Knoblich JA. 2013. Cerebral organoids model human brain development and
700 microcephaly. *Nature* **501**:373–379. doi:10.1038/nature12517
701 Manuel MN, Mi D, Mason JO, Price DJ. 2015. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6
702 transcription factor. *Front Cell Neurosci* **9**:70. doi:10.3389/fncel.2015.00070
703 Mátés L, Chuah MKL, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker
704 K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B,
705 VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. 2009. Molecular evolution of a novel hyperactive
706 Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*
707 **41**:753–761. doi:10.1038/ng.343
708 Mercurio S, Alberti C, Serra L, Meneghini S, Berico P, Bertolini J, Becchetti A, Nicolis SK. 2021. An
709 early Sox2-dependent gene expression programme required for hippocampal dentate gyrus

development. *Open Biol* **11**:200339. doi:10.1098/rsob.200339
Motakis ES, Nason GP, Fryzlewicz P, Rutter GA. 2006. Variance stabilization and normalization for one-color microarray data using a data-driven multiscale approach. *Bioinformatics* **22**:2547–2553. doi:10.1093/bioinformatics/btl412
Nassor F, Jarray R, Biard DSF, Maïza A, Papy-Garcia D, Pavoni S, Deslys J-P, Yates F. 2020. Long Term Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci* **14**:14. doi:10.3389/fncel.2020.00014
Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H, Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K-I, Terasaki T. 2002. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**:1327–1335. doi:10.1097/01.WCB.0000033966.83623.7D
Pavoni S, Jarray R, Nassor F, Guyot A-C, Cottin S, Rontard J, Mikol J, Mabondzo A, Deslys J-P, Yates F. 2018. Small-molecule induction of Aβ-42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. *PLoS One* **13**:e0209150. doi:10.1371/journal.pone.0209150
Rippin I, Eldar-Finkelman H. 2021. Mechanisms and Therapeutic Implications of GSK-3 in Treating Neurodegeneration. *Cells* **10**:262. doi:10.3390/cells10020262
Rizk M, Saker Z, Harati H, Fares Y, Bahmad HF, Nabha S. 2021. Deciphering the roles of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the treatment of autism spectrum disorder and related syndromes. *Mol Biol Rep* **48**:2669–2686. doi:10.1007/s11033-021-06237-9
Roux GL, Jarray R, Guyot A-C, Pavoni S, Costa N, Théodoro F, Nassor F, Pruvost A, Tournier N, Kiyan Y, Langer O, Yates F, Deslys JP, Mabondzo A. 2019. Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model. *Sci Rep* **9**:16310. doi:10.1038/s41598-019-52213-6
Rubiano-Labrador C, Bland C, Miotello G, Guérin P, Pible O, Baena S, Armengaud J. 2014. Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. *J Proteomics* **97**:36–47. doi:10.1016/j.jprot.2013.05.020
Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, DeGrauw TJ, Jakobs C. 2003. X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis* **26**:309–318. doi:10.1023/a:1024405821638
Skelton MR, Schaefer TL, Graham DL, deGrauw TJ, Clark JF, Williams MT, Vorhees CV. 2011. Creatine Transporter (CrT; Slc6a8) Knockout Mice as a Model of Human CrT Deficiency. *PLoS ONE* **6**:e16187. doi:10.1371/journal.pone.0016187
Stockler S, Schutz PW, Salomons GS. 2007. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* **46**:149–166. doi:10.1007/978-1-4020-6486-9_8
Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:15545–15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
Suomi T, Seyednasrollah F, Jaakkola MK, Faux T, Elo LL. 2017. ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing. *PLoS Comput Biol* **13**:e1005562. doi:10.1371/journal.pcbi.1005562
Tang X-Y, Xu L, Wang J, Hong Y, Wang Y, Zhu Q, Wang D, Zhang X-Y, Liu C-Y, Fang K-H, Han X, Wang S, Wang X, Xu M, Bhattacharyya A, Guo X, Lin M, Liu Y. 2021. DSCAM/PAK1 pathway suppression reverses neurogenesis deficits in iPSC-derived cerebral organoids from patients with Down syndrome. *J Clin Invest* **131**:e135763, 135763. doi:10.1172/JCI135763
Tortosa E, Montenegro-Venegas C, Benoist M, Härtel S, González-Billault C, Esteban JA, Avila J. 2011. Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J Biol Chem* **286**:40638–40648. doi:10.1074/jbc.M111.271320
Trotier-Faurion A, Dézard S, Taran F, Valayannopoulos V, de Lonlay P, Mabondzo A. 2013. 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. *J Med Chem* **56**:5173–5181. doi:10.1021/jm400545n
Trotier-Faurion A, Passirani C, Béjaud J, Dézard S, Valayannopoulos V, Taran F, de Lonlay P, Benoit J-P, Mabondzo A. 2015. Dodecyl creatine ester and lipid nanocapsule: a double strategy for the

765 treatment of creatine transporter deficiency. *Nanomedicine (Lond)* **10**:185–191.
766 doi:10.2217/nnm.13.205
767 Udobi KC, Delcimmuto N, Kokenge AN, Abdulla ZI, Perna MK, Skelton MR. 2019. Deletion of the
768 creatine transporter gene in neonatal, but not adult, mice leads to cognitive deficits. *J Inherit*
769 *Metab Dis* **42**:966–974. doi:10.1002/jimd.12137
770 Ullio-Gamboa G, Udobi KC, Dezard S, Perna MK, Miles KN, Costa N, Taran F, Pruvost A, Benoit J-P,
771 Skelton MR, Lonlay P de, Mabondzo A. 2019. Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as
772 a promising therapy for creatine transporter deficiency. *Nanomedicine (Lond)* **14**:1579–1593.
773 doi:10.2217/nnm-2019-0059
774 Valayannopoulos V, Bakouh N, Mazzuca M, Nonnenmacher L, Hubert L, Makaci F-L, Chabli A,
775 Salomons GS, Mellot-Draznieks C, Brulé E, de Lonlay P, Toulhoat H, Munnich A, Planelles G,
776 de Keyzer Y. 2013. Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating
777 mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab*
778 *Dis* **36**:103–112. doi:10.1007/s10545-012-9495-9
779 van de Kamp JM, Mancini GM, Salomons GS. 2014. X-linked creatine transporter deficiency: clinical
780 aspects and pathophysiology. *J Inherit Metab Dis* **37**:715–733. doi:10.1007/s10545-014-9713-8
781

782 **Figure legends**

783 **Figure 1. Generation and characterization of human CTD brain organoids**

784 A. Intracellular concentration of creatine in CTD iPSCs after 1h incubation with creatine-supplemented
785 media. Healthy control is BJ. n=3 to 4, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test.

786 B-D. Intracellular concentration of creatine in CTD-rescue iPSCs CTD1-4 (B), CTD2-3 (C) and CTD3-7
787 (D) after 1h of incubation with creatine-supplemented media. Healthy controls are BJ and SP. n=3, two-
788 way ANOVA, Šídák's multiple comparisons test.

789 E. Schematic protocol of brain organoid development from iPSCs. Representative images are shown
790 for each stage. Scale bar: 200 µm.

791 F. Relative mRNA expression of the telencephalon marker SIX3. n=6 to 10

792 G. Quantification of the diameters of healthy (BJ) and pathological brain organoids at different time
793 points. N=2 to 22 brain organoids per productions, 4 to 6 productions per cell line.

794 H-I. Intracellular concentration of creatine in brain organoids and CTD-rescue brain organoids CTD1-4
795 (H) and CTD3-7 (I) after 6h of incubation in creatine-supplemented media. Healthy controls are BJ and
796 SP. n=2 to 4, two-way ANOVA, Šídák's multiple comparisons test.

797
798 **Figure 2. CTD brain organoid organization and neurogenesis deficit**

799 A. Representative images of 2 months old brain organoids tissue sections immunostained for PAX6
800 (radial glial cell and forebrain marker), MAP2 (neuronal marker), PSD95 (post-synaptic marker), TBR1

(immature neuron marker), NeuN (neuronal marker), SOX2 (radial glial cell marker), β-III tubulin (intermediate progenitor marker), GFAP (astrocyte marker). DAPI marks nuclei in blue. Scale bar: 200 µm

B. Relative mRNA expression of PAX6 and SOX2 (radial glial cell markers), GRIA2 and vGluT1 (glutamatergic markers), GABBR1 (GABAergic marker), PSD95 (post-synaptic marker) and CREB. n=3 to 6, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test

Figure 3. Unsupervised hierarchical clustering, reproducibility plots, principal component analysis (PCA), volcano plots, and Venn diagram showing overlap of the proteins.

A-R. The degree and quality of the separation of the data between the various groups being compared Healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids (CTD1_4); Healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids (CTD2_3); Healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids (CTD3_7) was assessed using unsupervised hierarchical clustering, reproducibility plots and principal component analysis (PCA), and the differentially expressed proteins were visualized using volcano plots.

S-U. Venn diagram showing overlap of the differentially expressed proteins between healthy and CTD-derived brain organoids identified using modification of the R package for ROTS. (S) Venn Diagrams for all proteins differentially expressed between BJ and CTD organoids. (T) Venn Diagrams for proteins downregulated in CTD compared to BJ organoids. (U) Venn Diagrams for proteins upregulated in CTD compared to BJ organoids.

Figure 4. Representation of heatmaps and graphs obtained by the absolute GSEA for significant pathways with enrichment scores.

A-C. Enrichment score and graphical representation for the GSEA for healthy versus CTD-derived brain organoids obtained across the gene sets c2_cp; c3_tft; c4_cgn; c5_bp; c5_mf; c7.

Figure 5. Heatmap, STRING interaction and GO Molecular Functional analysis

A. Heatmap showing expression levels of the 142 proteins in the top 90 percentile.

829 B. Heatmap showing expression levels of 32 most altered and abundant proteins were found to be
830 significantly altered in CTD-derived cerebral organoids compared to normal organoids.
831 C. STRING interaction of the 30 proteins selected.
832 D. GO Molecular Functional analysis obtained using Enrichr on the 32 proteins.
833
834 **Figure 6. Relationship between GSK3β and neurogenesis deficit**
835 A-B. Representative western blot of GSK3β and pSer9-GSK3β in CTD vs healthy brain organoids (A)
836 and graph showing analysis of P-GSK3β/GSK3β ratio (B). n=8, one-way ANOVA, Dunnett's multiple
837 comparison test.
838 C-D. Representative western blot of SOX2 in CTD vs healthy brain organoids (C) and graph showing
839 analysis of SOX2 relative expression (D). n=8, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test.
840 E-L. Representative western blot of PAK1 (E), MAP1B (G), GSK3β and pSer9-GSK3β (I), and SOX2
841 (K) in brain organoids obtained from CTD iPSCs and CTD-rescue iPSCs (CTD 1-4), and graphs
842 showing analysis of PAK1 (F), MAP1B (H), P-GSK3β/GSK3β ratio (J), SOX2 (L) relative expression.
843 n=2 to 8, one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test. (I and J) the lanes were run on the
844 same gel but were noncontiguous.
845
846 **Figure 7. Schematic presentation of the main findings of the study.** The decrease in cerebral
847 creatine pool could favor the accumulation of the dephosphorylated form of GSK3β, making it more
848 active. This kinase has many targets in the cell, including transcription factors whose activity it can
849 modulate. This modulation will in turn modify the expression of genes, which can influence several
850 cellular processes: the reorganization of microtubules with the regulation of MAP1B, synaptic function,
851 and neurogenesis thus affecting the functionality of brain cells and consequently cognitive functions.
852 The alteration of neurons could also be explained by a mitochondrial dysfunction due to the decrease
853 of creatine levels and the modulation of GSK3β activity, which is known to regulate mitochondrial
854 activity.
855
856 **Supplemental Figure Legends**

857 **Figure S1. Generation of CTD iPSCs**

858 A. RT-qPCR of pluripotency markers SOX2, NANOG and OCT4 in fibroblasts (PK and CTD1, 2, and 3)
859 and iPSCs (BJ and CTD1-4, 2-3, and 3-7). n=1 to 3

860 B. Representative analysis of SSEA4 and TRA1-60 expression for each iPSC line by flow cytometry.
861 SSEA4 is compared with the appropriate mouse IgG3 control, and TRA1-60 is compared with
862 unlabeled cells. Control: grey line; test: red and green line.

863 C. Generation of all three germ cell layer components within teratomas from each iPSC line
864 (endoderm, mesoderm, ectoderm). Whole sections of teratoma were performed 5 to 10 weeks of
865 growth and stained with hematoxylin and eosin. Scale bar = 50 µm.

866

867 **Figure S2. Generation of CTD-rescue iPSCs**

868 A. The p10-CAG-SLC6A8-IRES2-eGFP vector used for transfection

869 B. FACS analysis of transfected cells according to pluripotency marker SSEA4 (RL1-H) and GFP (BL1-
870 H).

871 C. Representative image of a 2 months old brain organoid tissue section from CTD rescue cell line
872 showing endogenous eGFP fluorescence. DAPI marks nuclei in blue. Scale bar: 200 µm

873

874 **Figure S3. Assessment of brain organoids variability**

875 Diameter of healthy BJ brain organoids obtained from 3 different productions.

876

877 **Figure S4. Neurogenesis deficit in a CTD mouse model**

878 Relative mRNA expression of SOX2 (radial glial cell markers) in whole brains of postnatal day 0
879 *Slc6a8*$^{-/y}$ mice. n=8 *Slc6a8*$^{+/y}$, 7 *Slc6a8*$^{-/y}$ mice. Data analyzed using two-tailed t-test on $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ values
880 with mean ΔCt of *Slc6a8*$^{+/y}$ mice used as the control value. t(13)=4.527, P=0.0006

881

882 **Figure S5. Flowchart diagram depicting the entire bioinformatics analysis workflow.**

883 The raw data generated by MS/MS was normalized and filtered. The proteins significantly altered in the
884 three CTD-derived cerebral organoids in comparison with healthy cerebral organoids were identified

using modification of the R package for ROTS. Absolute GSEA was performed in order to identify the enriched pathways in CTD-derived brain organoids in comparison with healthy cerebral organoids and the list of enriched genes was identified. Their recurrence or frequency in other pathways among all studied gene sets was searched. The frequency analysis identified 142 differentially expressed proteins occurring frequently across all enriched pathways. The 142 proteins identified were then subjected to a disease-related pathway analysis carried out using Enrichr followed by a frequency analysis in order to identify potential functions of the differentially expressed proteins. To further reduce the set of available proteins, the 142 proteins identified from the GSEA and the Frequency analysis were then sorted according to fold change; the most abundant proteins with fold change (-3<fold change>+3) and a sc higher than 10 were retained. 32 most altered and abundant proteins were found to be significantly altered in CTD-derived cerebral organoids compared to normal organoids.

Tables and their legends

Table 1. Frequency of proteins identified by GSEA. Absolute GSEA was carried out searching through more than 10,000 different cellular pathways obtained across well-annotated gene sets (c2_cp; c3_tft; c4_cgn; c5_bp; c5_mf; c7). The pathways identified through the GSEA were sorted according to the nominal *p value* (< 0.05). The list of enriched genes was then identified for each significant pathways and their recurrence in other pathways among all studied gene sets. The genes with the highest frequency across the multiple significant pathways (top 90-percentile cut-off; a total of 142 proteins) were selected for subsequent analysis.

Table S1. Raw proteomic Data showing the list of proteins and their spectral counts generated by High-resolution tandem mass spectrometry on the 16 biological samples generated a very large dataset comprising of a total of 943,656 MS/MS spectra and the monitoring of the abundance of 4219 proteins.

911 **Table S2. Normalized and filtered proteomic data.** The raw proteomic data consisting of 4219
912 proteins were normalized using Variance Stabilizing Normalization (VSN) and filtered using an
913 unsupervised variation filter.
914
915 **Table S3. Normalized and filtered proteomic data sorted according to p-value (p<0.05 and logfc).**
916 The differential expression analysis of the proteins between healthy and CTD-derived brain organoids
917 was carried out using modification of the R package for Reproducibility-Optimized Test Statistic
918 (ROTS). The data was sorted according to *p value* (< 0.05) based on FDR ≤ 0.25). The blue color
919 indicated proteins downregulated in CTD compared to BJ organoids. The red color indicates proteins
920 upregulated in healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids.
921
922 **Table S4. List of 142 proteins sorted according to the fold change.** The 142 identified by the GSEA
923 and frequency analysis (top 90-percentile cut-off) as differentially expressed proteins occurring
924 frequently across all enriched pathways were sorted according to fold change; the most abundant
925 proteins with fold change (-3<fold change>+3) (48 proteins, highlighted in yellow) and a sc higher than
926 10 (32 proteins, highlighted in dark yellow) were selected for further analysis. The 32 proteins selected
927 are the following: RUFY3; MAP1B; GSK3B; PAK1; STMN1; FYN; GNAI1; MYO5A; PAK2; DCTN1;
928 LMNA; SRC; GNAQ; CDK5; PLCG1; MECP2; ACTN3; HMGB2; SYT1; CALM1; ANXA2; L1CAM;
929 ANK2; ACTN2; TNNT2; MYH6; ANXA1; PTK7; TPM1; SFRP1; POSTN; CASQ2.
930
931 **Table S5. Frequency of 32 proteins identified by Enrichr analysis**. An ENRICHR analysis was
932 performed on the 32 proteins to identify the proteins in potential relation with the cognitive functions.
933 The pathways with p value less than 0.05 from the following libraries:
934 (BioCarta, Elsevier_Pathway_Collection, GO_Biological_Process, GO_Molecular_Function,
935 KEGG_Human, MSigDB_Hallmark, WikiPathways_Human). The diseases with p value less than 0.05
936 from the following libraries: (ClinVar, DisGeNET, Jensen_DISEASES, OMIM_Disease).
937
938 **Table S6. 32 proteins functions and relations to CTD symptoms**

939

940 **Table S7. Primer sequences used for RT-PCR analysis.**

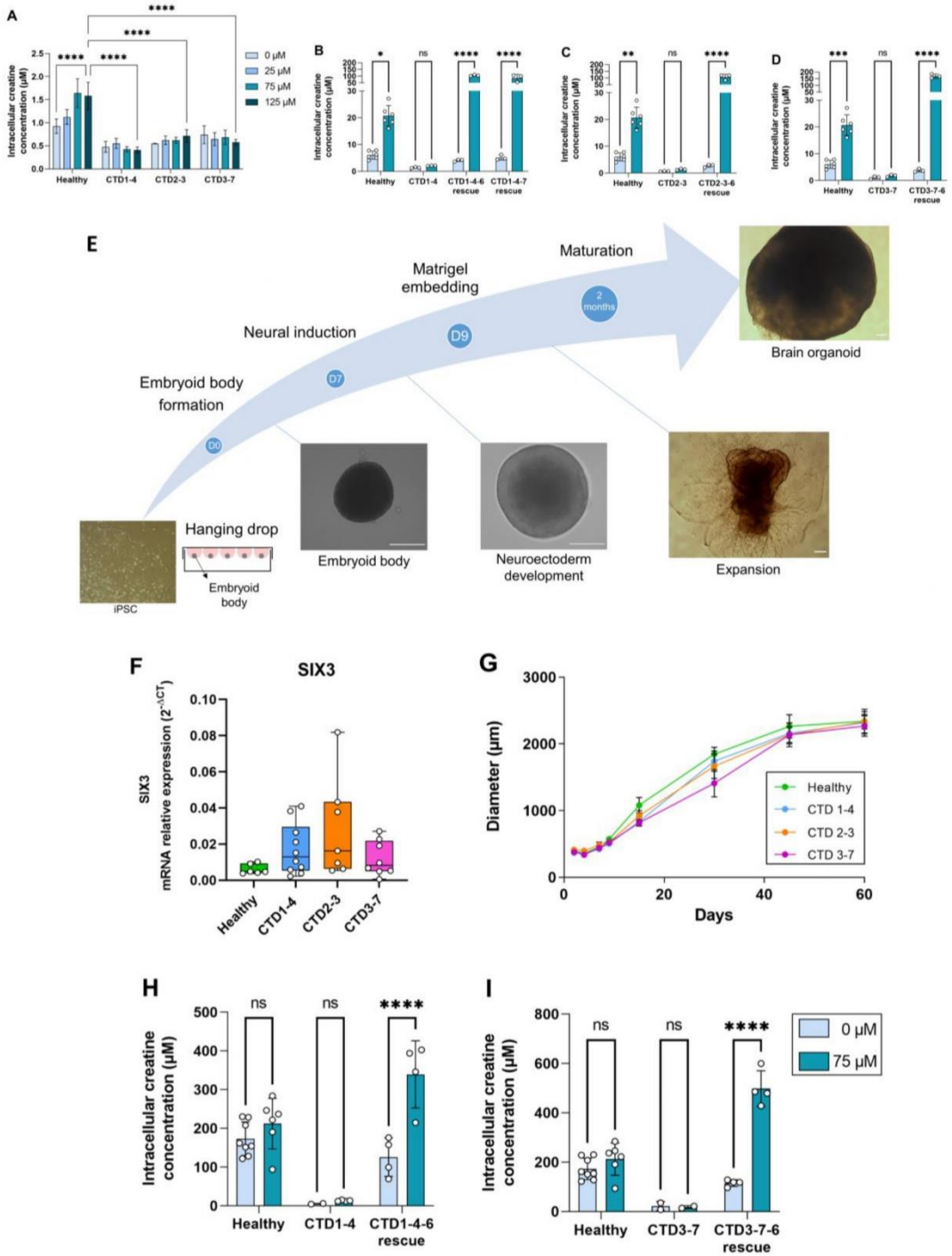


Figure 1. Generation and characterization of human CTD brain organoids

A. Intracellular concentration of creatine in CTD iPSCs after 1h incubation with creatine-supplemented media. Healthy control is BJ. n=3 to 4, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test

B-D. Intracellular concentration of creatine in CTD-rescue iPSCs CTD1-4 (B), CTD2-3 (C) and CTD3-7 (D) after 1h of incubation with creatine-supplemented media. Healthy controls are BJ and SP. n=3, two-way ANOVA, Šídák's multiple comparisons test.

E. Schematic protocol of brain organoid development from iPSCs. Representative images are shown for each stage. Scale bar: 200 µm.

F. Relative mRNA expression of the telencephalon marker SIX3. n=6 to 10

G. Quantification of the diameters of healthy (BJ) and pathological brain organoids at different time points.

H-I. Intracellular concentration of creatine in brain organoids and CTD-rescue brain organoids CTD1-4 (H) and CTD3-7 (I) after 6h of incubation in creatine-supplemented media. Healthy controls are BJ and SP. n=2 to 4, two-way ANOVA, Šídák's multiple comparisons test

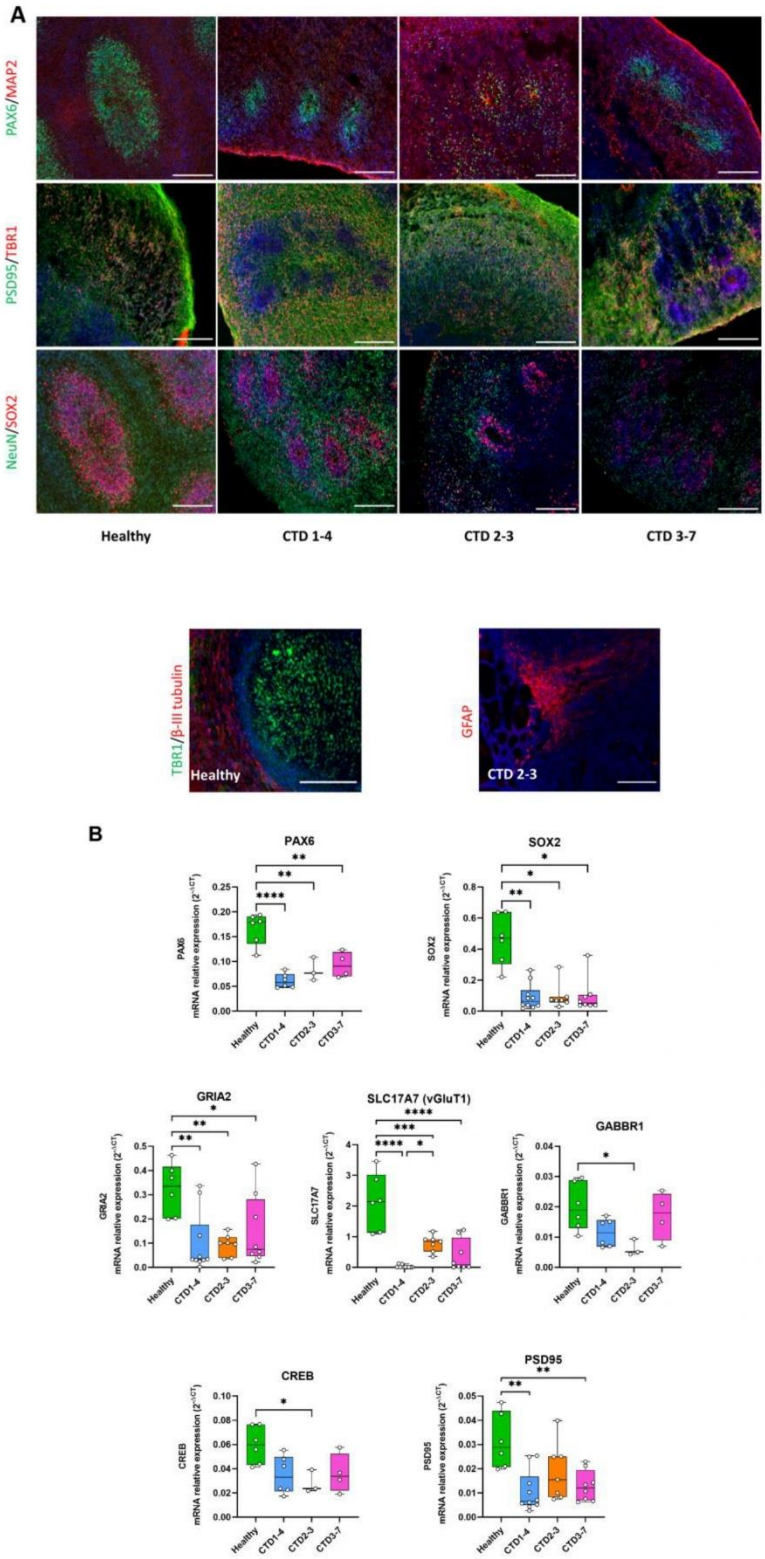


Figure 2. CTD brain organoid organization and neurogenesis deficit

A. Representative images of 2 months old brain organoids tissue sections immunostained for PAX6 (radial glial cell and forebrain marker), MAP2 (neuronal marker), PSD95 (post-synaptic marker), TBR1 (immature neuron marker), NeuN (neuronal marker), SOX2 (radial glial cell marker), β-III tubulin (intermediate progenitor marker), GFAP (astrocyte marker). DAPI marks nuclei in blue. Scale bar: 200 µm

B. Relative mRNA expression of PAX6 and SOX2 (radial glial cell markers), GRIA2 and vGluT1 (glutamatergic markers), GABBR1 (GABAergic marker), PSD95 (post-synaptic marker) and CREB. n=3 to 6, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test

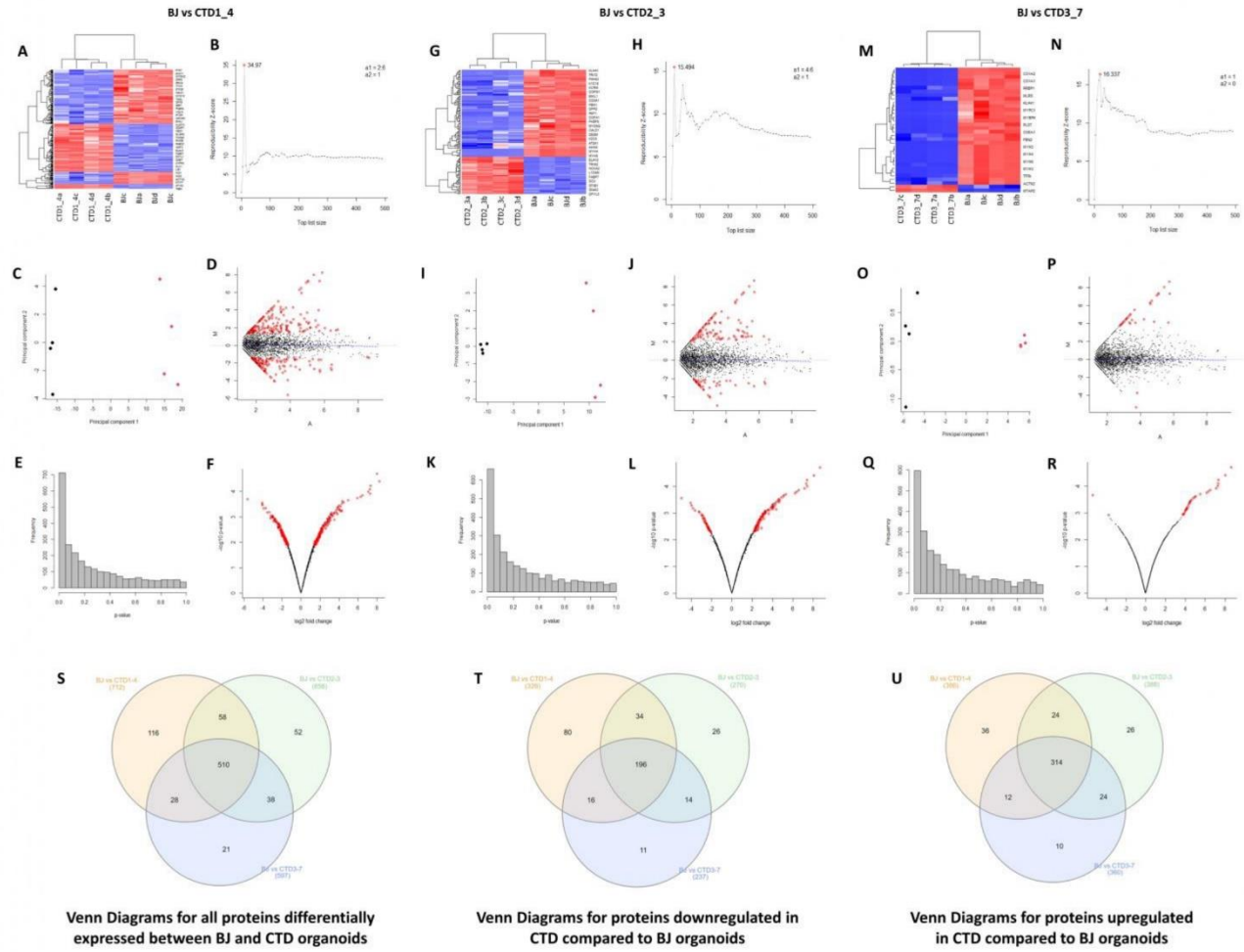


Figure 3. Unsupervised hierarchical clustering Reproducibility plots, principal component analysis (PCA), volcano plots, and Venn diagram showing overlap of the proteins.

A-R. The degree and quality of the separation of the data between the various groups being compared Healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids (CTD1_4); Healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids (CTD2_3); Healthy (BJ) vs CTD-derived brain organoids (CTD3_7) was assessed using unsupervised hierarchical clustering, reproducibility plots and principal component analysis (PCA), and the differentially expressed proteins were visualized using volcano plots.

S-U. Venn diagram showing overlap of the differentially expressed proteins between healthy and CTD-derived brain organoids identified using modification of the R package for ROTS. (S) Venn Diagrams for all proteins differentially expressed between BJ and CTD organoids. (T) Venn Diagrams for proteins downregulated in CTD compared to BJ organoids. (U) Venn Diagrams for proteins upregulated in CTD compared to BJ organoids.

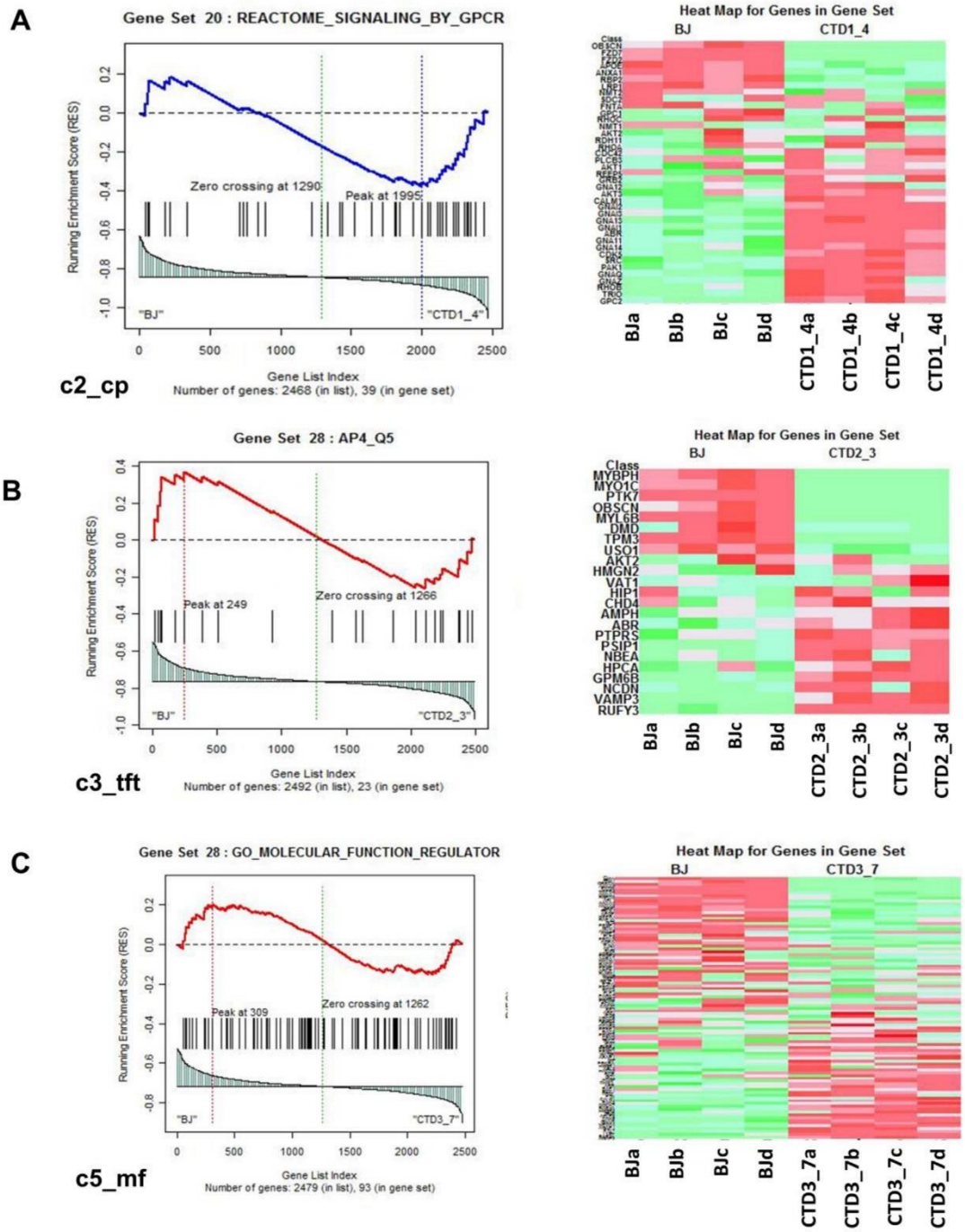


Figure 4. Representation of heatmaps and graphs obtained by the absolute GSEA for significant pathways with enrichment scores.
A-C. Enrichment score and graphical representation for the GSEA for healthy versus CTD-derived brain organoids obtained across the gene sets c2_cp; c3_tft; c4_cgn; c5_bp; c5_mf; c7.

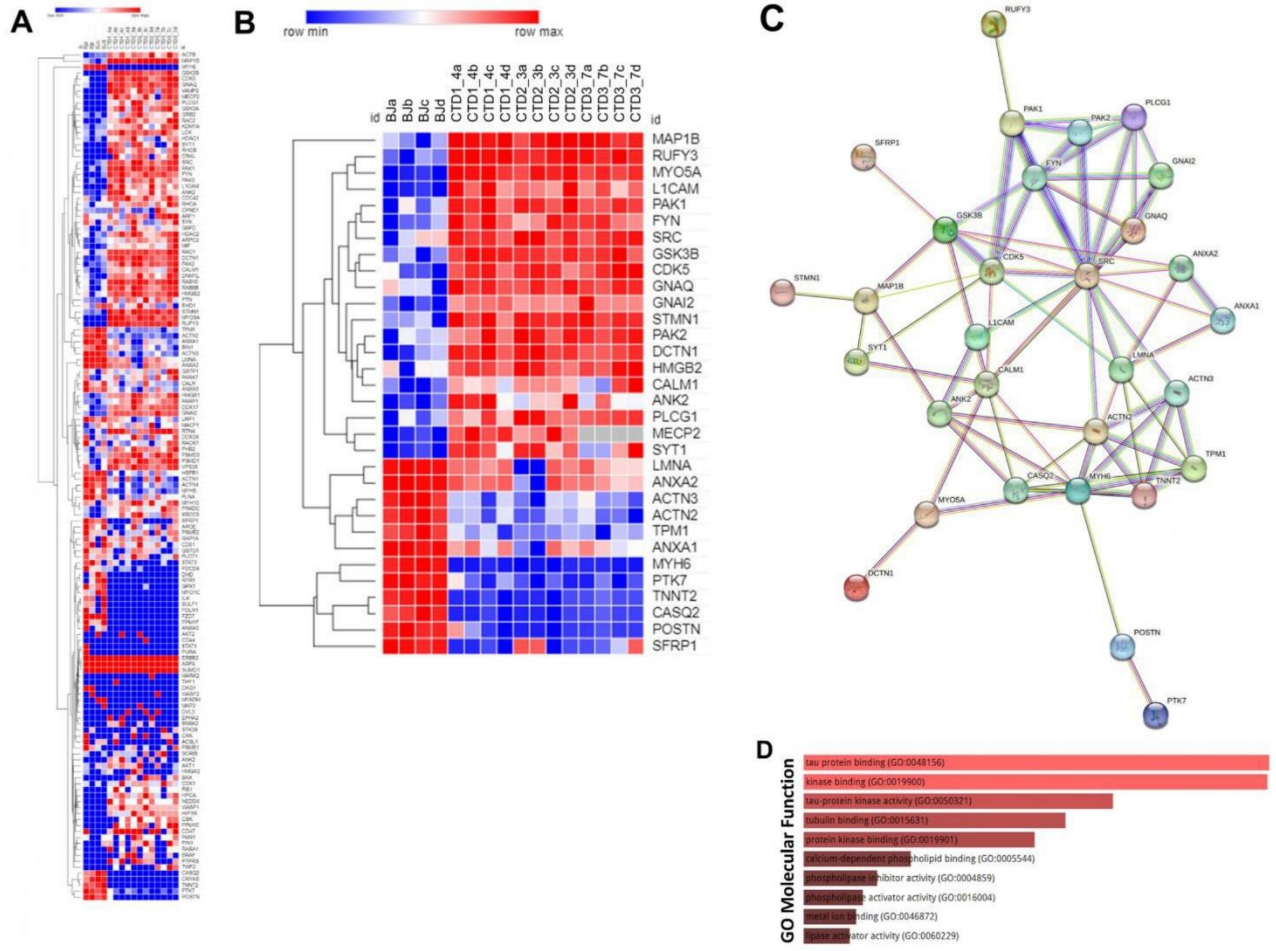


Figure 5. Heatmap, String interaction and GO Molecular Functional analysis
A. Heatmap showing expression levels of the 142 proteins in the top 90th percentile.
B. Heatmap showing expression levels of 32 most altered and abundant proteins were found to be significantly altered in CTD-derived cerebral organoids compared to normal organoids.
C. STRING interaction of the 30 proteins selected.
D. GO Molecular Functional analysis obtained using Enrichr on the 32 proteins.

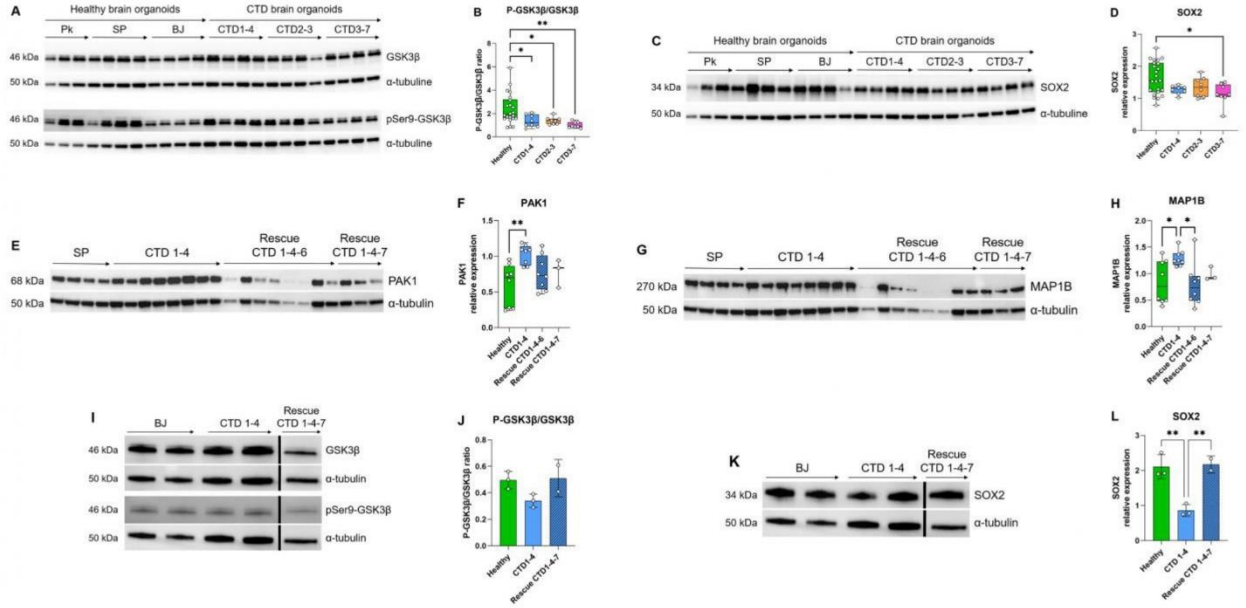


Figure 6. Relationship between GSK3β and neurogenesis deficit

A-B. Representative western blot of GSK3β and pSer9-GSK3β in CTD vs healthy brain organoids (A) and graph showing analysis of P-GSK3β/GSK3β ratio (B). n=8, one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test.

C-D. Representative western blot of SOX2 in CTD vs healthy brain organoids (C) and graph showing analysis of SOX2 relative expression (D). n=8, one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test.

E-L. Representative western blot of PAK1 (E), MAP1B (G), GSK3β and pSer9-GSK3β (I), and SOX2 (K) in brain organoids obtained from CTD iPSCs and CTD-rescue iPSCs (CTD 1-4), and graphs showing analysis of PAK1 (F), MAP1B (H), P-GSK3β/GSK3β ratio (J), SOX2 (L) relative expression. n=2 to 8, one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test. (I and J) the lanes were run on the same gel but were noncontiguous.

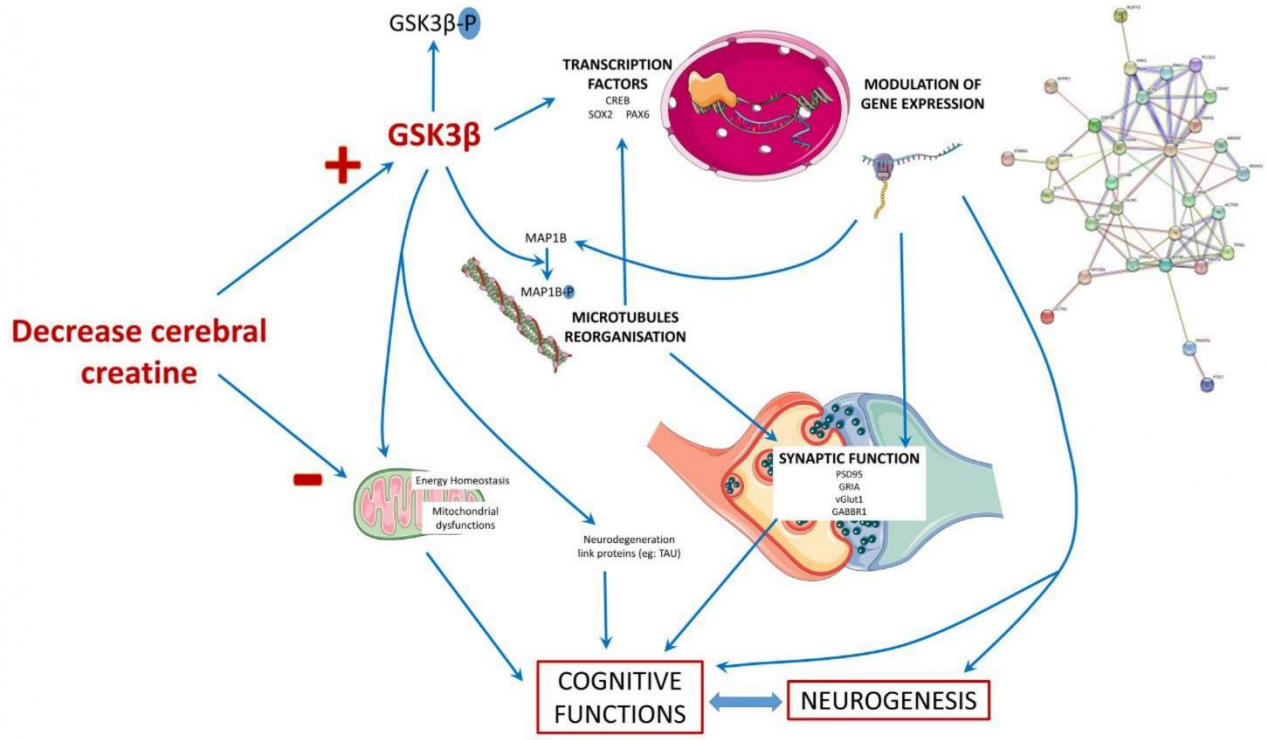


Figure 7. Schematic presentation of the main findings of the study. The decrease in cerebral creatine pool could favor the accumulation of the dephosphorylated form of GSK3β, making it more active. This kinase has many targets in the cell, including transcription factors whose activity it can modulate. This modulation will in turn modify the expression of genes, which can influence several cellular processes: the reorganization of microtubules with the regulation of MAP1B, synaptic function, and neurogenesis thus affecting the functionality of brain cells and consequently cognitive functions. The alteration of neurons could also be explained by a mitochondrial dysfunction due to the decrease of creatine levels and the modulation of GSK3β activity, which is known to regulate mitochondrial activity.

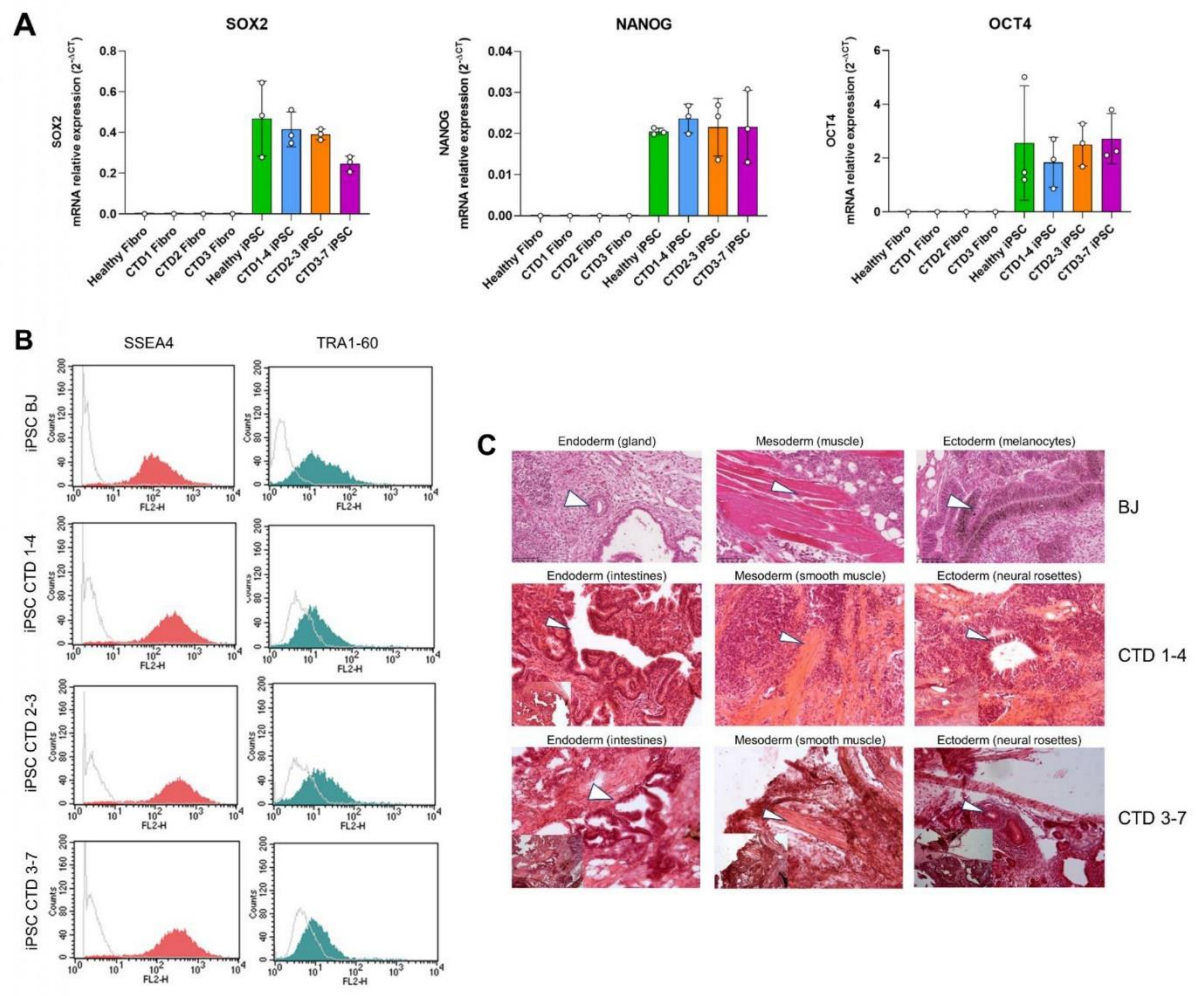


Figure S1. Generation of CTD iPSCs

A. RT-qPCR of pluripotency markers SOX2, NANOG and OCT4 in fibroblasts (PK and CTD1, 2, and 3) and iPSCs (BJ and CTD1-4, 2-3, and 3-7). n=1 to 3

B. Representative analysis of SSEA4 and TRA1-60 expression for each iPSC line by flow cytometry. SSEA4 is compared with the appropriate mouse IgG3 control, and TRA1-60 is compared with unlabeled cells. Control: grey line; test: red and green line.

C. Generation of all three germ cell layer components within teratomas from each iPSC line (endoderm, mesoderm, ectoderm). Whole sections of teratoma were performed 5 to 10 weeks of growth and stained with hematoxylin and eosin. Scale bar = 50 µm.

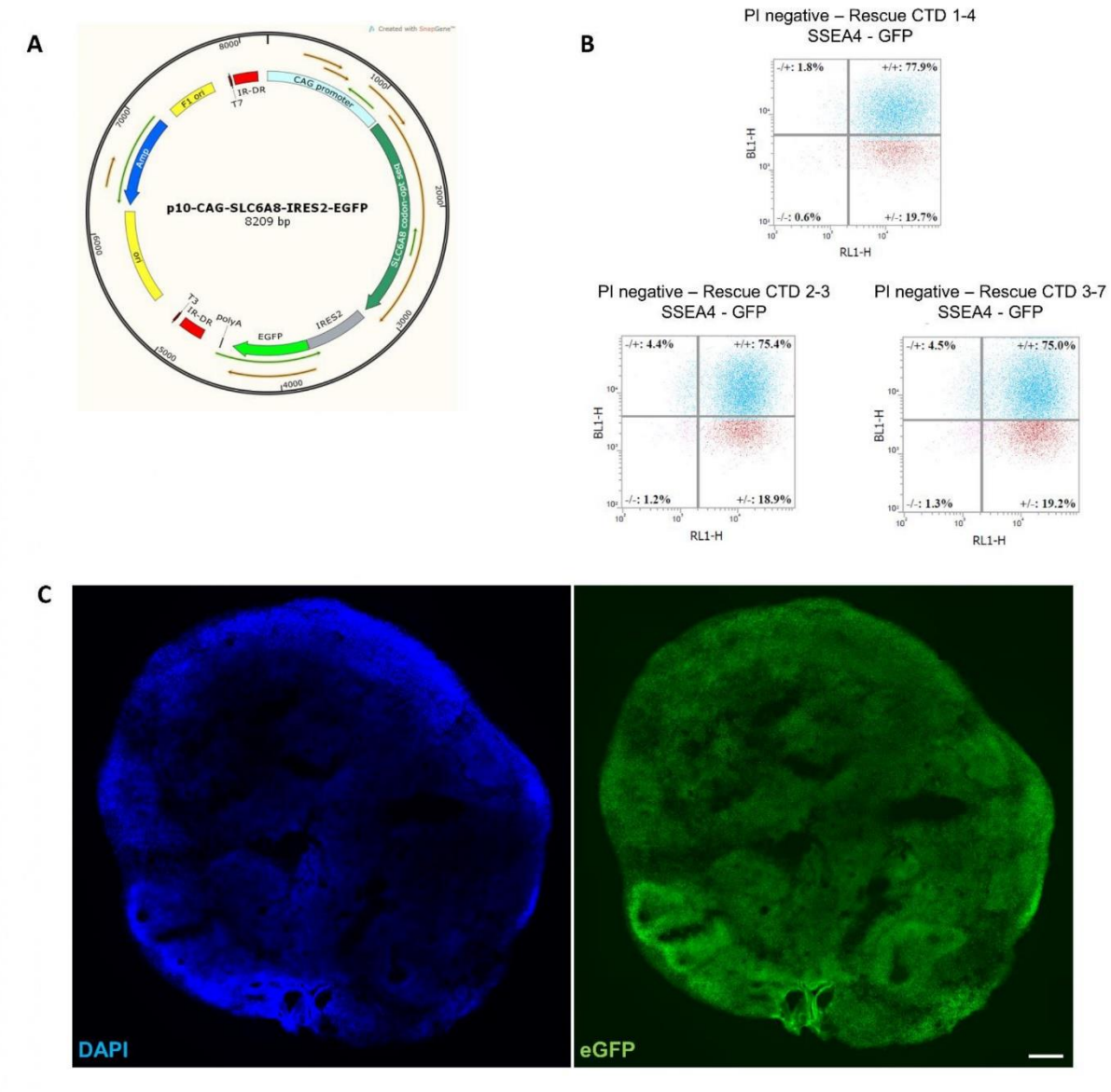


Figure S2. Generation of CTD-rescue iPSCs

A. The p10-CAG-SLC6A8-IRES2-eGFP vector used for transfection

B. FACS analysis of transfected cells according to pluripotency marker SSEA4 (RL1-H) and GFP (BL1-H).

C. Representative image of a 2 months old brain organoid tissue section from CTD rescue cell line showing endogenous eGFP fluorescence. DAPI marks nuclei in blue. Scale bar: 200 µm

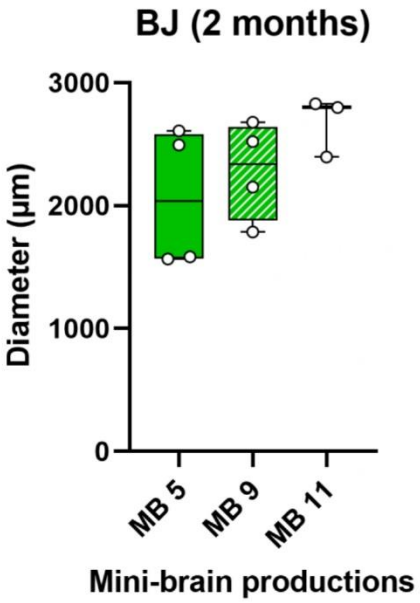


Figure S3. Assessment of brain organoids variability

Diameter of healthy BJ brain organoids obtained from 3 different productions.

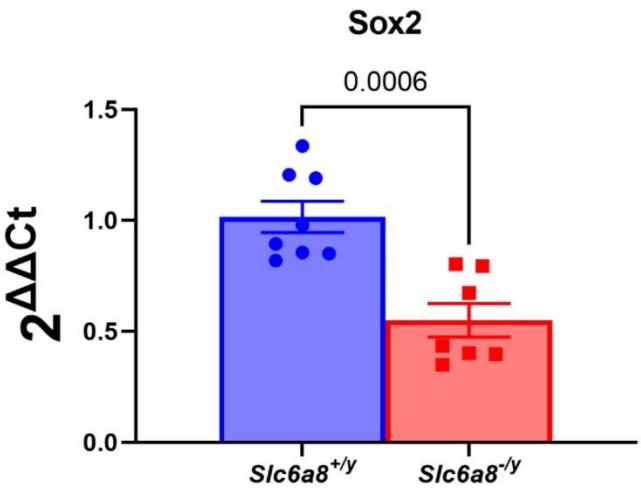


Figure S4. Neurogenesis deficit in a CTD mouse model

Relative mRNA expression of SOX2 (radial glial cell markers) in whole brains of postnatal day 0 *Slc6a8*$^{-/y}$ mice. n=8 *Slc6a8*$^{+/y}$, 7 *Slc6a8*$^{-/y}$ mice. Data analyzed using two-tailed t-test on $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ values with mean ΔCt of *Slc6a8*$^{+/y}$ mice used as the control value. t(13)=4.527, P=0.0006

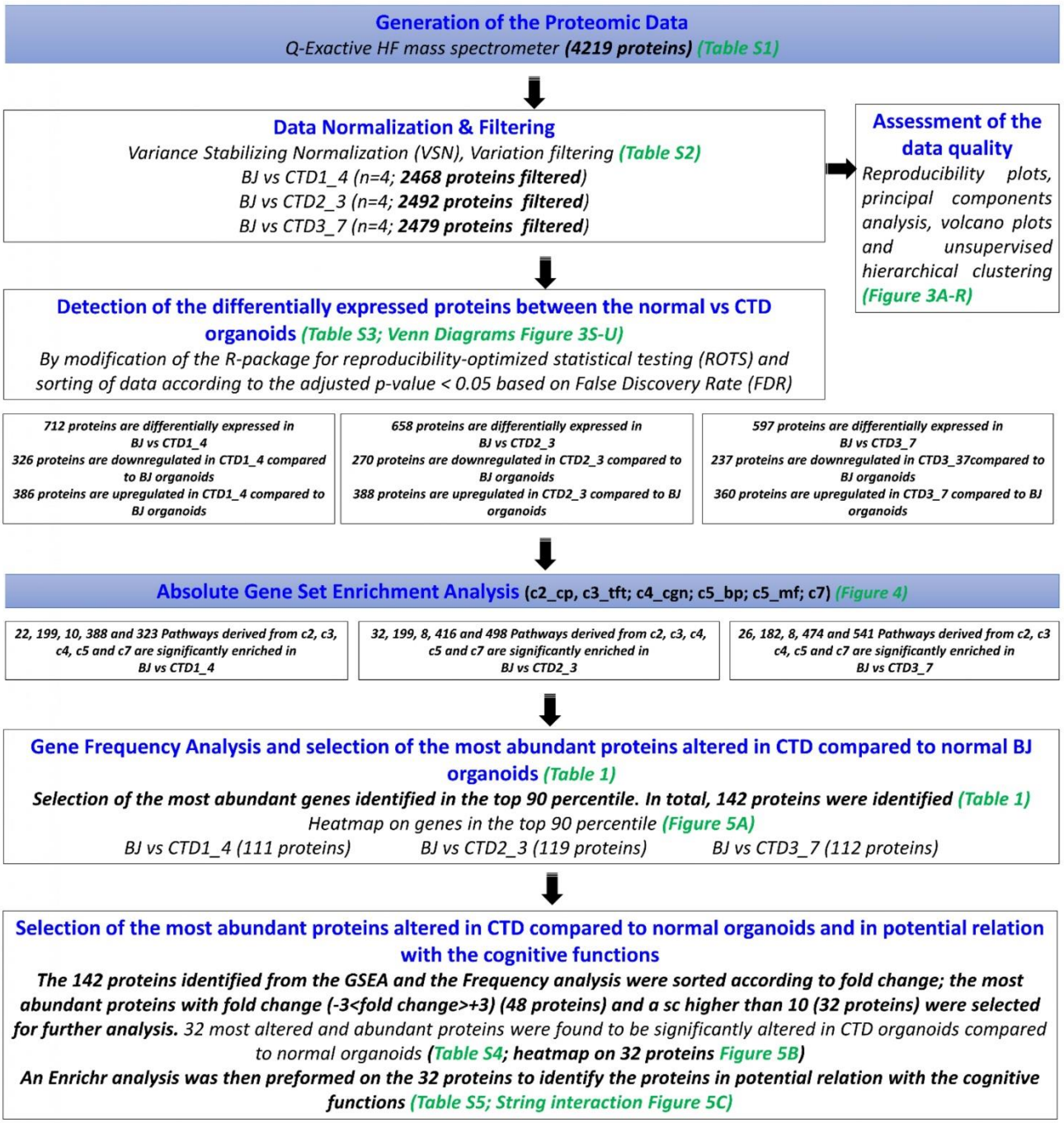


Figure S5. Flowchart diagram depicting the entire bioinformatics analysis workflow.
The raw data generated by MS/MS was normalized and filtered. The proteins significantly altered in the three CTD-derived cerebral organoids in comparison with healthy cerebral organoids were identified using modification of the R package for ROTS. Absolute GSEA was performed in order to identify the enriched pathways in CTD-derived brain organoids in comparison with healthy cerebral organoids and the list of enriched genes was identified. Their recurrence or frequency in other pathways among all studied gene sets was searched. The frequency analysis identified 142 differentially expressed proteins occurring frequently across all enriched pathways. The 142 proteins identified were then subjected to a disease-related pathway analysis carried out using Enrichr followed by a frequency analysis in order to identify potential functions of the differentially expressed proteins. To further reduce the set of available proteins, the 142 proteins identified from the GSEA and the Frequency analysis were then sorted according to fold change; the most abundant proteins with fold change (-3<fold change>+3) and a sc higher than 10 were retained. 32 most altered and abundant proteins were found to be significantly altered in CTD-derived cerebral organoids compared to normal organoids.

3. Principaux résultats et données supplémentaires

Nous avons généré des lignées d'iPSC à partir des fibroblastes de trois patients CTD présentant tous une délétion d'un acide aminé comme mutation du CRT (nomenclature : iPSC CTD 1-4, patient 1 clone 4 ; CTD 2-3, patient 2 clone 3 ; CTD 3-7, patient 3 clone 7). Les lignées d'iPSC saines ont été obtenues à partir de fibroblastes de trois donneurs sains (BJ, SP, PK). Toutes ces iPSC expriment les facteurs de pluripotence SOX2, NANOG et OCT4 (Figure S1A – Article 1), contrairement aux fibroblastes, ainsi que les antigènes de surface de pluripotence SSEA4 et TRA1-60 (Figure S1B – Article 1). De plus, les iPSC peuvent générer les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) lors de la formation d'un tératome chez des souris immunodéficientes (Figure S1C – Article 1).

Les iPSC CTD présentent un niveau basal de créatine plus faible par rapport aux lignées saines (Figure 1A – Article 1). De plus, les iPSC BJ présentent une incorporation de créatine dose-dépendante avec un Km qui est égal à 75 µM de créatine (Figure 39). La quantité de créatine dans les iPSC CTD ne varie pas quelle que soit la concentration en créatine dans le milieu, ce qui démontre la non-fonctionnalité du CRT dans ces cellules (Figure 1A – Article 1). De plus, il n'y a pas de différence d'incorporation en fonction de la mutation du patient.

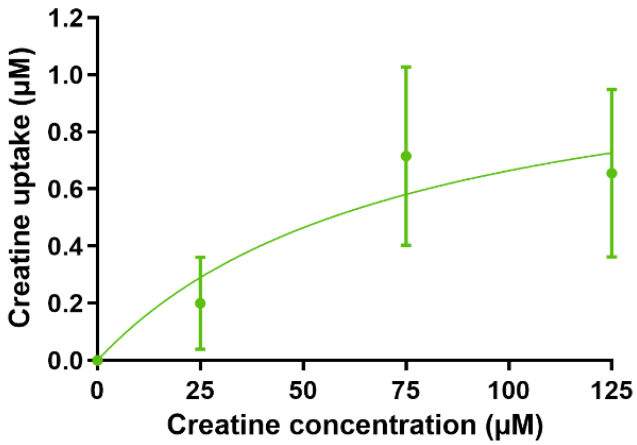


Figure 39 : Incorporation de créatine dans les iPSC saines

Incorporation de créatine dans les iPSC saines (BJ) après 1h d'incubation dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations de créatine. Valeurs normalisées par la concentration basale de créatine (0 µM), n=4.

Pour examiner le rôle spécifique du CRT, nous avons généré des iPSC CTD-rescue en incorporant le gène *Slc6a8* fonctionnel dans les iPSC CTD. Nous avons utilisé un système stable basé sur un transposon pour exprimer *Slc6a8* en même temps que la protéine fluorescente verte (eGFP) (Figure S2A – Article 1). Nous avons sélectionné les clones d'iPSC CTD-rescue en se basant sur l'intensité de fluorescence GFP et le maintien de l'expression des marqueurs de pluripotence (Figure S2B – Article 1). Ces iPSC CTD-rescue sont capables d'incorporer de la créatine à des niveaux plus élevés que les iPSC saines (Figure 1B-D – Article 1).

Nous avons ensuite utilisé ces différentes lignées d'iPSC pour générer des organoïdes cérébraux sains, CTD et CTD-rescue. Au bout de 2 mois de différenciation, les organoïdes se sont pleinement développés dans la matrice d'enrobage et ont atteint leur taille maximale (jusqu'à 4 mm de diamètre). Ces organoïdes expriment un marqueur du cerveau antérieur, SIX3, qui est un facteur de transcription jouant un rôle dans le développement du prosencéphale et des yeux (Figure 1F – Article 1). Les organoïdes cérébraux expriment également des marqueurs de cellules progénitrices neurales (SOX2 et PAX6), d'intermédiaires neuronaux (β-III tubuline), de neurones immatures (TBR1) et matures (MAP2 et NeuN), de marqueurs synaptiques (PSD95), et d'astrocytes (GFAP) (Figure 2 – Article 1). Les organoïdes cérébraux sont également composés de quelques oligodendrocytes immatures (NG2, Figure 40). En revanche, les niveaux d'ARNm des marqueurs d'oligodendrocytes matures (OLIG1) et de microglie (IBA1) ne sont pas assez importants pour être détectés par RT-PCR. Les progéniteurs neuraux (cellules positives pour SOX2 et PAX6) sont localisés dans des structures semblables à des zones ventriculaires (Figure 2A – Article 1).

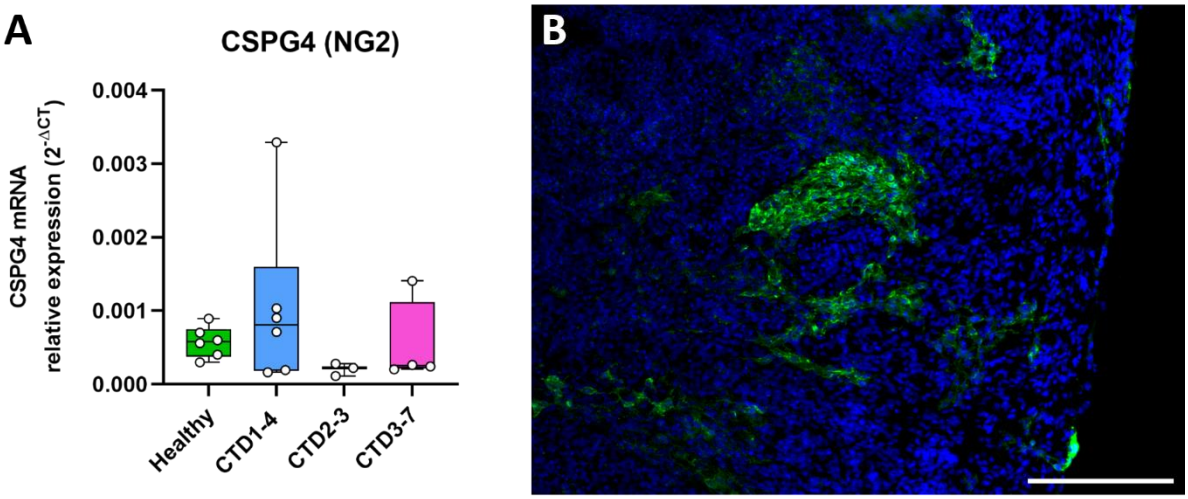


Figure 40 : Expression de marqueurs d'oligodendrocytes immatures dans les organoïdes cérébraux

(A) Expression d'ARNm de CSPG4 (NG2 ; marqueur d'oligodendrocytes immatures), n=3 à 6 (B) Image représentative d'une coupe de tissus d'organoïdes cérébraux sains (BJ) âgés de 2 mois immunomarquée pour NG2 (vert). Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI. Barre d'échelle = 200 µm.

Pour évaluer la reproductibilité de ce modèle, nous avons mesuré la variabilité intra et inter-production des organoïdes cérébraux en comparant la taille des organoïdes provenant de différentes productions, ainsi que la variabilité d'expression de marqueurs en RT-qPCR (Tableau 4 et Figure 41). Pour la mesure des diamètres, la variabilité intra-production varie de 6 à 37 % et la variabilité inter-production varie de 9 à 16 %. Pour le marqueur de progéniteurs et de cerveau antérieur PAX6, la variabilité intra-production varie de 19 à 28 % et la variabilité inter-production varie de 24 à 28 %.

Lignée		BJ	CTD 1-4	CTD 2-3	CTD 3-7
Diamètre	Variabilité intra-production	9 à 27 %	6 à 26 %	8 à 22 %	13 à 37 %
	Variabilité inter-production	13 %	16 %	9 %	12 %
PAX6	Variabilité intra-production	19 %	26 %	28 %	28 %
	Variabilité inter-production	-	24 %	-	28 %

Tableau 4 : Variabilité intra et inter-production des organoïdes cérébraux

Pour les diamètres : n=2 à 7 organoïdes par production, 3 à 5 productions. Pour PAX6 : n= 1 à 6 organoïdes par production, 1 à 3 productions.

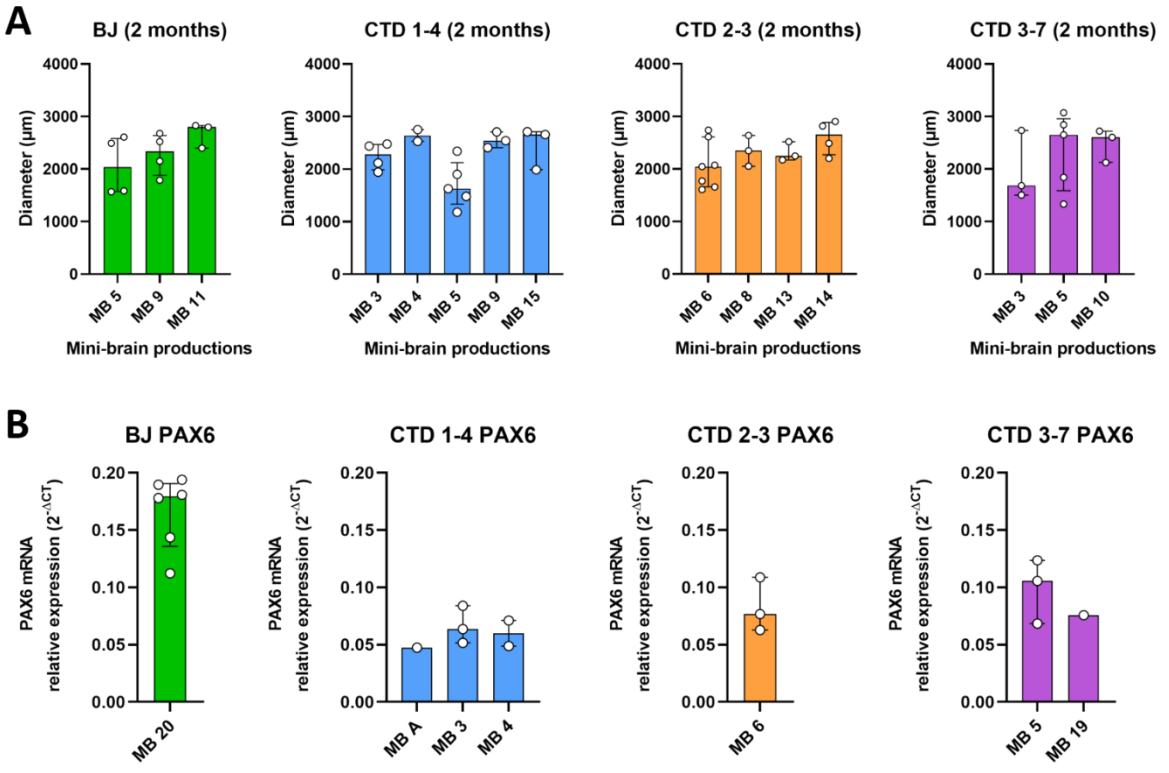


Figure 41 : Variabilité intra et inter-production des organoïdes cérébraux

(A) Mesure des diamètres d'organoïdes cérébraux sains et CTD venant de productions différentes (MB), n=2 à 7 organoïdes par production, 3 à 5 productions. (B) Expression relative des ARNm de PAX6, n=1 à 6 organoïdes par production, 1 à 3 productions.

Comme pour les iPSC, les organoïdes cérébraux CTD ont un niveau basal de créatine plus faible que les organoïdes sains, et ils ne présentent pas d'incorporation de créatine (Figure 1H-I – Article 1). Les organoïdes dérivés à partir des iPSC CTD-rescue ont un niveau basal de créatine similaire aux organoïdes sains, et ils sont capables d'incorporer de la créatine lorsqu'ils sont incubés avec 75 µM de créatine.

4. Discussion

Nous avons réussi à obtenir pour la première fois des organoïdes cérébraux à partir d'iPSC de patients CTD. Ces iPSC et organoïdes CTD ne sont pas capables de transporter de la créatine à l'intérieur des cellules ce qui montre l'absence de CRT fonctionnel à l'instar des cellules cérébrales des patients CTD. De plus, il n'y a pas de

différences d'incorporation en fonction de la mutation du patient ce qui est cohérent puisque ces trois mutations abolissent complètement l'activité du CRT (Valayannopoulos *et al*, 2013).

Comme prévu, les organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC présentent une diversité de types cellulaires similaires à d'autres études sur les organoïdes cérébraux (Lancaster *et al*, 2013; Nassor *et al*, 2020). Ils sont composés de neurones matures et en développement ainsi que d'astrocytes. D'autres cellules gliales telles que des oligodendrocytes immatures sont également détectés mais en proportion assez faible. Nous ne détectons pas de microglie ce qui est cohérent puisque les cellules microgliales sont dérivées du sac vitellin tandis notre protocole favorise la différenciation des iPSC vers les types cellulaires dérivés du neuroectoderme. L'organisation interne des organoïdes cérébraux est également en accord avec d'autres publications (Lancaster *et al*, 2013; Nassor *et al*, 2020). En effet, les progéniteurs neuraux sont localisés dans des structures ressemblant aux ventricules, marquées par SOX2 et PAX6, tandis que les neurones matures et en développement, marqués par NeuN et TBR1, ont migré à la périphérie de ces structures. De plus, nos organoïdes cérébraux semblent modéliser le cerveau antérieur puisque le facteur de transcription SIX3, qui joue un rôle dans le développement du prosencéphale et des yeux, est détecté.

Cependant, notre modèle d'organoïdes cérébraux présente des limitations qui peuvent l'éloigner de la physiologie cérébrale humaine, puisque plusieurs types cellulaires sont manquants. En effet, il n'y a pas de cellules endothéliales pour les vaisseaux sanguins, ainsi que de cellules microgliales pour l'immunité. Ces limitations sont inhérentes au protocole de différenciation utilisé. De nouveaux protocoles tendent à émerger depuis plusieurs années pour inclure ces différents types cellulaires dans les organoïdes cérébraux (Bodnar *et al*, 2021; Fagerlund *et al*, 2021; Kook *et al*, 2022; Ahn *et al*, 2021; Matsui *et al*, 2021). Ces complexifications du modèle permettent d'améliorer la maturation des organoïdes cérébraux et de promouvoir la fonctionnalité des neurones.

De plus, l'utilisation d'un modèle 3D de plusieurs millimètres en diamètre peut favoriser la présence de cœur nécrotique dû à la limitation de pénétration de nutriments et d'oxygène dans l'organoïde. Bien que la culture des organoïdes cérébraux sous agitation, comme dans notre protocole, permette d'améliorer la distribution des nutriments, ces conditions ne sont pas optimales. Certaines études se focalisent sur la transposition des organoïdes dans un système microfluidique pour améliorer la survie cellulaire (Cho *et al*, 2021; Wang *et al*, 2018). Ces améliorations sont également entreprises afin de diminuer la variabilité du modèle.

Partie 2 : Étude de la physiopathologie du CTD

L'absence de CRT fonctionnel dans le cerveau représente un obstacle important à l'amélioration du résultat clinique des patients CTD. Plusieurs combinaisons de suppléments nutritionnels ont été tentées avec un succès très limité en tant qu'approches thérapeutiques pour le CTD (Fernandes-Pires & Braissant, 2022). Dans le but de reconstituer la créatine cérébrale, l'ester dodécylique de créatine (DCE) s'est avéré être une option thérapeutique prometteuse sur la base de données précliniques *in vitro* et *in vivo* (Trotier-Faurion *et al*, 2013, 2015; Ullio-Gamboa *et al*, 2019). Cependant, il faut plusieurs mois de supplémentation en créatine pour améliorer les fonctions cognitives chez les patients déficients en enzyme de synthèse de créatine (patients AGAT et GAMT) (van de Kamp *et al*, 2014). Les essais cliniques sont donc difficiles à concevoir car il n'existe pas de biomarqueurs liés au CTD pour surveiller l'efficacité des médicaments au niveau du SNC. De plus, la compréhension mécanistique et surtout la manière dont la créatine fonctionne dans le cerveau est peu documentée, alors qu'elle serait cruciale pour développer des thérapies efficaces et identifier des biomarqueurs du CTD. Bien que plusieurs modèles murins CTD aient été développés, la plupart des études se sont concentrées sur la description des déficits comportementaux et cognitifs causés par un manque de créatine dans le cerveau et n'ont pas étudié les fondements moléculaires de ce trouble (Skelton *et al*, 2011; Baroncelli *et al*, 2014). Il est donc important d'étudier la physiopathologie du CTD dans les modèles murins et humains afin de renforcer la découverte de biomarqueurs liés au CTD et de fournir des données convergentes solides pour soutenir les essais cliniques.

Pour étudier la physiopathologie du CTD, nous avons utilisé une approche globale non ciblée pour déterminer dans un premier temps les changements d'abondance des protéines dans différentes régions cérébrales (cortex, hippocampe, cervelet, tronc cérébral) chez le modèle de souris KO CRT traitées ou non avec du DCE. La technologie de spectrométrie de masse en tandem à haute résolution nous a donc permis de

générer un grand ensemble de données pour déterminer l'abondance de 4035 protéines dans le cerveau du modèle murin. Ces données ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Article 2) (Mabondzo *et al*, 2023) et d'un brevet européen (PR91039_EP). Les résultats mettent en évidence un défaut de migration neuronale et de synaptogenèse. En effet, il y a une corrélation entre les déficits cognitifs et l'expression des protéines impliquées dans la neurogenèse, la migration neuronale et la synaptogenèse telles que FABP7, KIF1A, PLCB1 et NCAM1. Ces biomarqueurs nécessitent d'être transposés à l'être humain par une validation dans le modèle d'organoïdes cérébraux dérivés à partir de cellules de patients CTD.

Ainsi, suite à la caractérisation de notre nouveau modèle d'organoïdes cérébraux CTD et afin de mieux comprendre le lien entre l'absence de créatine et les symptômes des patients, nous avons dans un second temps étudié le profil protéomique des organoïdes cérébraux. Nous avons généré un jeu de données protéomiques de 4219 protéines, qui a servi à étudier différents aspects de la physiopathologie du CTD qui font l'objet de trois articles (Articles 1, 3 et 4) présentés dans la Partie 2 des Résultats.

1. Régulation de la neurogenèse

1.1 Contexte

La neurogenèse est le processus par lequel les neurones sont produits dans le cerveau. La formation du système nerveux commence pendant le développement embryonnaire, se poursuit durant les premières années de la vie et ne s'achève qu'à l'adolescence. Mais la neurogenèse se poursuit également dans certaines régions du cerveau adulte au niveau de la zone sous-ventriculaire et dans le gyrus denté de l'hippocampe (Ribeiro & Xapelli, 2021). Plusieurs facteurs peuvent moduler la neurogenèse tels que l'exercice physique et les hormones gonadiques qui augmenteraient la neurogenèse dans le gyrus denté (Jorgensen & Wang, 2020). À l'inverse, la neurogenèse décline avec l'âge et elle est fortement diminuée chez des

patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Berger *et al*, 2020). Il existe également un lien entre neurogenèse adulte et dépression puisque la sérotonine, impliquée dans la dépression, influence la prolifération des progéniteurs neuraux et la survie des cellules nouvellement formées (Berger *et al*, 2020).

Il existe plusieurs marqueurs de neurogenèse tels que les facteurs de transcription SOX2 et PAX6 qui sont des régulateurs essentiels de la différenciation et de la prolifération des cellules souches neurales (Cimadamore *et al*, 2013; Manuel *et al*, 2015). Les mutations de SOX2 sont associées à des symptômes communs au CTD, tels que des déficiences intellectuelles (Dennert *et al*, 2017), des crises d'épilepsie et un développement défectueux de l'hippocampe (Mercurio *et al*, 2021). De plus, Baroncelli *et al* ont montré une réduction de la neurogenèse dans l'hippocampe de souris KO CRT (Baroncelli *et al*, 2016).

Lors de la caractérisation de notre modèle d'organoïdes, nous avons pu observer que les structures ventriculaires étaient moins bien définies et organisées dans les organoïdes cérébraux CTD par rapport aux organoïdes sains (Figure 2A – Article 1). De plus, les organoïdes CTD présentent une plus faible expression d'ARNm des marqueurs de progéniteurs neuraux SOX2 et PAX6 (Figure 2B – Article 1). Ces résultats suggèrent que les organoïdes CTD pourraient présenter un déficit de neurogenèse.

Ainsi, suite à l'obtention du jeu de données protéomiques des organoïdes et des souris KO CRT, nous avons procédé à une analyse de ces données pour identifier les protéines en lien avec le potentiel déficit de neurogenèse dans le CTD.

1.2 Article 1 – Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency

(cf. article entier dans Résultats – Partie 1.2)

Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency

Léa Broca-Brisson[1], Rania Harati[2,3], Clémence Disdier[4], Orsolya Mozner[5], Romane Gaston-Breton[1], Auriane Maïza[1], Narciso Costa[1], Anne-Cécile Guyot[1], Balazs Sarkadi[5], Agota Apati[5], Matthew R Skelton[6], Lucie Madrange[7], Frank Yates[7], Jean Armengaud[8], Rifat A. Hamoudi[3,9,10,11,#] and Aloïse Mabondzo[1,#,*]

Affiliations

[1]Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette cedex 91191, France.

[2]Department of Pharmacy Practice and Pharmacotherapeutics, College of Pharmacy, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[3]Sharjah Institute for Medical Research, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[4]CERES BRAIN Therapeutics, Paris, France. ICM-Hôpital Pitié-Salpétrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

[5]Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, ELKH, and Doctoral School of Molecular Medicine, Semmelweis University, Budapest Hungary.

[6]Department of Pediatrics, University of Cincinnati College of Medicine and Division of Neurology, Cincinnati Children's Research Foundation, United States

[7]Sup'Biotech/Service d'Etude des Prions et des Infections Atypiques (SEPIA), Institut François Jacob, CEA, Université Paris Saclay, 92265, Fontenay-aux-Roses, France.

[8]Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

[9]Clinical Sciences Department, College of Medicine, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[10]Division of Surgery and Interventional Science, University College London, London, United Kingdom.

1.3 Article 2 : Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency

Cet article résume les résultats des tests cognitifs ainsi que de la comparaison des protéomes des différentes régions cérébrales de souris sauvages et KO CRT traitées ou non avec le DCE.

L'article 2 a été publié dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience* (24 mars 2023).

Les données supplémentaires sont disponibles sur le site du journal : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1118707/full

frontiers | Frontiers in Molecular Neuroscience

TYPE Original Research
PUBLISHED 24 March 2023
DOI 10.3389/fnmol.2023.1118707

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Arianna Bellucci,
University of Brescia,
Italy

REVIEWED BY
David J. Picketts,
Ottawa Hospital Research Institute (OHRI),
Canada
Aniket Bhattacharya,
Rutgers, The State University of New Jersey,
United States

*CORRESPONDENCE
Aloïse Mabondzo
✉ aloise.mabondzo@cea.fr

†These authors have contributed equally to this work

‡These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Brain Disease Mechanisms,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Neuroscience

RECEIVED 07 December 2022
ACCEPTED 20 February 2023
PUBLISHED 24 March 2023

CITATION
Mabondzo A, Harati R, Broca-Brisson L, Guyot A-C, Costa N, Cacciante F, Putignano E, Baroncelli L, Skelton MR, Saab C, Martini E, Benech H, Joudinaud T, Gaillard J-C, Armengaud J and Hamoudi R (2023) Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency.
Front. Mol. Neurosci. 16:1118707.
doi: 10.3389/fnmol.2023.1118707

COPYRIGHT
© 2023 Mabondzo, Harati, Broca-Brisson, Guyot, Costa, Cacciante, Putignano, Baroncelli, Skelton, Saab, Martini, Benech, Joudinaud, Gaillard, Armengaud and Hamoudi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency

Aloïse Mabondzo[1]*, Rania Harati[2,3†], Léa Broca-Brisson[1†], Anne-Cécile Guyot[1], Narciso Costa[1], Francesco Cacciante[4], Elena Putignano[4], Laura Baroncelli[4,5], Matthew R. Skelton[6], Cathy Saab[7], Emmanuelle Martini[7], Henri Benech[8], Thomas Joudinaud[8], Jean-Charles Gaillard[9], Jean Armengaud[9‡] and Rifat Hamoudi[3,10,11‡]

[1]Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), Gif sur Yvette, France, [2]Department of Pharmacy Practice and Pharmacotherapeutics, College of Pharmacy, University of Sharja, Sharjah, United Arab Emirates, [3]Sharjah Institute for Medical Research, University of Sharjah, Sharjah, United Arab Emirates, [4]Institute of Neuroscience, National Research Council (CNR), Pisa, Italy, [5]Department of Developmental Neuroscience, IRCCS Stella Maris Foundation, Pisa, Italy, [6]Department of Pediatrics, University of Cincinnati College of Medicine and Division of Neurology, Cincinnati Children's Research Foundation, Cincinnati, OH, United States, [7]Université de Paris and Université Paris Saclay, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Fontenay aux Roses, France, [8]Ceres Brain Therapeutics, Paris, France, [9]Université Paris Saclay, CEA, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), INRAE, Bagnol sur Cèze, France, [10]Clinical Sciences Department, College of Medicine, University of Sharjah, Sharjah, United Arab Emirates, [11]Division of Surgery and Interventional Science, University College London, London, United Kingdom

Creatine transporter deficiency (CTD), a leading cause of intellectual disability is a result of the mutation in the gene encoding the creatine transporter SLC6A8, which prevents creatine uptake into the brain, causing mental retardation, expressive speech and language delay, autistic-like behavior and epilepsy. Preclinical *in vitro* and *in vivo* data indicate that dodecyl creatine ester (DCE) which increases the creatine brain content, might be a therapeutic option for CTD patients. To gain a better understanding of the pathophysiology and DCE treatment efficacy in CTD, this study focuses on the identification of biomarkers related to cognitive improvement in a Slc6a8 knockout mouse model (Slc6a8−/y) engineered to mimic the clinical features of CTD patients which have low brain creatine content. Shotgun proteomics analysis of 4,035 proteins in four different brain regions; the cerebellum, cortex, hippocampus (associated with cognitive functions) and brain stem, and muscle as a control, was performed in 24 mice. Comparison of the protein abundance in the four brain regions between DCE-treated intranasally Slc6a8−/y mice and wild type and DCE-treated Slc6a8−/y and vehicle group identified 14 biomarkers, shedding light on the mechanism of action of DCE. Integrative bioinformatics and statistical modeling identified key proteins in CTD, including KIF1A and PLCB1. The abundance of these proteins in the four brain regions was significantly correlated with both the object recognition and the Y-maze tests. Our findings suggest a major role for PLCB1, KIF1A, and associated molecules in the pathogenesis of CTD.

KEYWORDS

dodecyl creatine ester, creatine transporter deficiency, target identification, cognitive function, CTD-pathophysiology

Introduction

Neurodevelopmental disorders represent a significant health problem due to the heterogeneity of the underlying causes and a lack of appropriate treatment options. Creatine transporter deficiency (CTD) is a rare genetic disorder and a subset of intellectual disability (ID). However its symptoms including autism-like symptoms with ID, expressive speech and language delay, movement disorders, and epilepsy (Salomons et al., 2001; Stockler et al., 2007; Des Roches et al., 2015) overlaps with those of common neurodevelopmental disorders. CTD is an X-linked (XL) disorder caused by mutations in *SLC6A8*, the gene encoding creatine transporter (CrT)(Braissant et al., 2011), that prevent the transport of creatine (Cr), which is essential for brain function, into the brain (van de Kamp et al., 2014) and is estimated to be the cause of 1%–2% of all cases of XL ID (Cheillan et al., 2012; Des Roches et al., 2015) and about 1% of cases with ID of unknown aethiology (Clark et al., 2006). As expected, the symptoms are most severe in males, with female carriers presenting with a milder phenotype. Some of the main difficulties in elucidating the pathogenesis of and treating ID are that there are wide variety of causes of ID, with no single cause being associated with a significant majority of ID cases.

Several combinations of nutritional supplements or Cr precursors l-arginine and l-glycine, have been studied as therapeutic approaches for CTD, but they have shown very limited success (Valayannopoulos et al., 2013; Jaggumantri et al., 2015; Bruun et al., 2018). However, our previous findings suggest that following the inhalation of dodecyl creatine ester (DCE) in Slc6a8$^{-/y}$ (CrT KO) mice, an animal model recapitulating the clinical features of human CTD, an increase of Cr brain content and synaptic markers could be achieved in the synapsis terminals and thus improving the cognitive function of Slc6a8−/y mice. These findings highlight that DCE might be a therapeutic option for CTD patients (Trotier-Faurion et al., 2013, 2015; Ullio-Gamboa et al., 2019).

To gain a better understanding of the pathophysiology of CTD and DCE treatment efficacy, we focused in this study on the identification of biomarkers related to cognitive improvement in a Slc6a8−/y mice which have low Cr content in the brain and hippocampus (Baroncelli et al., 2016). This mouse model exhibits a precocious cognitive and autistic-like defects, mimicking the early key features of human congenital creatine deficiency syndromes. Moreover, mutant mice displayed a progressive impairment of short and long-term declarative memory denoting an early brain aging. To that end, the study employed a combination of cognitive tests and molecular methods to decipher some of the molecular mechanisms involved in CTD pathophysiology. The cognitive tests included the use of object recognition test (ORT), Y-maze and Morris water maze (MWM) tests to show the decline of cognitive function in *Slc6a8*$^{-/y}$ mice and whether the treatment with DCE improves the cognitive function. The molecular methods involved the application of shotgun proteomics to four different brain regions; the cerebellum, cortex, hippocampus (associated with cognitive functions) and brain stem, and muscle as a control.

Results

Restoration of cognitive functions in DCE-treated creatine knockout mice

DCE was intranasally administered as previously reported (Ullio-Gamboa et al., 2019) to CrT KO mice for 30 days, while wild-type (WT) and vehicle-treated mice were used as controls ($N = 8$ per group). A volume of 6 µL of DCE or vehicle was placed in the nostril. DCE (4 mg/g) or vehicle was given twice bilaterally (12 µL total volume). Consistent with previous findings, CrT KO mice showed object recognition deficits when compared with WT mice. Mice were assigned to treatment groups by sorting animals based on discrimination index (DI) and alternating assignments between vehicle and treatment to avoid performance confounds.

Figure 1A shows DI data. Vehicle-treated CrT KO mice showed reductions in DI compared with both WT mice ($p = 0.023$) and DCE-treated CrT KO mice ($p < 0.05$). DCE-treated CrT KO mice spent more time exploring the novel object than vehicle-treated CrT KO mice (one-way ANOVA, $p < 0.01$; Tukey's *post hoc* test, $p < 0.05$; Figure 1B), but there was no difference between DCE-treated CrT KO mice and WT mice ($p = 0.406$). Strikingly, the median exploration time for the DCE-treated CrT KO mice was 96% of the median exploration time for the WT mice.

We used the Y-maze test measuring the spontaneous alternation rate, the single parameter with the highest accuracy in discriminating WT and CrT KO mice (Mazziotti et al., 2020). A reduction of the spontaneous alternation rate in vehicle-treated CrT KO mice (48%) was observed compared to WT mice (62%; one-way ANOVA, $p < 0.001$; Tukey's *post hoc* test, $p < 0.001$; Figure 1C). The median spontaneous alternation rate was higher in DCE-treated CrT KO mice than in vehicle-treated CrT KO mice but did not differ between DCE-treated CrT KO mice and WT mice (86%; $p = 0.058$; Figure 1C).

Memory was assessed using the MWM test. The results show that DCE did not have a beneficial effect on the performance of CrT KO mice in the MWM test (Figure 1D), suggesting that DCE treatment ameliorates some cognitive deficits seen in these mice.

Proteomic analysis identified unique proteins abundant in specific brain regions

In order to identify proteins across the different brain regions involved in the pathogenesis of CTD, proteomics based differential abundance analysis was performed in the different brain regions of 24 mice. Immediately after behavioral testing, the animals from all three groups were sacrificed. Label-free shotgun proteomics analysis of

10.3389/fnmol.2023.1118707

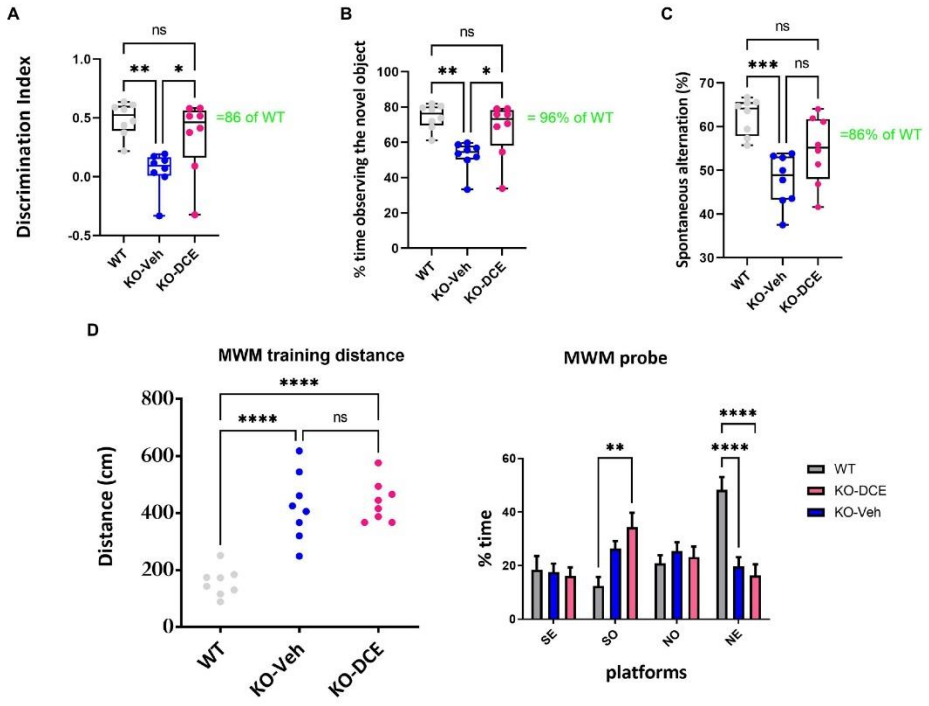


FIGURE 1
Analysis of cognition among the different experimental groups. **(A,B)** Object recognition in the ORT was impaired in CrT KO mice. **(A)**, Analysis of the object discrimination index and **(B)**, percentage of time spent exploring the novel object revealed that WT and DCE-treated CrT KO mice but not vehicle-treated CrT KO mice showed a preference for the novel object. **(C)** Early deficiency of working and spatial memory in CrT KO mice measured by the Y-maze test. CrT KO mice showed a change in the spontaneous alternation percentage in the Y-maze test, which was significantly improved by DCE treatment. **(D)** CrT deletion progressively deteriorates spatial learning and memory in KO mice. Left, learning plot for the three group of animals (WT, CrT KO mice and DCE-treated KO mice). A significant difference was detected between WT and CrT KO mice as well as between WT and DCE-treatd CrT KO mice (p<0.0001). Right histograms showing the mean swimming path covered to locate the submerged platform on the last day of training. Four starting positions arbitrarily designated North (N), South (S), East (E), and West (W) were selected, thus dividing into 4 quadarants were the mice were allowed to search for the escape platform. A significant difference was detected between WT and DCE-treated CrT KO mice in the SO position (p<0.001). In the NE position, a significant difference was detected between WT and DCE-treated KO-DCE mice as well as between WT and CrT KO mice (p<0.0001). The data are the mean±s.e.m. Statistical analysis was performed by one-way or two way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or 2 way ANVOA followed by. *p<0.05; **p<0.001;***p<0.0001; ns=not significant.

cortical, hippocampal, cerebellar, and brainstem tissues and muscle tissue as a control was carried out for each mouse in WT, vehicle-treated CrT KO mice and DCE-treated CrT KO mice.

High-resolution tandem mass spectrometry (MS) analysis of the 120 biological samples generated a large dataset comprising of 7,006,153 MS/MS spectra showing the abundance of 4,035 proteins for the five tissues from each mouse. Following unsupervised filtering and normalization (Hachim et al., 2020) (Supplementary Table 1), the proteins whose abundance was significantly altered by mutant CrT and DCE treatment were identified using reproducibility-optimized statistical testing in each of the five tissue types. The workflow of the bioinformatics analysis is described in Supplementary Figure 1.

The muscle was considered a control for protein analysis due to the fact that Cr levels are decreased in muscle as well. Even if the mice do have a muscle phenotype, we have shown that the learning deficits are independent of any somatic problems the mice may have hence in this study we wanted to compare various regions of the brain to tissue that is not related to the brain, which in this case is the muscle. In addition, we did a global coefficient of variation (CV) calculation of all the proteins abundance between DCE, Veh, and WT for each of the 4 brain regions as well as muscle. The results show that the least variation is in the muscle tissue with CV less than 4,000. However, all the 4 brain regions had CV of more than 5,000 [cortex (5692.59), hippocampus (5166.71), brain stem (5519.19)] with cerebellum being the highest at 5948. This shows that there are some alteration in muscle but not as much as we see in the 4 different brain regions.

A total of 376, 322, 163, and 321 proteins were found to be differentially abundant in the cortex, cerebellum, brainstem and hippocampus, respectively, between WT mice and vehicle-treated CrT KO mice. The abundances of 320, 416, 279, and 323 proteins in the cortex, cerebellum, brainstem and hippocampus, respectively, were marked altered in DCE-treated CrT KO mice compared with vehicle-treated CrT KO mice (Supplementary Figures 2A–D, 3B,D,F,H), while 413, 223, 176 and 175 proteins were differentially abundant in

10.3389/fnmol.2023.1118707

DCE-treated CrT KO mice compared with WT mice (Supplementary Figures 3A,C,E,G). Overlapping proteins were observed in the comparisons of DCE-treated vs. vehicle-treated mice CrT KO, DCE-treated CrT KO vs. WT mice, and vehicle-treated CrT KO vs. WT mice. Most of the overlapping proteins in the comparison between DCE-treated vs. vehicle-treated mice CrT KO and vehicle-treated CrT KO vs. WT mice were found in the cortex (98 proteins) (Figure 2A), cerebellum (153 proteins) (Figure 2B), and hippocampus (126 proteins) (Figure 2C); conversely, fewer overlapping proteins were found in the brainstem (53 proteins) (Figure 2D; Supplementary Table 2). The proteins whose abundances were altered in vehicle-treated mice and DCE-treated mice compared with WT mice were also selected in cortex (11 proteins) (Figure 2A), cerebellum (7 proteins) (Figure 2B), hippocampus (10 proteins) (Figure 2C) and brain stem (1 protein) (Figure 2D; Supplementary Table 2).

The overlapping proteins whose abundances were significantly altered in all CrT KO mice compared to that in WT mice and in DCE-treated mice CrT KO mice compared to that in vehicle-treated CrT KO mice were then selected for pathway analysis using gene set enrichment analysis carried out using ENRICHR. The proteins found to be involved in different diseases and pathways were selected for subsequent analysis [Cortex (41 proteins), Hippocampus (53 proteins), Cerebellum (52 proteins), and brain stem (25 proteins)]. These findings suggest that lack of Cr into the brain of CrT KO mice leads to a significant alteration of protein abundance involved in the pathogenesis of CTD.

Identification of a panel of 14 proteins in the brain involved in cognitive activity using a multivariate statistical model

A multivariate statistical model comparing WT mice with vehicle-treated CrT KO mice (Figure 2E) and DCE-treated CrT KO mice with vehicle-treated CrT KO mice was used to identify key proteins (Figure 2F). Among the proteins whose abundances were affected by either CrT deficiency or DCE treatment, that were discussed in the previous section, bioinformatics analysis and statistical modelling identified 14 proteins that were the most abundant in the four different brain regions in both vehicle-treated and DCE-treated CrT KO mice. Those most abundant proteins were significantly altered by the mutation compared to WT(vehicle-treated vs. WT) and by the treatment compared to vehicle (DCE-treated vs. vehicle treated) and their abundance after treatment was restored to levels comparable to those in WT mice (Figure 3A; Supplementary Tables 3, 4).

The results showed that PLCB1 abundance in the cortex ($p = 0.0003$) (Supplementary Table 3a); MeCP2 ($p = 0.022$), ANK1 ($p = 0.0001$), and ANXA5 ($p = 0.00004$) abundance in the cerebellum (Supplementary Table 3c); and IGSF8 ($p = 0.00036$) abundance in the hippocampus (Supplementary Table 3b) were significantly downregulated in vehicle-treated CrT KO mice compared with WT mice, DCE treatment significantly rescued the abundance of these proteins in these brain regions in CrT KO mice (Figure 3A; Supplementary Table 4). In contrast, NCAM1 ($p = 1.38E-07$), PI4KA

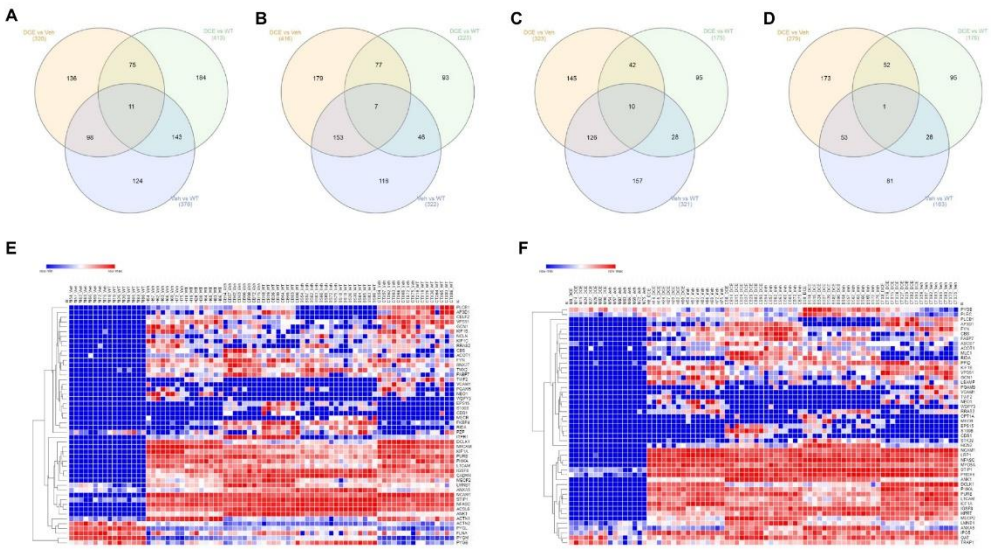


FIGURE 2
Comparison of proteomic signatures in different brain regions among the different experimental groups. **(A–D)** Venn diagram showing overlapping proteins among the three experimental groups. The proteins that showed a significant change in abundance in CrT KO mice compared with the WT and in DCE-treated mice compared with vehicle-treated mice were selected for pathway analysis. The proteins that showed a change in abundance in the vehicle-treated mice and the DCE-treated mice compared with the WT mice were also selected for pathway analysis. The abundances of these proteins in the cortex, cerebellum, brainstem, hippocampus and muscle were analyzed using a multivariate statistical model based on one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. **(E)** Heatmap showing the proteins that showed a significant change in abundance in vehicle-treated CrT KO mice compared WT mice. **(F)** Heatmap showing the proteins that showed a significant change in abundance in DCE-treated CrT KO mice compared with vehicle-treated CrT KO mice.

10.3389/fnmol.2023.1118707

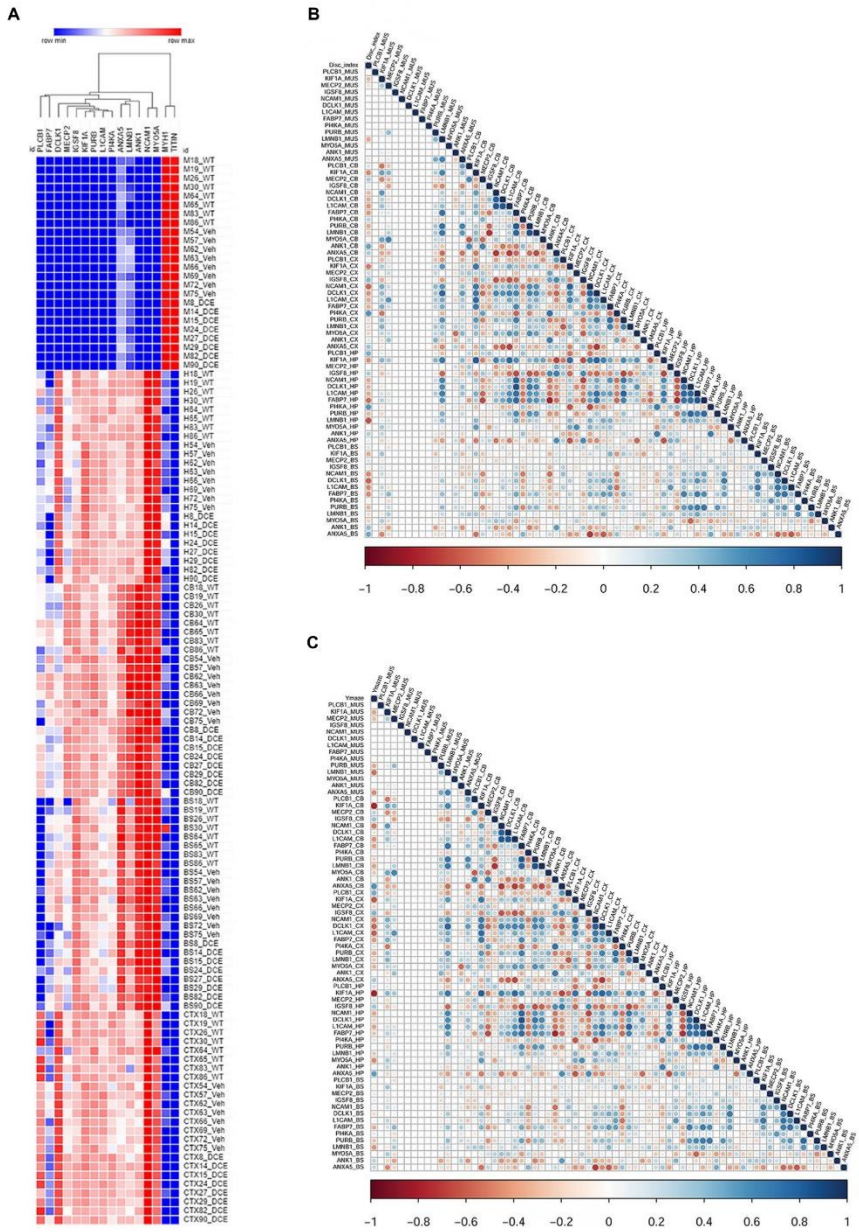


FIGURE 3
Correlation of the levels of 14 proteins with performance in different cognitive tests using a stepwise regression statistical model. **(A)** Heatmap showing the abundance levels of the 14 proteins that showed significant changes in abundance in both vehicle-treated CrT KO mice and DCE-treated CrT KO mice. **(B)** Map showing the correlation between the level of each of the 14 proteins with performance in the ORT to evaluate cognition. **(C)** Maps showing the correlation between the level of each of the 14 proteins and performance in the Y-maze test. The correlation maps were derived using a stepwise regression model to assess the correlation between the abundance each of the 14 differentially expressed proteins and performance in each of the cognitive tests. Group comparisons were carried out using a statistical model based on one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for multiple comparisons.

($p = 0.026$), DCLK1 ($p = 3^{-15}$) and PURB ($p = 0.045$) abundance in the cortex (Supplementary Table 3a); KIF1A ($p = 2^{-24}$), NCAM1 ($p = 0.038$) and L1CAM ($p = 0.001$) abundance in the hippocampus (Supplementary Table 3b); and LMNB1 ($p = 1E^{-05}$), FABP7 ($p = 8.30E^{-05}$), and PURB ($p = 0.03$) abundance in the cerebellum (Supplemental Table 3c) were significantly upregulated in CrT-treated vehicle KO mice compared with WT mice but were not different between WT and DCE-treated CrT KO mice (Figure 3A; Supplementary Table 4).

Correlation of the proteins with cognitive behavioral tests using stepwise regression statistical model shows KIF1A is abundant across the brain regions

A stepwise regression model was used to assess the effect of each of the proteins of interest on cognitive outcomes to identify those that may influence cognitive function. The levels of several proteins were significantly correlated with the discrimination index (DI); the correlation between KIF1A, Fabp7 and L1CAM levels and DI was found in the hippocampus, cortex, cerebellum and brain stem ($n = 11$, Supplementary Table 5a).

We also observed that the level of LMNB1, which is involved in cerebellar ataxia and adult autosomal dominant leukodystrophy ($r^2 = -0.634$, $p < 0.0001$), and the level of Pi4KA ($r^2 = -0.634$, $p = 0.066$) in the hippocampus were correlated with the DI. Several proteins were also significantly correlated with the performance in the Y-maze test ($n = 11$, Figure 3C, Supplementary Table 5b). The level of KIF1A, a kinesin that transports synaptic vesicle precursors, was most strongly correlated with the spontaneous alternation rate in the Y-maze test (hippocampus: $r^2 = -0.795$, $p < 0.0001$; cortex: $r^2 = -0.608$, $p = 0.001$; cerebellum: $r^2 = 0.774$, $p < 0.0001$). Fabp7 and L1CAM correlated with the spontaneous alternation rate in the Y-maze test in the 3 brain regions (Supplementary Table 5b). In addition, PLCB1 is significantly more abundant in the cortex compared to other brain regions and its abundance in the cortex and hippocampus is correlated with DI and Y-maze ($p = 0.01$).

Amongst the 14 key proteins with individual animal performance in different cognitive tests, KIF1A was shown to be the protein with the most uniformly abundance across the 4 brain regions and correlated with the DI in the novel object recognition test and spontaneous alternation in the Y-maze test.

KIF1A and PLCB1 interplay is associated with DCE treatment efficacy in CrT KO mice

KIF1A participates in vesicular transport, and vesicles containing the neurotrophin BDNF have been found to be under the control of KIF1A (Kondo et al., 2012). BDNF is produced in the neocortex throughout brain development and accelerates the overall redistribution of cortical neurons (Iki et al., 2005). DCE-mediated rescue of KIF1A levels in the cortex (Figure 4A), hippocampus (Figure 4B), and cerebellum (Figure 4C) of CrT KO mice resulted in higher levels of pro-BDNF/BDNF ($p = 0.0043$; Figure 4D) a long-term potentiation (LTP) biomarkers, which are linked to cognitive function improvement. These results indicate that KIF1A is a potential key player in CTD pathogenesis.

In order to highlight the central role of KIF1A abundance across the different brain regions of CrT KO mice, proteins co-immunoprecipitated together with KIF1A were identified by MS. Shotgun proteomics revealed that KIF1A and PLCB1 could be co-immunoprecipitated with anti-KIF1A antibody from cortical and hippocampal extracts (Supplementary Table 6). In addition, PLCB1 abundance was correlated with the DI in the object recognition test (Supplementary Table 5a) and spontaneous alternation rate in the Y-maze test (Supplementary Table 5b) (hippocampus: $r^2 = 0.460$, $p = 0.012$; cortex: $r^2 = 0.469$, $p = 0.01$, respectively). Therefore, further downstream functional analysis focused on KIF1A and PLCB1 proteins.

Additional analysis confirmed the abundance of PLCB1 by Western blotting (Figures 4F–H). The results showed that PLCB1 level decreased in the cortex (Figure 4F) and hippocampus (Figure 4G) in vehicle-treated CrT KO mice, while DCE-treated CrT KO mice showed a significant increase in PLCB1 levels in the cortex ($p = 0.0004$) compared to the hippocampus and cerebellum (Figure 4H).

DCE-mediated upregulation of PLCB1 levels in the cortex might might involved the NF-κβ pathway *via* dysregulation of a PKCα inhibitor, IκBα, thereby altering the abundance of NF-κβ-inducible genes. Thus, IκBα abundance was evaluated to determine whether the DCE-induced increase in PLCB1 levels affects targets downstream of this pathway. Western blotting indicated that IκBα (Figure 4I) ($p < 0.05$) but not IκBβ (Figure 4J) was significantly downregulated in the cortex in vehicle-treated CrT KO mice, while DCE treatment rescued IκBα protein levels in CrT KO mice ($p = 0.008$), suggesting that PLCB1 is involved in NF-κβ regulation in these mice.

Discussion

The present study focuses on the CTD pathogenesis and the underlying mechanisms of DCE drug efficacy in CrT KO mouse model engineered to mimic the clinical features of CTD patients. Shotgun proteomics analysis, integrative bioinformatics and statistical modeling identified 14 key proteins that are dysregulated in the cerebellum, cortex, hippocampus and brain stem of *Slc6a8*$^{-/y}$ mice compared to WT mice and modulated by DCE. Notably, 13 of these proteins are related to ID disorders in human, including autism spectrum disorders (MECP2, Hammer et al., 2002; Shibayama et al., 2004; Wen et al., 2017), KIF1A (Weller and Gartner, 2001; Esmaeeli Nieh et al., 2015; Lee et al., 2015; Ohba et al., 2015; Padiath, 2016; Dai et al., 2017; Tomaselli et al., 2017), PLCB1 (Rusciano et al., 2021), NCAM1 (Arai et al., 2004; Atz et al., 2007; Gray et al., 2010; Varea et al., 2012), ANXA5 (Esmaeeli Nieh et al., 2015; Lee et al., 2015; Tomaselli et al., 2017), bipolar disorder (FABP7, Killoy et al., 2020), NCAM1, PLCB1 (Lo Vasco et al., 2013; Yang et al., 2016), axonal neuropathy (DCLK1), ID (KIF1A, Ohba et al., 2015), L1CAM (Weller and Gartner, 2001), regulation of neurite outgrowth (IGSF8, Ray and Treloar, 2012), leukodystrophy (LMNB1), cerebellar ataxia (LMNB1, Padiath, 2016; Dai et al., 2017), abnormal behavior (PI4KA, Pagnamenta et al., 2015), epileptic encephalopathies (PLCB1, MYO5A), or neurodegenerative diseases (ANK1, De Jager et al., 2014). Our findings suggest a profound alteration of the molecular landscape of the brain area of CrT KO mice, and DCE treatment

10.3389/fnmol.2023.1118707

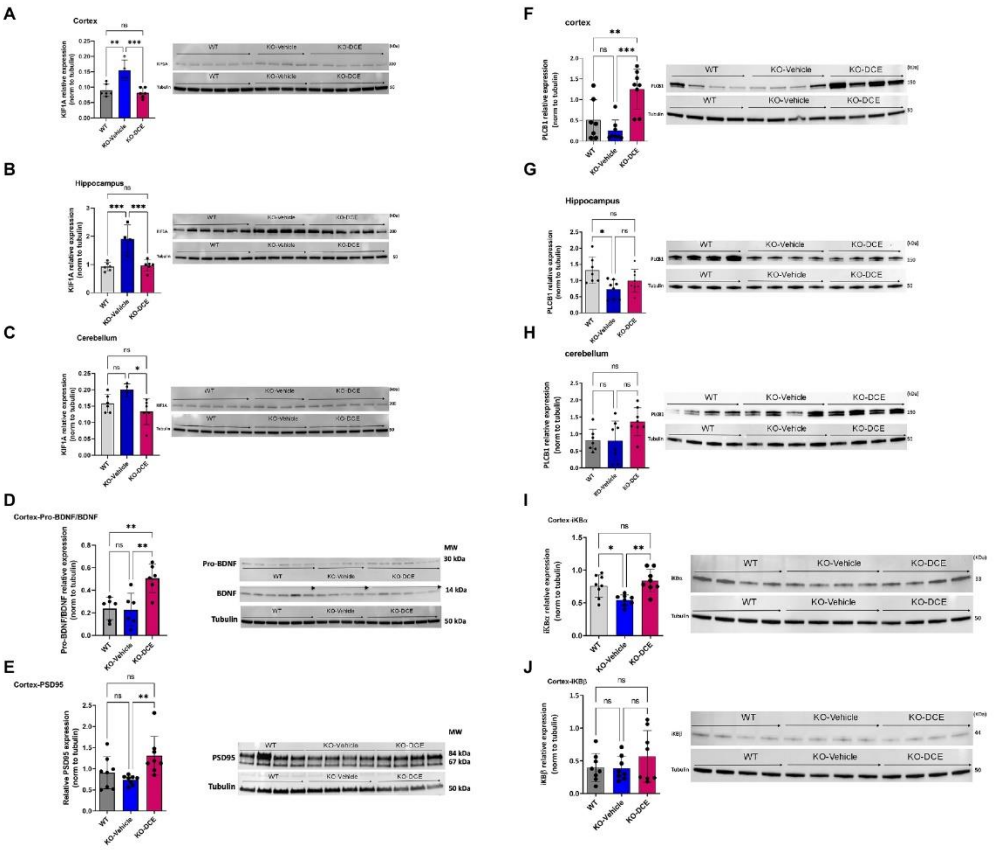


FIGURE 4
KIF1A and PLCB1 interplay is associated with DCE treatment efficacy in CrT Ko mice. **(A–C)** Western blot results showing that the KIF1A level was significantly increased in the cortex **(A)**, hippocampus **(B)** and cerebellum **(C)** in vehicle-treated CrT KO mice compared to WT mice, while DCE treatment rescued this overabundance in the three brain regions in CrT KO mice. **(D, E)** Western blot results showing that the pro-BDNF/BDNF ratio **(D)** was significantly altered in DCE-treated CrT KO mice compared to that of both WT mice and vehicle-treated CrT KO mice. In addition, the PSD95 level **(E)** was significantly altered in the cortices of vehicle-treated CrT KO mice compared to that of DCE-treated CrT KO mice. **(F–H)**, Western blotting showed that PLCB1 protein (150kDa) abundance was increased in the cortex **(F)**, hippocampus **(G)** and cerebellum **(H)** in CrT KO mice at 0days after DCE treatment. **(I,J)** Western blot results for Ibα **(I)** and IκBβ **(J)** showing that DCE promotes IκBα transcription factor abundance but not IκBβ transcription factor abundance. The data are the mean±s.e.m. (n=8/group). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Tubulin was used as a loading control. *$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.001$; ***$p \leq 0.0001$; ns=not significant.

changed a subset of those proteins. The hippocampus is crucial for spatial memory formation, while the Y-maze deficits are more rooted in the prefrontal cortex or the neocortex at the anterior end of the brain-than the hippocampus. The prefrontal cortex is an interconnected set of neocortical areas that have pattern of connectivity with all sensory neocortical and motor systems and a wide range of subcortical structures (Barnes and Pandya, 1992). The cerebellum is strongly interconnected with the cerebral hemispheres in both feedforward (cerebral hemispheres to cerebellum) and feedback directions (Schmahmann and Pandya, 1997). Since functional imaging and neuronal activation studies have shown that the sub-brain regions such as cortex, the cerebellum and the hippocampus are involved in the storage and retrieval of spatial memory and in the formation of spatial memory (Maviel et al., 2004), we were interested by the identification of subset of proteins correlated with the cognitive trajectory of CrT KO mice. Correlation analysis was performed using a stepwise regression model between the 14 selected proteins affected both by the mutation and DCE treatment.

Out of these 14 proteins, KIF1A abundance in the four brain regions (cortex, hippocampus, cerebellum and brain stem) was significantly correlated with DI in the object recognition test, while the abundance of this protein in the hippocampus, cortex and cerebellum correlated with the spontaneous alternation the Y-maze tests. Co-immunoprecipitation analysis using Western blotting confirmed that KIF1A interacts with PLCB1 in the various brain regions, suggesting a key role of KIF1A in CTD. The main observations of this study are summarized in Figure 5. These results confirm what has been reported in the literature regarding the association of KIF1A

10.3389/fnmol.2023.1118707

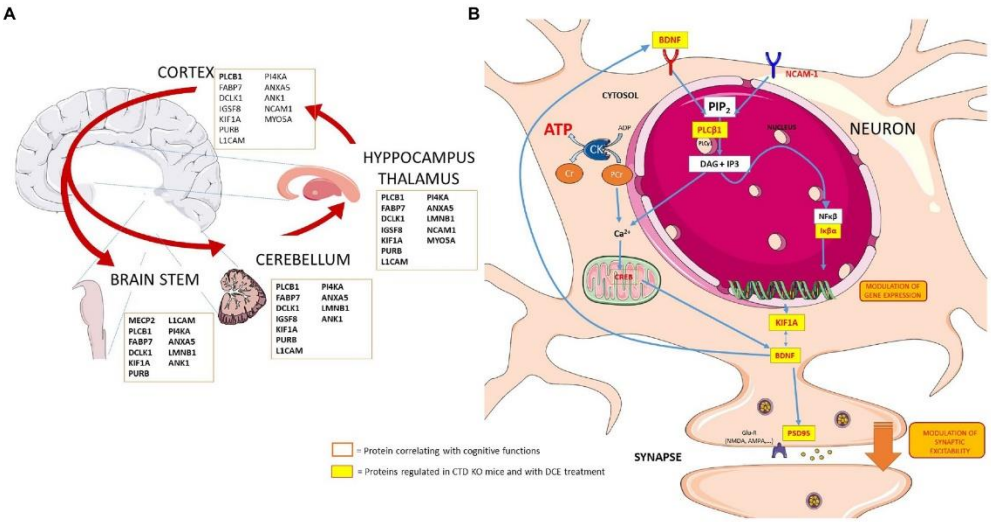


FIGURE 5
Schematic presentation showing the key players in the different brain regions and potential links between several proteins that are regulated in neurons in the context of CTD and by DCE treatment. **(A)** Proteins regulated by DCE in CrT KO mice. **(B)** DCE mediated the abundance of PLCB1. DCE-mediated upregulation of PLCB1 levels in the brain might lead to the production of inositol-1,4,5-triphosphate (IP3), and IP3 modulates the NF-κβ pathway *via* dysregulation of a PKCα inhibitor, IκBα, thereby altering the expression of NF-κβ-inducible genes which regulates the NF-κβ pathway by rescuing IκBα protein levels in CrT KO mice. NF-κβ is bound by IκBα and then translocates to the nucleus to activate target genes including KIF1A and BDNF.

and PLCB1 to cognitive function in different brain disorders (Manning et al., 2012; Lee et al., 2015).

Novel object recognition test is a valid cognitive task focusing on mostly hippocampal function. CTD increased the abundance of KIF1A. These changes suggest that anteretrograde axonal transport may be impaired in hippocampal neurons which may lead to changes in synaptic proteins, thus contributing to changes in hippocampal neurotransmission and to cognitive and memory impairments. In a rat model of α-synucleinopathy, elevated levels of KIF1A were observed in substantia nigra (Chung et al., 2009), suggesting the possibilily of the imbalance in protein degradation and synthesis and/or axonal transport deficit. KIF1A mutations have been found in patients with a severe neurodevelopmental disorder with Rett syndrome patients (Wang et al., 2019). KIF1A has been found to participate in vesicular transport. Vesicles containing the neurotrophin BDNF have been found to be under the control of KIF1A (Kondo et al., 2012). BDNF is produced in the neocortex throughout brain development and accelerates the overall redistribution of cortical neurons. DCE-mediated rescue of KIF1A levels in CrT KO mice resulted in higher levels of pro-BDNF/BDNF, which are linked to cognitive function improvement, suggesting that normal expression of KIF1A but not overexpression might be indispensable for BDNF-mediated cognitive function. The direct effect of DCE on the regulation of pro-BDNF/BDNF expression could not be excluded. KIF1A overabundance in the developing brains of CrT KO mice likely leads to synaptic dysfunction, thus contributing to cognitive and memory impairments (Iki et al., 2005; Lu et al., 2014). This is in agreement with previous data showing the reduced cortical spine density and reductions in protein levels of several synaptic markers in the brains of Slc6a8−/y mice (Chen et al., 2021). In addition, we found that in the cortex, the abundances of the presynaptic protein IgSF8 which has been reported to be a critical regulator of brain microcircuits and neuronal function (Apostolo et al., 2020), was altered in vehicle-treated CrT KO mice compared with the abundances in WT mice. Y-maze exploits the inherent motivation of an organism to explore an unknown environment. This assay is very sensitive for assessing working memory and cognitive flexibility in mice providing a simple and widely applicable behavioural assay with exceptional translational relevance. Many parts of the brain--including the hippocampus and prefrontal cortex--are involved in this task (Maviel et al., 2004). We noticed the abundance of KIF1A across the hippocampus and cortex in CrT KO mice correlating with the cognitive performance in Y-maze test. These findings indicate that KIF1A is one of a potential key player in CTD pathogenesis.

Data from co-ip experiments indicated in Supplementary File S11 suggest that it is likely a transient complex has been formed between KIF1A and PLCB1. PLCB1 plays a major role in vesicular trafficking within the cell, thus playing a direct role in axonal transport of neurotransmitters (Hannan et al., 2001). PLCB1 dysregulated signaling is linked to several brain disorders, including epilepsy, schizophrenia, bipolar disorder, Huntington's disease, depression and Alzheimer's disease (Alberini, 2009; Cholewa-Waclaw et al., 2016). We demonstrated that DCE modulates the relative abundance of PLCB1 in different brain regions. Our data showed that PLCB1 regulates the NF-κβ pathway by rescuing IκBα protein levels in CrT KO mice. Of note, NF-κβ signaling in the brain has been implicated in regulating neuronal survival and function (Meffert et al., 2003; Kaltschmidt et al., 2006). NF-κβ is bound by IκBα and then

translocates to the nucleus to activate target genes. IκBα-deficient mice display deregulated and sustained NF-κβ activation (Lian et al., 2012), indicating a critical role for IκBα in NF-κβ regulation. CrT KO mice showed a decrease in IκBα abundance in the cortex and hippocampus, which was rescued by DCE treatment. It seems likely, DCE-mediated upregulation of PLCB1 levels in the cortex might lead to the production of inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) (Rusciano et al., 2021), and IP3 modulates the NF-κβ pathway *via* dysregulation of a PKCα inhibitor, IκBα, thereby altering the abundance of NF-κβ-inducible genes. The decrease in IκBα abundance might regulates neuroinflammation as well as spatial memory formation and synaptic plasticity, probably through BDNF signaling. Our findings are in agreement with previous observations showing that stimulation of the neuroinflammatory response through NF-κβ activation may be therapeutically beneficial (Lian et al., 2012). The regulation of neuroinflammation is also supported by the identification of NCAM1 in CrT KO mice whose abundance was altered and restored by DCE treatment; NCAM1 could participates in the structural deficits in CrT Ko mice including changes in neuronal migration and synaptogenesis.

In conclusion, the results of the study indicated that the crosstalk between KIF1A and PLCB1 mediates cognitive function in the CTD. In addition, the results identified a panel of additional 12 proteins which suggests that Slc6a8−/y mice could have structural deficits including changes in neuronal migration or synaptogenesis. To our knowledge, this is the first study that describes some of the molecular mechanisms of CTD-related cognitive dysfunction and the therapeutic effect of DCE. Furthermore, the results of the study provide further evidence regarding the efficacy of DCE in treating the cognitive symptoms of CTD and restoring the abundance of key molecular players to normal levels in several brain regions. Little is known about the underlying mechanisms of the Cr-mediated behavioral deficits. Correlating proteomic changes to behavioral deficits provide mechanistic insights into Cr-mediated changes. Future studies can be designed to investigate this relationship. This study provides a shift in research paradigms and an advancement in intervention for CTD. While CTD carrier females are reported to have a milder phenotype, it will be of interest in the future to assess the potential alteration of the molecular landscape of the brain area of for females that have a milder phenotype.

Materials and methods

Ethical considerations

All *in vivo* experiments were conducted in compliance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 and were approved by the Italian Ministry of Health (authorization number 259/2016-PR).

Generation of CrT KO mice

Male $CrT^{-/y}$ and $CrT^{+/y}$ mice were generated on the C57BL/6 J background as previously described (Baroncelli et al., 2014). The mice were housed at 22°C on a 12–12 h light–dark cycle and provided food and water *ad libitum*.

The presence of the *Slc6a8* mutation was confirmed by PCR as previously described (Baroncelli et al., 2016). Briefly, genomic DNA was isolated from tail tissue collected from P25 mice using the DNeasy® Blood & Tissue kit from Qiagen according to the manufacturer's protocol. The following primers were used for PCR amplification: F: AGGTTTCCTCAGGTTATAGAGA; R: CCCTAGGT GTATCTAACATCT; R1: TCGTGGTATCGTTATGCGCC. The amplicon sizes were as follows: $CrT^{+/y}$ allele = 462 bp; mutant allele = 371 bp.

DCE treatment

DCE was prepared as previously described (Trotier-Faurion et al., 2013). Ten milligrams of DCE was added to 0.375 g of Maisine®CC (Gattefossé) at room temperature, and then 125 mg of DHA (Sigma–Aldrich) was added. The mixture was vortexed for 5 min and shaken at 1,000 × g in a thermomixer at 30°C for 48 h. Then, the sample was centrifuged at 20,000 × g for 10 min at room temperature, and the resulting supernatant was filtered through a 0.22 µm filter, placed in another tube and stored at +4°C prior to use.

DCE was intranasally administered to CrT KO mice for 30 days as previously reported (Ullio-Gamboa et al., 2019), while wild-type (WT) and vehicle-treated mice were used as controls ($N = 8$/group). 6 µL of DCE or vehicle (Maisine®CC with DHA) was placed in the nostril. The DCE (4 mg/g) or vehicle was given twice bilaterally (12 µL total volume).

Behavioral testing

Behavioral testing started 14 days after the start of the treatment as was done previously (Baroncelli et al., 2016). Treatment continued during behavioral testing, which lasted 2 weeks, for a total of 30 days of treatment. Each mouse was subjected to all of the behavioral assessments in following order: the 24-h ORT (3 days), Y-maze test (1 day), and hidden platform MWM test (7 days).

ORT

The ORT apparatus consisted of a square arena (60 × 60 × 30 cm) made of polyvinyl chloride with black walls and a white floor as previously described (Baroncelli et al., 2016). The day before testing, the mice were individually habituated to the empty arena for 10 min. The ORT, which is based on the tendency of rodents to spend more time exploring a novel object than a familiar object, was used to measure short-and long-term memory and consisted of the sample phase and testing phase. During the sample phase, two identical objects were placed in diagonally opposite corners of the arena (approximately 6 cm from the walls), and the mice were allowed to explore the arena for 10 min. The testing phase was performed 24 h after the sample phase. An identical copy of one of the objects from the sample phase and a novel object were placed in the same locations, and the mice were returned to the arena and allowed to explore the objects for 5 min. The DI was calculated as follows: DI = (T new − T old)/(T new + T old), where T new is the time spent exploring the novel object and T old is the time spent exploring the familiar object (Baroncelli et al., 2016).

Y-maze spontaneous alternation test

The spontaneous alternation rate was measured using a Y-shaped maze with three symmetrical gray solid plastic arms at a 120-degree angle (26 cm long, 10 cm wide, and 15 cm high) as previously described (Begenisic et al., 2014; Baroncelli et al., 2016). The mice were placed in the center of the maze one at a time, and their movements were recorded for 8 min. The number of arm entries (all four limbs within an arm) and the number of triads (successive entries into all three arms) were recorded to calculate the spontaneous alternation percentage (defined as the number of triads divided by the number of possible alternations (total arm entries minus 2) multiplied by 100).

MWM test

The mice were subjected to 4 training trials per day for a total of 7 days. The apparatus consisted of a circular water tank (diameter, 120 cm; height, 40 cm) filled with water (23°C) to a depth of 25 cm. The water was made opaque by the addition of nontoxic white paint. Four starting positions arbitrarily designated the north (N), south (S), east (E), and west (W) positions were selected, thus dividing the tank into 4 quadrants. A square escape platform (11 × 11 cm) was submerged 0.5 cm below the water surface in the middle of one of the 4 quadrants. The mice were allowed to search for the escape platform for up to 60 s, and their swimming paths were automatically recorded by the Noldus Ethovision system. The last trial on the last training day was a probe trial, during which the escape platform was removed from the tank and the swimming paths of the mice were recorded for 60 s while they searched for the missing platform.

Proteolysis and MS

Before MS analysis, total protein (15 µg) was extracted from tissues from the five tissues, i.e., muscle, cortical, cerebellar, hippocampal and brainstem tissues, then mixed with lithium dodecyl sulfate lysis buffer (Invitrogen), and incubated at 99°C for 5 min. Samples were then separated by electrophoresis for a short amount of time (5 min) at 200 V on a NuPAGE 4–12% Bis-Tris gel in 1X MES/SDS (Invitrogen) running buffer. The gels were stained with SimplyBlue SafeStain (Thermo) for 5 min followed by an overnight wash in water with gentle agitation. The band containing the whole proteome from each sample was excised from the polyacrylamide gel and treated as previously described (Hartmann and Armengaud, 2014). The proteins were in-gel proteolyzed with trypsin gold (Promega) in the presence of 0.01% Protease Max surfactant (Promega) at 50°C for 60 min. A total of 1 µL of the resulting peptide fraction (50 µL), corresponding to approximately 300 ng of peptide, was analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) using an Ultimate 3,000 nano-LC system coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific) as described previously (Hartmann and Armengaud, 2014). The peptides were loaded on a reverse-phase PepMap 100 C18 µ-precolumn (5 µm, 100 Å, 300 µm i.d. × 5 mm, Thermo Fisher) and then resolved on a nanoscale PepMap 100 C18 nanoLC column (3 µm, 100 Å, 75 µm i.d. × 50 cm, Thermo Fisher) at a flow rate of 0.2 µL.min^{-1} using a 90-min gradient (4% B from 0 to 3 min, 4–25% B from 3 to 78 min and 25–40% B from 78 to 93 min), with 0.1% HCOOH/100% H_2O as mobile phase A and 0.1% HCOOH/80% CH3CN/20% H_2O as mobile phase B. The mass spectrometer was operated in Top20 mode, with a scan range of 350 to 1800 m/z, and selection and fragmentation were performed using a 10 s dynamic exclusion time for the 20 most abundant precursor ions. Only ion precursors with a 2+ or 3+ charge were selected for HCD fragmentation, which was performed at a normalized collision energy of 27 eV.

MS/MS spectra interpretation and differential proteomics

MS/MS spectra were assigned using Mascot Daemon software version 2.6.1 (Matrix Science) and the *Mus musculus* SwissProt database comprising 17,096 protein sequences. Peptide tolerance, MS/MS fragment tolerance, and the maximum number of missed cleavages were set to 5 ppm, 0.02 Da and 2, respectively. Carbamidomethylation of cysteine was considered a fixed modification, and oxidation of methionine was considered a variable modification. Peptides with p value ≤0.05 for homology threshold mode and proteins with at least two distinct peptides were selected (false discovery rate < 1%).

Bioinformatics analysis of proteomics data

The general workflow of the bioinformatics analysis is shown in Supplementary Figure 1. An in-house script was written using the R programming language to identify differentially expressed proteins between the three groups (WT, vehicle-treated CrT KO mice and DCE-treated CrT KO mice) in each of the five tissues, i.e., muscle, cortical, cerebellar, hippocampal and brainstem tissues. The following comparisons were analyzed: vehicle-treated CrT KO mice vs. WT mice; DCE-treated CrT KO mice vs. vehicle-treated CrT KO mice; and DCE-treated CrT KO mice vs. WT. Initially, the proteomics data were normalized using variance stabilizing normalization (VSN, Motakis et al., 2006). Proteins with at least 10 assigned MS/MS spectra across all samples were retained. An unsupervised variation filter was then applied to the proteomics data (Hamoudi et al., 2010), and samples of 8 proteins with MS/MS spectra were included. Differential abundance analysis of proteins among the different regions was carried out using a modified R package for reproducibility-optimized statistical testing (ROTS, Suomi et al., 2017). The data were sorted according to the adjusted p value based on a false discovery rate < 0.05. Reproducibility plots and principal component analysis (PCA) were used to assess the quality of the separation of the data between the various groups that were being compared. The identified differentially expressed proteins were visualized using volcano plots and heatmaps. The heatmaps were generated using unsupervised hierarchical clustering carried out on the basis of Ward linkage and Euclidean distance to assess the degree of proteomic profile separation across the four brain regions among the three groups.

Pathway analysis

Pathway analysis was performed to narrow down the differentially abundant proteins and identify their potential functions. To achieve

this, the proteins whose abundances were significantly altered in CrT KO vehicle-treated mice compared with WT mice and in DCE-treated mice compared with vehicle-treated mice were selected for subsequent pathway analysis. The proteins whose abundances were altered in vehicle-treated mice and DCE-treated mice compared with WT mice were also selected. Pathway analysis using gene set enrichment was carried out using Enrichr (Chen et al., 2013; Kuleshov et al., 2016) focusing on the following sets: BioCarta_2016, Elsevier_Pathway_Collection, GO_Biological_Process_2018, GO_Molecular_Function_2018, KEGG_2019_Human, KEGG_2019_Mouse, MSigDB_Hallmark_2020, WikiPathways_2019_Mouse, WikiPathways_2019_Human, ClinVar_2019, DisGeNET, Jensen_DISEASES, and OMIM_Disease. Relevant pathways were selected based on a cutoff of $p < 0.05$. The set of proteins found to be significantly involved in the different pathways and diseases were selected for further analysis.

Statistical analysis of the differentially expressed proteomics data

In order to identify the patterns of differentially expressed proteins across the different regions, the data identified by ENRICHR analysis was used to construct a multivariate statistical model using one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisonsacross the cortex, cerebellum, brainstem, hippocampus and muscle. The muscle was used as control for tissue other than the brain.

The stepwise regression statistical modelling was used to further reduce the marker set and identify the proteins whose abundances were significantly altered by the mutation and restored by the DCE treatment. To identify the proteins involved in cognition, a stepwise regression model was constructed to assess the correlation between the levels of the differentially expressed proteins and performance in the ORT (DI) and the Y-maze test. The results were further validated using Pearson correlation analysis of the differentially abundant proteins among the different groups.

Western blotting

Since PLCB1 and KIF1A abundance as well as their partners are associated to several brain disorders, Western blotting was used to determine their abundance as well as two inhibitors of NF-κB, IκBα and IκBβ, in dissected brain tissues. Briefly, brain tissues were homogenized in freshly prepared lysis buffer containing 20 mM Trizma-Base, 150 mM NaCl (pH 7.4) (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1% Triton X-100, 4% complete protease inhibitor cocktail and 20% mix of anti-phosphatase inhibitors using a Precellys Evolution tissue homogenizer. The samples were then centrifuged at 2500 × g for 15 min followed by 10,000 x g for 20 min to obtain lysates for electrophoresis. The proteins (10 to 20 µg) and protein standards were mixed with Laemmli buffer and loaded on 4–15% Criterion TGX Stain-Free protein gels in 1 × TGS running buffer (all from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred to a 0.2 µm PVDF membrane with the Trans-Blot Turbo RTA Midi Transfer Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The membranes were blocked for 30 min in 5% low-fat milk in TBS-0.1% Tween 20 at room temperature. The blots were probed with specific primary antibodies overnight at 4°C followed by horseradish peroxidase (HRP) secondary antibodies diluted 1:5000 or 1:50000 in 5% low-fat milk in TBS-0.1% Tween 20 at room temperature. For protein detection, the membranes were treated with ECL Prime Western Blotting reagent (Amersham, UK) or Clarity Western ECL Substrate and exposed with a ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The band density was quantified with Image Lab software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The following antibodies were used at the indicated dilutions: anti-PLCB1 (1:1000, Abcam, ab182359), anti-IκBα (1:500, Cell Signaling Technology, 4812S), anti-IκBβ (1:500, Cell Signaling Technology, 15519S), anti-PSD95 (1:2000, Merck, MABN68), anti-tubulin (1:2000, Sigma–Aldrich, T6199), and anti-KIF1A (1:1000, Abcam, ab180153).

Co-IP

Protein extract samples (200 µg) from cortex and hippocampus were adjusted to a final volume of 600 µL with binding buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, and 1X protease inhibitor) before the addition of 17.6 µL anti-KIF1A antibody and 100 U of Benzonase nuclease (Novagen 70,746–3). The mixture was incubated overnight at 4°C on a rotating wheel. Forty-three microliters of Dynabeads protein G (Invitrogen, 10003D) were washed 3 times with PBS + 0.05% Tween and once with binding buffer. The beads were then added to the immunoprecipitate and incubated for 1 h at room temperature with rotation. After incubation, the immunoprecipitate was washed twice with Benzonase buffer (20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM MgCl2, 0.1% BSA, and 1X protease inhibitor (Roche)) and incubated in Benzonase buffer supplemented with 100 U of Benzonase nuclease for 30 min at 37°C before being washed three times with washing buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.05% Tween, and 1X protease inhibitor). The immunoprecipitated proteins were eluted directly in 25 µL 1.5× Laemmli buffer supplemented with 200 mM DTT and 1 mM beta-mercaptoethanol at 95°C for 10 min before magnetic separation of the beads and MS. MS was carried out under similar conditions as those for the brain protein extracts except that the nano-UPLC gradient was reduced to 60 min.

Data availability statement

The MS and proteomics dataset is available through the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (https://www.ebi.ac.uk/pride/) under dataset identifiers PXD024968 and 10.6019/PXD024968.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by All *in vivo* experiments were conducted in compliance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 and were approved by the Italian Ministry of Health (authorization number 259/2016-PR).

Author contributions

AM was responsible for project administration, conceptualization, funding acquisition and writing of the manuscript. FC and LB administered drugs to the mice, conducted behavioral studies, and collected brain samples. EP administered drugs to the mice and performed genotyping and the behavioral studies. AC-G, LBB, and NC conducted biochemistry experiments. EM and CS conducted the Co-IP experiments. J-CG and JA designed and conducted the proteomic experiments. RaH and RiH conducted mathematical and statistical modeling of the proteomics data as well as bioinformatics analysis. MS, RaH, LB, JA, RiH, HB, and TJ participated in the writing and review of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by Jerome Fondation Lejeune grant and by X-traordinaire, which is a patient group dedicated to rare intellectual disabilities. AM is funded by Foundation Lejeune grant; RiH is funded by the University of Sharjah - Skotech collaborative Artificial Intelligence for Life (AIfoL) award (grant no: AIfoL-2201).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1118707/full#supplementary-material

References

Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* 89, 121–145. doi: 10.1152/physrev.00017.2008

Apostolo, N., Smukowski, S. N., Vanderlinden, J., Condomitti, G., Rybakin, V., Ten Bos, J., et al. (2020). Synapse type-specific proteomic dissection identifies IgSF8 as a hippocampal CA3 microcircuit organizer. *Nat. Commun.* 11:5171. doi: 10.1038/s41467-020-18956-x

Arai, M., Itokawa, M., Yamada, K., Toyota, T., Arai, M., Haga, S., et al. (2004). Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese individuals. *Biol. Psychiatry* 55, 804–810. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.01.009

Atz, M. E., Rollins, B., and Vawter, M. P. (2007). NCAM1 association study of bipolar disorder and schizophrenia: polymorphisms and alternatively spliced isoforms lead to similarities and differences. *Psychiatr. Genet.* 17, 55–67. doi: 10.1097/YPG.0b013e328012d850

Barnes, C. L., and Pandya, D. N. (1992). Efferent cortical connections of multimodal cortex of the superior temporal sulcus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 318, 222–244. doi: 10.1002/cne.903180207

Baroncelli, L., Alessandri, M. G., Tola, J., Putignano, E., Migliore, M., Amendola, E., et al. (2014). A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Res* 3:228. doi: 10.12688/f1000research.5369.1

Baroncelli, L., Molinaro, A., Cacciante, F., Alessandri, M. G., Napoli, D., Putignano, E., et al. (2016). A mouse model for creatine transporter deficiency reveals early onset cognitive impairment and neuropathology associated with brain aging. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4186–4200. doi: 10.1093/hmg/ddw252

Begenisic, T., Baroncelli, L., Sansevero, G., Milanese, M., Bonifacino, T., Bonanno, G., et al. (2014). Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of down syndrome. *Neurobiol. Dis.* 63, 12–19. doi: 10.1016/j.nbd.2013.11.010

Braissant, O., Henry, H., Beard, E., and Uldry, J. (2011). Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* 40, 1315–1324. doi: 10.1007/s00726-011-0852-z

Bruun, T. U. J., Sidky, S., Bandeira, A. O., Debray, F. G., Ficicioglu, C., Goldstein, J., et al. (2018). Treatment outcome of creatine transporter deficiency: international retrospective cohort study. *Metab. Brain Dis.* 33, 875–884. doi: 10.1007/s11011-018-0197-3

Cheillan, D., Joncquel-Chevalier Curt, M., Briand, G., Salomons, G. S., Mention-Mulliez, K., Dobbelaere, D., et al. (2012). Screening for primary creatine deficiencies in French patients with unexplained neurological symptoms. *Orphanet J. Rare Dis.* 7:96. doi: 10.1186/1750-1172-7-96

Chen, E. Y., Tan, C. M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G. V., et al. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14:128. doi: 10.1186/1471-2105-14-128

Chen, H.-R., Zhang-Brotzge, X., Morozov, Y. M., Li, Y., Wang, S., Zhang, H. H., et al. (2021). Creatine transporter deficiency impairs stress adaptation and brain energetics homeostasis. *JCI Insight* 6:e140173. doi: 10.1172/jci.insight.140173

Cholewa-Waclaw, J., Bird, A., von Schimmelmann, M., Schaefer, A., Yu, H., Song, H., et al. (2016). The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the nervous system. *J. Neurosci.* 36, 11427–11434. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2492-16.2016

Chung, C. Y., Koprich, J. B., Siddiqi, H., and Isacson, O. (2009). Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J. Neurosci.* 29, 3365–3373. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5427-08.2009

Clark, A. J., Rosenberg, E. H., Almeida, L. S., Wood, T. C., Jakobs, C., Stevenson, R. E., et al. (2006). X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum. Genet.* 119, 604–610. doi: 10.1007/s00439-006-0162-9

Dai, Y., Ma, Y., Li, S., Banerjee, S., Liang, S., Liu, Q., et al. (2017). An LMNB1 duplication caused adult-onset autosomal dominant Leukodystrophy in Chinese family: clinical manifestations, neuroradiology and genetic diagnosis. *Front. Mol. Neurosci.* 10:215. doi: 10.3389/fnmol.2017.00215

De Jager, P. L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L. C., Yu, L., et al. (2014). Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat. Neurosci.* 17, 1156–1163. doi: 10.1038/nn.3786

Des Roches, C. L., Patel, J., Wang, P., Minassian, B., Salomons, G. S., Marshall, C. R., et al. (2015). Estimated carrier frequency of creatine transporter deficiency in females in the general population using functional characterization of novel missense variants in the SLC6A8 gene. *Gene* 565, 187–191. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.011

Esmaeeli Nieh, S., Madou, M. R., Sirajuddin, M., Fregeau, B., McKnight, D., Lexa, K., et al. (2015). De novo mutations in KIF1A cause progressive encephalopathy and brain atrophy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 623–635. doi: 10.1002/acn3.198

Gray, L. J., Dean, B., Kronsbein, H. C., Robinson, P. J., and Scarr, E. (2010). Region and diagnosis-specific changes in synaptic proteins in schizophrenia and bipolar I disorder. *Psychiatry Res.* 178, 374–380. doi: 10.1016/j.psychres.2008.07.012

Hachim, M. Y., Hachim, I. Y., Talaat, I. M., Yakout, N. M., and Hamoudi, R. (2020). M1 polarization markers are Upregulated in basal-like breast cancer molecular subtype and associated with favorable patient outcome. *Front. Immunol.* 11:560074. doi: 10.3389/fimmu.2020.560074

Hammer, S., Dorrani, N., Dragich, J., Kudo, S., and Schanen, C. (2002). The phenotypic consequences of MECP2 mutations extend beyond Rett syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8, 94–98. doi: 10.1002/mrdd.10023

Hamoudi, R. A., Appert, A., Ye, H., Ruskone-Fourmestraux, A., Streubel, B., Chott, A., et al. (2010). Differential expression of NF-kappa B target genes in MALT lymphoma

with and without chromosome translocation: insights into molecular mechanism. *Leukemia* 24, 1487–1497. doi: 10.1038/leu.2010.118

Hannan, A. J., Blakemore, C., Katsnelson, A., Vitalis, T., Huber, K. M., Bear, M., et al. (2001). PLC-beta 1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 282–288. doi: 10.1038/85132

Hartmann, E. M., and Armengaud, J. (2014). N-terminomics and proteogenomics, getting off to a good start. *Proteomics* 14, 2637–2646. doi: 10.1002/pmic.201400157

Iki, J., Inoue, A., Bito, H., and Okabe, S. (2005). Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2985–2994. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04510.x

Jaggumantri, S., Dunbar, M., Edgar, V., Mignone, C., Newlove, T., Elango, R., et al. (2015). Treatment of Creatine transporter (SLC6A8) deficiency with Oral S-Adenosyl methionine as adjunct to L-arginine, glycine, and Creatine supplements. *Pediatr. Neurol.* 53:e362, 360–363.e2. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2015.05.006

Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prullage, M., et al. (2006). NF-kappa B regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase a/CREB signaling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2936–2946. doi: 10.1128/MCB.26.8.2936-2946.2006

Killoy, K. M., Harlan, B. A., Pehar, M., and Vargas, M. R. (2020). FABP7 upregulation induces a neurotoxic phenotype in astrocytes. *Glia* 68, 2693–2704. doi: 10.1002/glia.23879

Kondo, M., Takei, Y., and Hirokawa, N. (2012). Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron* 73, 743–757. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.020

Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., et al. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44, W90–W97. doi: 10.1093/nar/gkw377

Lee, J. R., Srour, M., Kim, D., Hamdan, F. F., Lim, S. H., Brunel-Guitton, C., et al. (2015). De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. *Hum. Mutat.* 36, 69–78. doi: 10.1002/humu.22709

Lian, H., Shim, D. J., Gaddam, S. S., Rodriguez-Rivera, J., Bitner, B. R., Pautler, R. G., et al. (2012). Ikappa Balpha deficiency in brain leads to elevated basal neuroinflammation and attenuated response following traumatic brain injury: implications for functional recovery. *Mol. Neurodegener.* 7:47. doi: 10.1186/1750-1326-7-47

Lo Vasco, V. R., Longo, L., and Polonia, P. (2013). Phosphoinositide-specific phospholipase C β1 gene deletion in bipolar disorder affected patient. *J. Cell Commun. Signal* 7, 25–29. doi: 10.1007/s12079-012-0182-2

Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 223–250. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_9

Manning, E. E., Ransome, M. I., Burrows, E. L., and Hannan, A. J. (2012). Increased adult hippocampal neurogenesis and abnormal migration of adult-born granule neurons is associated with hippocampal-specific cognitive deficits in phospholipase C-beta 1 knockout mice. *Hippocampus* 22, 309–319. doi: 10.1002/hipo.20900

Maviel, T., Durkin, T. P., Menzaghi, F., and Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305, 96–99. doi: 10.1126/science.1098180

Mazziotti, R., Cacciante, F., Sagona, G., Lupori, L., Gennaro, M., Putignano, E., et al. (2020). Novel translational phenotypes and biomarkers for creatine transporter deficiency. *Brain Commun* 2:fcaa089. doi: 10.1093/braincomms/fcaa089

Meffert, M. K., Chang, J. M., Wiltgen, B. J., Fanselow, M. S., and Baltimore, D. (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 1072–1078. doi: 10.1038/nn1110

Motakis, E. S., Nason, G. P., Fryzlewicz, P., and Rutter, G. A. (2006). Variance stabilization and normalization for one-color microarray data using a data-driven multiscale approach. *Bioinformatics* 22, 2547–2553. doi: 10.1093/bioinformatics/btl412

Ohba, C., Haginoya, K., Osaka, H., Kubota, K., Ishiyama, A., Hiraide, T., et al. (2015). De novo KIF1A mutations cause intellectual deficit, cerebellar atrophy, lower limb spasticity and visual disturbance. *J. Hum. Genet.* 60, 739–742. doi: 10.1038/jhg.2015.108

Padiath, Q. S. (2016). Lamin B1 mediated demyelination: linking Lamins, lipids and Leukodystrophies. *Nucleus* 7, 547–553. doi: 10.1080/19491034.2016.1260799

Pagnamenta, A. T., Howard, M. F., Wisniewski, E., Popitsch, N., Knight, S. J., Keays, D. A., et al. (2015). Germline recessive mutations in PI4KA are associated with perisylvian polymicrogyria, cerebellar hypoplasia and arthrogryposis. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3732–3741. doi: 10.1093/hmg/ddv117

Ray, A., and Treloar, H. B. (2012). IgSF8: a developmentally and functionally regulated cell adhesion molecule in olfactory sensory neuron axons and synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 50, 238–249. doi: 10.1016/j.mcn.2012.05.007

Rusciano, I., Marvi, M. V., Owusu Obeng, E., Mongiorgi, S., Ramazzotti, G., Follo, M. Y., et al. (2021). Location-dependent role of phospholipase C signaling in the brain: physiology and pathology. *Adv. Biol. Regul.* 79:100771. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100771

Salomons, G. S., van Dooren, S. J., Verhoeven, N. M., Cecil, K. M., Ball, W. S., Degrauw, T. J., et al. (2001). X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1497–1500. doi: 10.1086/320595

Schmahmann, J. D., and Pandya, D. N. (1997). The cerebrocerebellar system. *Int. Rev. Neurobiol.* 41, 31–60. doi: 10.1016/S0074-7742(08)60346-3

Shibayama, A., Cook, E. H. Jr., Feng, J., Glanzmann, C., Yan, J., Craddock, N., et al. (2004). MECP2 structural and 3'-UTR variants in schizophrenia, autism and other psychiatric diseases: a possible association with autism. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 128B, 50–53. doi: 10.1002/ajmg.b.30016

Stockler, S., Schutz, P. W., and Salomons, G. S. (2007). Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell. Biochem.* 46, 149–166. doi: 10.1007/978-1-4020-6486-9_8

Suomi, T., Seyednasrollah, F., Jaakkola, M. K., Faux, T., and Elo, L. L. (2017). ROTS: an R package for reproducibility-optimized statistical testing. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005562. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005562

Tomaselli, P. J., Rossor, A. M., Horga, A., Laura, M., Blake, J. C., Houlden, H., et al. (2017). A de novo dominant mutation in KIF1A associated with axonal neuropathy, spasticity and autism spectrum disorder. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 22, 460–463. doi: 10.1111/jns.12235

Trotier-Faurion, A., Dezard, S., Taran, F., Valayannopoulos, V., de Lonlay, P., and Mabondzo, A. (2013). 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. *J. Med. Chem.* 56, 5173–5181. doi: 10.1021/jm400545n

Trotier-Faurion, A., Passirani, C., Bejaud, J., Dezard, S., Valayannopoulos, V., Taran, F., et al. (2015). Dodecyl creatine ester and lipid nanocapsule: a double strategy for the treatment of creatine transporter deficiency. *Nanomedicine* 10, 185–191. doi: 10.2217/nnm.13.205

Ullio-Gamboa, G., Udobi, K. C., Dezard, S., Perna, M. K., Miles, K. N., Costa, N., et al. (2019). Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as a promising therapy for creatine transporter deficiency. *Nanomedicine* 14, 1579–1593. doi: 10.2217/nnm-2019-0059

Valayannopoulos, V., Bakouh, N., Mazzuca, M., Nonnenmacher, L., Hubert, L., Makaci, F. L., et al. (2013). Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 103–112. doi: 10.1007/s10545-012-9495-9

van de Kamp, J. M., Mancini, G. M., and Salomons, G. S. (2014). X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 715–733. doi: 10.1007/s10545-014-9713-8

Varea, E., Guirado, R., Gilabert-Juan, J., Marti, U., Castillo-Gomez, E., Blasco-Ibanez, J. M., et al. (2012). Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J. Psychiatr. Res.* 46, 189–197. doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.10.011

Wang, J., Zhang, Q., Chen, Y., Yu, S., Wu, X., and Bao, X. (2019). Rett and Rett-like syndrome: expanding the genetic spectrum to KIF1A and GRIN1 gene. *Mol. Genet. Genomic Med.* 7:e968. doi: 10.1002/mgg3.968

Weller, S., and Gartner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): mutations in the L1CAM gene. *Hum. Mutat.* 18, 1–12. doi: 10.1002/humu.1144

Wen, Z., Cheng, T. L., Li, G. Z., Sun, S. B., Yu, S. Y., Zhang, Y., et al. (2017). Identification of autism-related MECP2 mutations by whole-exome sequencing and functional validation. *Mol. Autism.* 8:43. doi: 10.1186/s13229-017-0157-5

Yang, Y. R., Kang, D. S., Lee, C., Seok, H., Follo, M. Y., Cocco, L., et al. (2016). Primary phospholipase C and brain disorders. *Adv. Biol. Regul.* 61, 80–85. doi: 10.1016/j.jbior.2015.11.003

1.4 Brevet européen

Fiche inventeur du brevet européen (PR91039_EP) « Biomarkers for cerebral metabolic disorders, and diagnostic methods using thereof », suivi de la 1re page du brevet.

Form 1002 - 1: Public inventor(s)

Designation of inventor

User reference: PR91039
Application No:

Public

Inventor		
	Name:	MABONDZO Aloïse
	Address:	91190 GIF SUR YVETTE France
	The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
Inventor		
	Name:	BROCA-BRISSON Léa
	Address:	91190 GIF SUR YVETTE France
	The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
Inventor		
	Name:	COSTA Narciso
	Address:	91190 GIF SUR YVETTE France
	The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
Inventor		
	Name:	GUYOT Anne-Cécile
	Address:	91190 GIF SUR YVETTE France
	The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
Inventor		
	Name:	ARMENGAUD Jean
	Address:	30200 BAGNOLS SUR CEZE CEDEX France
	The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
Inventor		
	Name:	HAMOUDI Rifat
	Address:	SHARJAH United Arab Emirates
	The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer

Signature(s)

EPO Form 1002 - PR91039 Page 1 of 2

[TITLE]

BIOMARKERS FOR CEREBRAL METABOLIC DISORDERS, AND DIAGNOSTIC METHODS USING THEREOF

[TECHNICAL FIELD]

[0001] The present disclosure relates to biomarkers for cerebral metabolic disorders, and their use for diagnosis methods, for assessing the efficacy of therapeutic agents for the treatment of cerebral metabolic disorders, and for screening therapeutic agents for the prevention and/or the treatment of cerebral metabolic disorders. Cerebral metabolic disorders which may be concerned are congenital creatine deficiencies.

[TECHNICAL BACKGROUND]

[0002] Intellectual disabilities and neurodevelopmental disorders represent significant health problem due to the heterogeneity of underlying causes and a lack of treatment options.

[0003] Creatine (Cr) transporter deficiency (CTD) is an X-linked inherited metabolic disease caused by *SLC6A8* (Cr transporter; CrT; 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). Mutations of the gene, which moves Cr across the blood brain barrier and into neurons, preventing the transport of Cr into the brain. Cr is essential for proper brain function, has a crucial role in energy storage and transmission, and has anti-apoptotic, antioxidant, neuroprotector and neuromodulator effects (van de Kamp, J. M., Mancini, G. M. & Salomons, G. S. X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37, 715-733, (2014)). Patients suffering from CTD have autistic-spectrum disorder with moderate to severe intellectual disabilities, behavioral disorders, development delay and seizures (Stockler, S., Schutz, P. W. & Salomons, G. S. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* 46, 149-166, (2007); Salomons, G. S. *et al.* X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: A new creatine-deficiency syndrome. American *Journal of Human Genetics* 68, 1497-1500, (2001); and DesRoches, C. L. *et al.* Estimated carrier frequency of creatine transporter deficiency in females in the general population using functional characterization of novel missense variants in the SLC6A8 gene. *Gene* 565, 187-191, (2015)). Slc6a8$^{-/y}$ (CrT KO) mice show a marked Cr depletion in the brain and

1.5 Principaux résultats et résultats complémentaires

L'expression des marqueurs de cellules progénitrices SOX2 et PAX6 dans les organoïdes cérébraux a montré que les structures ressemblant aux ventricules étaient moins organisées et définies dans les organoïdes cérébraux CTD (Figure 2A – Article 1). De plus, les organoïdes CTD présentent une plus faible expression des ARNm de ces marqueurs de progéniteurs neuraux, ainsi qu'une diminution des marqueurs de neurones GABAergiques (GABBR1) et glutamatergiques (GRIA2 et vGluT1) (Figure 2B – Article 1). Cela suggère que les organoïdes CTD ont une diminution de cellules progénitrices neurales entrainant une dérégulation de la différenciation neuronale. Nous avons également observé une diminution des marqueurs en lien avec la formation des synapses (PSD95 et CREB) dans les organoïdes CTD. Ces résultats suggèrent que les organoïdes CTD présentent un déficit de neurogenèse et de synaptogenèse. Cela est cohérent avec les données d'un modèle de souris KO CRT montrant une diminution des marqueurs synaptiques associés au déficit cognitif (Ullio-Gamboa *et al*, 2019) ainsi qu'une réduction des niveaux d'ARNm de SOX2 (Figure S4 – Article 1).

Les analyses protéomiques des organoïdes (Figure S5 – Article 1) montrent que l'abondance de 510 protéines est altérée dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes sains, tandis que l'abondance de 116, 52 et 21 protéines n'est spécifiquement modifiée que chez les patients 1, 2 et 3, respectivement (Figure 3S-U – Article 1) (liste des protéines en Annexe 2 – Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 9, qui seront utilisées dans une prochaine étude pour comprendre la physiopathologie spécifique des patients).

Afin d'identifier les voies enrichies modifiées dans les organoïdes CTD, une analyse d'enrichissement de l'ensemble des gènes (GSEA) a été réalisée sur trois paires de conditions (organoïdes sains vs CTD 1-4 ; sains vs CTD 2-3 ; sains vs CTD 3-7). Cela a permis d'identifier 142 protéines différentiellement abondantes apparaissant fréquemment dans toutes les voies enrichies. Nous avons ensuite retenu 32 protéines

dont les variations d'abondance entre organoïdes sains vs CTD étaient les plus importantes. Parmi ces 32 protéines, 21 sont associées à des pathologies dont les symptômes sont similaires aux patients CTD, tels que le trouble du spectre de l'autisme (PAK2), la déficience intellectuelle (PAK1), les troubles du neurodéveloppement (GSK3β) et les encéphalopathies épileptiques (MAP1B) (Table S6 – Article 1). De plus, les analyses ont mis en évidence que les voies de signalisation de GSK3β et SRC sont altérées dans les organoïdes CTD.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la voie GSK3β parce qu'il s'agit d'une kinase clé impliquée dans de nombreux processus cellulaires tel que la neurogenèse, la migration neuronale, la croissance des axones, la dynamique du réseau mitochondrial, la régulation des microtubules, l'autophagie et le métabolisme énergétique (Figure 42). GSK3β est une kinase qui a la particularité d'être active à l'état basal tandis que des stimulations extracellulaires inhibent l'activité de la kinase. Cette inhibition peut se faire via sa phosphorylation à la Ser9. Nous avons donc déterminé l'état d'activation de la

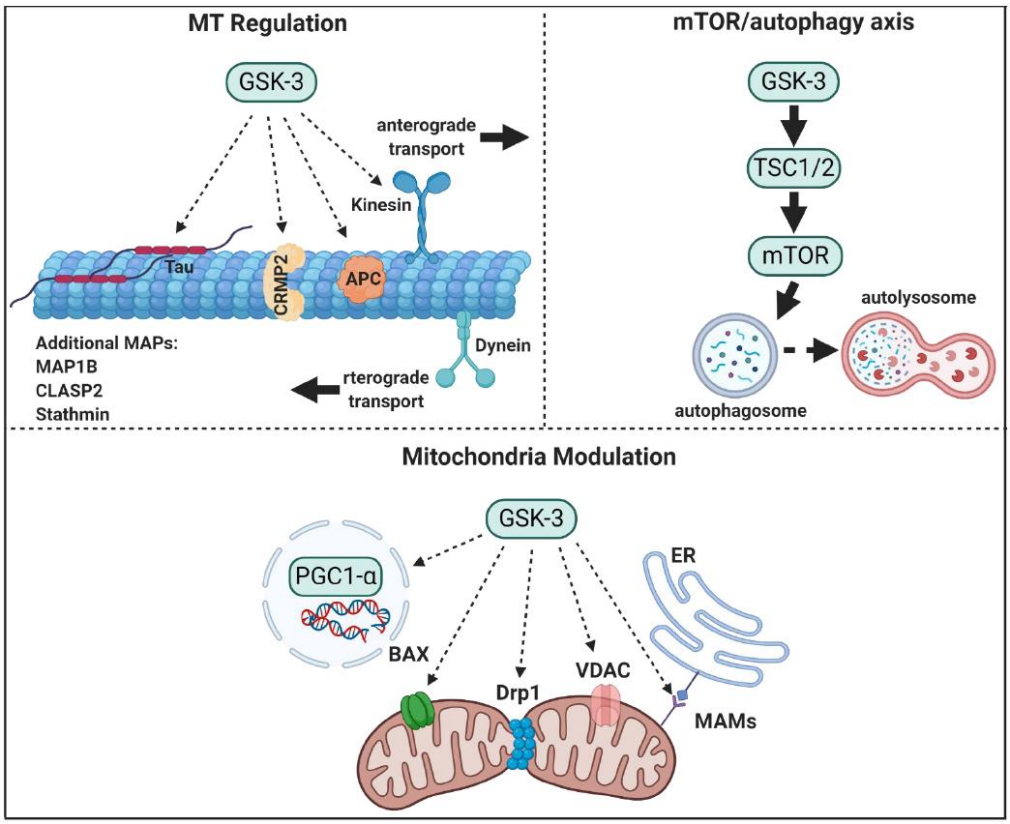


Figure 42 : Voies de régulation de la GSK3 dans les neurones

D'après Rippin and Eldar-Finkelman, 2021

kinase par western-blot. Dans les organoïdes CTD, GSK3β est moins phosphorylée au niveau de la Ser9 ce qui suggère qu'elle est suractivée (Figure 6 – Article 1).

L'expression d'un CRT fonctionnel dans les organoïdes CTD-rescue permet de normaliser l'abondance de plusieurs protéines mise en évidence par les résultats de protéomiques tel que PAK1 et MAP1B, ainsi que l'abondance de SOX2 (Figure 6 – Article 1). De plus, GSK3β semble davantage phosphorylée dans ces organoïdes CTD-rescue. Ces résultats suggèrent que ces changements sont médiés par la perte du transporteur fonctionnel dans les organoïdes CTD et souligne le rôle majeur de la créatine dans la régulation de ces protéines cérébrales.

Les analyses protéomiques sur le modèle de souris KO CRT (Article 2) nous ont permis de mettre en évidence d'autres résultats complémentaires avec ceux des organoïdes cérébraux humains. Nous avons ainsi retenu 14 protéines qui sont les plus abondantes dans les différentes régions cérébrales du modèle murin. L'abondance de ces protéines est significativement altérée entre les souris sauvages et KO CRT, et entre les souris KO CRT traitées veh et traitées DCE. Leur abondance après le traitement est restaurée à des niveaux similaires aux souris sauvages. Parmi ces protéines, KIF1A qui participe au transport vésiculaire le long des axones, est surexprimé dans le cerveau des souris KO CRT, et son abondance est régulée suite au traitement DCE (Figure 4 – Article 2). De plus, KIF1A peut contrôler le transport de vésicules contenant la neurotrophine BDNF qui est produite dans le néocortex et qui accélère la redistribution globale des neurones corticaux (Iki *et al*, 2005). La diminution des niveaux de KIF1A dans le cortex, le cervelet et l'hippocampe des souris KO CRT suite au traitement DCE entraine une augmentation des niveaux de pro-BDNF/BDNF et de PSD95 qui sont des marqueurs de la potentialisation à long terme (LTP) liés à l'amélioration des fonctions cognitives (Figure 4 – Article 2).

Les analyses protéomiques ont également mis en évidence une diminution de l'abondance de PLCB1 dans le cerveau des souris KO CRT et une régulation suite au

traitement DCE. Cette phospholipase joue un rôle important dans la transduction intracellulaire de nombreux signaux extracellulaires via la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3). Nous avons montré que les variations de l'abondance de PLCB1 sont modulées dans le même sens que les variations de l'abondance de IκBα, un inhibiteur de la voie NF-κβ (Figure 4 – Article 2), pouvant ainsi altérer l'expression de gènes induits par cette voie. De plus, PLCB1 est co-immunoprécipité avec KIF1A dans les extraits protéiques du cortex et de l'hippocampe du modèle murin. Ces résultats indiquent que KIF1A et PLCB1, ainsi que le panel des 12 protéines additionnelles, sont potentiellement des acteurs clés dans les modifications de la migration des neurones et de la synaptogenèse dans le CTD.

2. Métabolisme énergétique

2.1 Contexte

La modulation de GSK3β dans les organoïdes cérébraux CTD, mise en évidence par les observations protéomiques, suggère un potentiel impact sur le métabolisme énergétique. En effet, GSK3β est impliqué dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, ainsi que sa motilité (Yang *et al*, 2017). Cette kinase interagit également avec les différents complexes de l'OXPHOS et pourrait moduler l'homéostasie du glucose, notamment à cause de ces interactions avec la glycogène synthase (Yang *et al*, 2017; Lee & Kim, 2007). De plus, lors d'un stress dans un modèle murin KO pour une sous-unité du complexe IV de l'OXPHOS, les neurones présentent une augmentation transitoire de l'incorporation de glucose et de l'activité des enzymes de la glycolyse pour compenser le déficit énergétique (Garcia *et al*, 2022). Étant donné que la créatine joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique en permettant le stockage et la transmission de l'énergie, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le syndrome CTD peut être associé à une modification du métabolisme du glucose dans le cerveau pour compenser l'épuisement chronique de l'énergie. Dans ce contexte, l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) utilisant le [18F]2-fluoro-2-désoxy-D-glucose ([18F]FDG) est une méthode largement disponible pour évaluer le métabolisme du glucose dans le cerveau *in vivo*, chez l'animal et chez l'homme (Tournier *et al*, 2021). Dans le contexte du CTD, la TEP au [18F]FDG peut donc constituer un biomarqueur facilement disponible pour surveiller la progression de la maladie dans les études longitudinales précliniques. En outre, la TEP au [18F]FDG peut être utilisée pour estimer l'impact des traitements sur les fonctions cérébrales, avec des perspectives translationnelles pour évaluer les thérapies du CTD telles que le traitement au DCE chez les patients.

Dans l'article 3, nous avons utilisé la TEP au [18F]FDG pour comparer le métabolisme cérébral du glucose chez les souris KO CRT par rapport aux souris sauvages. Nous avons ensuite mené des études mécanistiques à la fois sur les cellules cérébrales des

souris KO CRT et sur les organoïdes cérébraux CTD afin d'approfondir la compréhension de la régulation du métabolisme du glucose dans le cerveau des patients CTD.

2.2 Article 3 : Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-derived brain organoids and *in vivo* [18F]FDG PET imaging in a mouse model

Cet article résume les résultats sur l'imagerie TEP au [18F]FDG chez les souris KO CRT, ainsi que les résultats sur les études mécanistiques de la régulation du métabolisme du glucose dans le cerveau des souris et dans les organoïdes cérébraux CTD.

L'article 3 a été soumis dans le journal *Neuropharmacology* (7 avril 2023).

Neuropharmacology

Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-brain derived organoids and in vivo [18F]FDG PET imaging in a mouse model

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	creatine transporter deficiency, dodecyl creatine ester, 18F-FDG PET, cerebral organoïds.
Corresponding Author:	Aloïse Mabondzo Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé, SPI FRANCE
First Author:	Clemence Disdier
Order of Authors:	Clemence Disdier
	Amélie Soyer
	Léa Broca-Brisson
	Sébastien Goutal
	Anne-Cécile Guyot
	Nora Ziani
	Louise Breuil
	Alexandra Winkeler
	Gaêlle Hugon
	Thomas Joudinaud
	Henri Benech
	Jean Armengaud
	Matthew Skelton
	Rania Harati
	Rifat Hamoudi
	Nicolas Tournier
	Aloïse Mabondzo
Abstract:	Creatine transporter deficiency (CTD) is an inborn error of creatine (Cr) metabolism in which Cr is not properly distributed to the brain due to a mutation in the Cr transporter (CrT) SLC6A8 gene. CTD is associated with developmental delays with neurological disability in children. Dodecyl Creatine Ester (DCE), as a Cr prodrug, is a promising drug to treat CTD after administration by the nasal route, taking advantage of the nose-to-brain pathway. In this study, the potential adaptive response to energy unbalance on glucose metabolism was investigated in CTD using both SLC6A8-deficient mice and brain organoids derived from CTD patient cells. Longitudinal brain [18F]FDG PET imaging in CrT KO mice compared to wild type demonstrated that CTD was associated with a significant loss and decline in brain glucose metabolism. In CrT KO mice, intranasal supplementation with DCE for a month significantly mitigated the decline in brain glucose metabolism compared to non-treated (vehicle) animals. Mechanistic investigations in CrT KO mice and cerebral organoids derived from CTD patient's cells suggest that intracellular trafficking of glucose transporter (Glut) may be altered by lack of activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). Consistency between observations in the CrT KO mouse model and cerebral organoids derived from CTD

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	patient's cells support the value of this new model for drug discovery and development. In addition, these results suggest that [18F]FDG PET imaging may offer a unique and minimally-invasive biomarker to monitor the impact of investigational treatment on CTD physiopathology, with translational perspectives.
Suggested Reviewers:	Madeline Lancaster mlancast@mrc-lmb.cam.ac.uk expert in neuroscience
	Olivier Braissant Olivier.Braissant@chuv.ch Expert in creatine transporter deficiency
	Andreas Schulze andreas.schulze@sickkids.ca expert in creatine congenital disorders
	Olivier Langer Oliver.Langer@ait.ac.at TEP imaging

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Cover letter

Dr Aloïse Mabondzo
Research Director
Director of Neurovascular Unit Research and Therapeutic Innovation Laboratory
CEA Saclay, Frédéric Joliot Institute
France

7th of April 2023

Dear Editor,

We would like to submit the manuscript entitled "***Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-brain derived organoids and in vivo [18F]FDG PET imaging in a mouse model"*** in the **Neuropharmacology Journal** due to the study's multidisciplinary nature.

Creatine transporter deficiency (CTD) is an X-linked (XL) disorder and is estimated to be the cause of 1-2% of all cases of XL intellectual disability (ID) and about 1% with ID of unknown aetiology. CTD patients have autistic-like features with ID, expressive speech and language delay, and epilepsy. As many individuals with ID are unable to live independently and have relatively normal lifespans, they require decades of care.

Several combinations of nutritional supplements have been attempted with very limited success as therapeutic approaches for CTD. In an intent to replenish cerebral creatine, dodecyl creatine ester (DCE) has proven to be a promising therapeutic option based on *in vitro* and preclinical *in vivo* data.

There are significant roadblocks in understanding and developing treatments for known causes of ID. There is no definitive cellular marker of cognitive ability. The primary phenotype of all causes of ID are behavioral in nature and behavior cannot be replicated using in vitro systems. Monitoring target engagement and pharmacodynamic responses in CTD patients is a great challenge. Any restoration of cognitive deficits in DCE-treated patients will likely take several weeks to months to manifest. Therefore, we need biomarkers that show DCE treatment is engaging the target systems. Proton MRS can detect creatine in the brain, but has limitations, including cost and the frequent need to sedate often non-compliant CTD patients. In addition, MRS can track brain creatine peaks in its whole but not either creatine levels inside brain cells, i.e. the site of action, or brain proteins involved in the pathophysiology of CTD. Therefore, more suitable biomarkers are needed to monitor the efficacy of future treatment of CTD.

Our recent findings highlighted changes in creatine levels in the hippocampus, cortex, striatum, and cerebellum of DCE-treated Slc6a8-/y mice. In this paper we bring new evidence of changes in alteration of energy metabolism using PET imaging as part of a 18F-DG test. Unexpectedly, the glucose uptake is decreased in CTD due to dysregulation of the response to the energy unbalance. Dysregulations of AMPK activity and cellular trafficking of the glucose transporters appear as a central mechanism responsible for this unappropriated cell functioning. Biomarkers are needed to monitor the impact of investigational treatment on the disease in animal models and patients. To put it in a nutshell [18F]FDG PET may offer a translational method to address this need in vivo.

Given the increasing importance in the understanding of the rare brain diseases and treatment, we hope that our findings will be of interest to the readers of your esteemed journal and look forward to a positive outcome towards the publication of this timely study **in Neuropharmacology Journal.**

Yours faithfully,

Dr. Aloïse Mabondzo
Research Director
Director of Neurovascular Unit Research and Therapeutic Innovation Laboratory
CEA Saclay, Frédéric Joliot Institute
France

Highlights

- Glucose uptake is decreased in CTD mouse model as measured by [^{18}F]FDG PET
- DCE intranasal treatment as a positive impact on brain glucose uptake *in vivo*
- AMPK activity and Glut trafficking are mechanism of glucose metabolism alterations
- Brain organoïds from CTD patients offer a translational tool for preclinical studies

Title page (with author information)

Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-brain derived organoids and in vivo [^{18}F]FDG PET imaging in a mouse model

Clémence Disdier[1&], Amélie Soyer[2&], Léa Broca-Brisson[3], Sébastien Goutal[2], Anne-Cécile Guyot[3], Nora Ziani[2], Louise Breuil[2], Alexandra Winkeler[2], Gaëlle Hugon[2], Thomas Joudinaud[1], Henri Bénech[1#], Jean Armengaud[4], Matthew R. Skelton[5], Rania Harati[6], Rifat A. Hamoudi[7,8], Nicolas Tournier[2#],and Aloïse Mabondzo[1,3#*]

[1] CERES BRAIN Therapeutics, Paris, France. Address: www.ceres-brain.com; ICM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

[2] Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale (BioMaps), CEA, CNRS, Inserm, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Université Paris-Saclay, Orsay, France.

[3] Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), Gif-sur-Yvette cedex 91191, France

[4] Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France

[5]Department of Pediatrics, University of Cincinnati College of Medicine and Division of Neurology, Cincinnati Children's Research Foundation, United States

[6]Department of Pharmacy Practice and Pharmacotherapeutics, College of Pharmacy, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates

[7]Clinical Sciences Department, College of Medicine, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[8]Division of Surgery and Interventional Science, University College London, London, United Kingdom.

& Authors that contributed equally to this work

[#] Senior researchers that contributed equally to this work

*Corresponding author: Dr Aloïse Mabondzo, Paris Saclay University, CEA, Medicines and Healthcare Technologies Department, Neurovascular Unit Research & Therapeutic Innovation Laboratory F-91191 Gif-sur-Yvette, France. Phone: 33 1 69081321; E-mail: aloise.mabondzo@cea.fr.

Abstract - max 250 words

Creatine transporter deficiency (CTD) is an inborn error of creatine (Cr) metabolism in which Cr is not properly distributed to the brain due to a mutation in the Cr transporter (CrT) *SLC6A8* gene. CTD is associated with developmental delays with neurological disability in children. Dodecyl Creatine Ester (DCE), as a Cr prodrug, is a promising drug to treat CTD after administration by the nasal route, taking advantage of the nose-to-brain pathway. In this study, the potential adaptive response to energy unbalance on glucose metabolism was investigated in CTD using both *SLC6A8*-deficient mice and brain organoids derived from CTD patient cells. Longitudinal brain [^{18}F]FDG PET imaging in CrT KO mice compared to wild type demonstrated that CTD was associated with a significant loss and decline in brain glucose metabolism. In CrT KO mice, intranasal supplementation with DCE for a month significantly mitigated the decline in brain glucose metabolism compared to non-treated (vehicle) animals. Mechanistic investigations in CrT KO mice and cerebral organoids derived from CTD patient's cells suggest that intracellular trafficking of glucose transporter (Glut) may be altered by lack of activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). Consistency between observations in the CrT KO mouse model and cerebral organoids derived from CTD patient's cells support the value of this new model for drug discovery and development. In addition, these results suggest that [^{18}F]FDG PET imaging may offer a unique and minimally-invasive biomarker to monitor the impact of investigational treatment on CTD physiopathology, with translational perspectives.

Manuscript Click here to view linked References

Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-brain derived organoids and in vivo [^{18}F]FDG PET imaging in a mouse model

Clémence Disdier[1&], Amélie Soyer[2&], Léa Broca-Brisson[3], Sébastien Goutal[2], Anne-Cécile Guyot[3], Nora Ziani[2], Louise Breuil[2], Alexandra Winkeler[2], Gaëlle Hugon[2], Thomas Joudinaud[1], Henri Bénech[1#], Jean Armengaud[4], Matthew R. Skelton[5], Rania Harati[6], Rifat A. Hamoudi[7,8], Nicolas Tournier[2#],and Aloïse Mabondzo[1,3#*]

[1] CERES BRAIN Therapeutics, Paris, France. Address: www.ceres-brain.com; ICM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

[2] Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale (BioMaps), CEA, CNRS, Inserm, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Université Paris-Saclay, Orsay, France.

[3] Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), Gif-sur-Yvette cedex 91191, France

[4] Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France

[5]Department of Pediatrics, University of Cincinnati College of Medicine and Division of Neurology, Cincinnati Children's Research Foundation, United States

[6]Department of Pharmacy Practice and Pharmacotherapeutics, College of Pharmacy, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates

[7]Clinical Sciences Department, College of Medicine, University of Sharjah, 27272, Sharjah, United Arab Emirates.

[8]Division of Surgery and Interventional Science, University College London, London, United Kingdom.

& Authors that contributed equally to this work

[#] Senior researchers that contributed equally to this work

*Corresponding author: Dr Aloïse Mabondzo, Paris Saclay University, CEA, Medicines and Healthcare Technologies Department, Neurovascular Unit Research & Therapeutic Innovation Laboratory F-91191 Gif-sur-Yvette, France. Phone: 33 1 69081321; E-mail: aloise.mabondzo@cea.fr.

Abstract

Creatine transporter deficiency (CTD) is an inborn error of creatine (Cr) metabolism in which Cr is not properly distributed to the brain due to a mutation in the Cr transporter (CrT) *SLC6A8* gene. CTD is associated with developmental delays with neurological disability in children. Dodecyl Creatine Ester (DCE), as a Cr prodrug, is a promising drug to treat CTD after administration by the nasal route, taking advantage of the nose-to-brain pathway. In this study, the potential adaptive response to energy unbalance on glucose metabolism was investigated in CTD using both *SLC6A8*-deficient mice and brain organoids derived from CTD patient cells. Longitudinal brain [^{18}F]FDG PET imaging in CrT KO mice compared to wild type demonstrated that CTD was associated with a significant loss and decline in brain glucose metabolism. In CrT KO mice, intranasal supplementation with DCE for a month significantly mitigated the decline in brain glucose metabolism compared to non-treated (vehicle) animals. Mechanistic investigations in CrT KO mice and cerebral organoids derived from CTD patient's cells suggest that intracellular trafficking of glucose transporter (Glut) may be altered by lack of activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). Consistency between observations in the CrT KO mouse model and cerebral organoids derived from CTD patient's cells support the value of this new model for drug discovery and development. In addition, these results suggest that [^{18}F]FDG PET imaging may offer a unique and minimally-invasive biomarker to monitor the impact of investigational treatment on CTD physiopathology, with translational perspectives.

Key words: creatine transporter deficiency, dodecyl creatine ester, 18F-FDG PET, cerebral organoïds.

1. Introduction

Intellectual disabilities (ID) and neurodevelopmental disorders represent significant health problems due to the heterogeneity of underlying causes and a lack of treatment options. Creatine (Cr) transporter deficiency (CTD) is an X-linked inherited metabolic disease caused by non-silent mutations of the *SLC6A8* gene (Braissant et al., 2011). Mutated versions of the creatine transporter (CrT) affect Cr transport across the blood brain barrier (BBB) and into neurons and other cerebral cells leading to dramatic decrease of cerebral Cr. Cr is essential for proper brain function. It has a crucial role in energy storage and transmission, and has anti-apoptotic, antioxidant, neuroprotector and neuromodulator effects (Fernandes-Pires and Braissant, 2022; van de Kamp et al., 2014). CTD is a devastating neurologic disorder that results in moderate to severe ID, epilepsy, and a lack of language development (DesRoches et al., 2015; Salomons et al., 2001; Stockler et al., 2007).

Several combinations of nutritional supplements have been attempted with very limited success as therapeutic approaches for CTD (Bruun et al., 2018; Fernandes-Pires and Braissant, 2022; Jaggumantri et al., 2015; Valayannopoulos et al., 2013). In an intent to replenish cerebral Cr, dodecyl creatine ester (DCE) has proven to be a promising therapeutic option based on *in vitro* and preclinical *in vivo* data (Trotier-Faurion et al., 2013; Trotier-Faurion et al., 2015; Ullio-Gamboa et al., 2019). The brain concentration of Cr can be estimated using magnetic resonance spectrometry (Dezortova et al., 2008). However, it takes several months Cr supplementation to improve cognition in in Cr synthesis deficient patients, another primary creatine deficiency disorder (van de Kamp et al., 2014). Clinical trials are consequently difficult to design since there is no available CTD-related biomarkers to monitor drug efficacy at the CNS level.

Different preclinical models have been proposed to investigate the CNS impact of CTD and evaluate therapeutic strategies. Slc6a8-/y (CrT KO) mice have been developed as a relevant animal model of human CTD (Skelton et al., 2011). More recently, brain organoids derived from CTD patients have been developed (Broca-Brisson et al., 2023 submitted to Cell Reports). Organoids are 3D structures that mimic the cellular organization of human organs, including the brain. Because brain organoids better

mimic the complexity of the human brain, they can potentially improve the modelling of the pathophysiology of CNS disorders. Preliminary data in CTD-derived human brain organoids showed they have low Cr uptake and their proteomes are modified compared to controls (Broca-Brisson et al., 2023 submitted to Cell Reports), making them a promising candidate to bridge the translational gap. However, consistency such mouse and human-based models have to be addressed to strengthen the discovery of CTD-related marker and providing strong converging data to support clinical trials in CTD.

It may be hypothesized that CTD may be associated with change in brain glucose metabolism to compensate the chronic energy depletion. In this framework, positron emission tomography (PET) imaging using [^{18}F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG) is widely available method to estimate brain glucose metabolism *in vivo*, in animals and humans (Tournier et al., 2021). In CTD context, [^{18}F]FDG PET may therefore provide a readily available biomarker for monitoring progression of the disease in preclinical longitudinal studies. Moreover, brain [^{18}F]FDG PET may be used to estimate the impact of treatments on brain function with translational perspectives to evaluate CTD therapy such as DCE in patients.

Therefore we here report a longitudinal study using [^{18}F]FDG PET to compare brain glucose metabolism in CrT KO vs wild-type (WT) mice, and evaluate the response to treatment with DCE, a promising drug candidate under development. To go deeper in the understanding of the regulation of brain glucose metabolism in CTD, mechanistic investigations were carried out on both CrT KO mice and CTD patients-derived organoids.

2. Methods

2.1. In vivo experiments

2.1.1. Ethical consideration

Animal experiments were conducted in compliance with the European Communities Council Directive on 22 September 2010 and were approved by French Ministry of Health (authorization number: APAFIS#7466-2016110417049220 and 24482-2020121514533158 v1).

Male CrT-/y and CrT+/y mice were generated on the C57BL/6J background as previously described (Skelton et al., 2021). The mice were housed at 22°C on a 12–12 h light–dark cycle and provided food and water ad libitum.

2.1.2. DCE formulation and *in vivo* nasal administrations

DCE was synthesized as described previously (Trotier-Faurion et al., 2013). The emulsion formulation comprised 22.3% w/w kollisolv MCT70 (BASF), 19% w/w of Montanox 80 (SEPPIC) and 56.7% w/w of normal saline. The specified amount of DCE (2%w/w) was first suspended in the mix of oil and surfactant with magnetic stirring at room temperature. The premix and the saline were preheat at 40°C. Finally, a fixed amount of preheat normal saline was added to the above mixture and stirred continuously for 10 min until obtaining an homogenous emulsion. The emulsion was kept under stirring during the cooling phase and then store at 4°C until use. The vehicle was prepared with the same process with replacement of the 2% w/w of DCE by regular saline.

DCE was intranasally administered as previously reported to CrT KO mice for 30 days (n =8), while wild-type (WT ; n=8) and vehicle-treated CrT KO mice (n = 6) were used as controls. Using a P20 micropipette, 6 µl of DCE formulation or vehicle was placed in the nostril. The intranasal treatment DCE (20 mg/g) or vehicle was given twice bilaterally (24 µl total volume) for 30 days. In the DCE treated group, each mouse received 0.48 mg of DCE daily.

2.1.3. PET study in mice

A longitudinal brain [^{18}F]FDG microPET study was conducted in wild-type (WT, n=8) *and SLC6A8*-deficient mice (KO, n=13). [^{18}F]2-fluoro 2-deoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG) for injection was obtained from Cyclopharma (Saint-Beauzire, France).

All animals underwent two subsequent [^{18}F]FDG microPET scanning, one month apart. A customized PET protocol was used to limit the impact of anaesthesia on the estimation of brain function using [^{18}F]FDG PET. Briefly, [^{18}F]FDG (0.2 mL; mean dose= 7.1 ± 0.5 MBq) was injected intraperitoneally (IP)

in awake mice (Hugon et al., 2022a; Schiffer et al., 2007). Mice were then transferred in a cage for 45 min to allow for the brain uptake of [^{18}F]FDG in awake and freely moving animals. Then, anaesthesia was induced using isoflurane 2-2.5% in O_2 to allow for PET acquisition. Anesthetized animals were rapidly transferred under the microPET scanner the brain in the middle of the field of view (Inveon, microPET; spatial resolution 1.6mm; Siemens Healthcare, Knoxville, TN, USA). A static 20 min PET acquisition was performed 50 min after [^{18}F]FDG injection under anaesthesia maintained by a facial mask (1.5-2 % isoflurane). Static brain PET acquisition was performed at the plateau of [^{18}F]FDG brain kinetics after IP injection, assuming limited impact of isoflurane anaesthesia on the time-course of [^{18}F]FDG uptake by the brain (Fueger et al., 2006; Toyama et al., 2004).

Static PET images were reconstructed by the 2D OSEM/FORE algorithm and corrected for attenuation, random coincidences and scatter. The voxel size was 0.2 x 0.2 x 0.2 mm^3. Brain PET images were corrected for radioactive decay, injected dose and body weight and was expressed as standardized uptake values (SUV), with SUV= tissue activity (kBq/cc)/[injected dose (kBq)/body weight (g)]. SUV-normalized PET images were spatially co-registered to a standard mouse [^{18}F]FDG PET template (Mirrione et al., 2007) using Pmod software (version 4.2, PMOD Technologies Ltd, Zurich, Switzerland). Quantitative SUV values were determined through a volume-of-interest (VOI) analysis in selected brain regions which size is relevant to the spatial resolution of the microPET scanner (~1.4 mm), which included thalamus, cerebellum, brain stem, striatum, hippocampus, hypothalamus, amygdala, midbrain and cortex. Regional PET data and SUV-normalized PET images were then divided by each respective SUV values obtained in the brain stem (SUVR). The brain stem was selected as a normalisation region due to its low involvement in this pathology, to obtain PET data and images with lower variability than SUV (Goutal et al., 2020). Then, a brain mask was applied on normalised PET images to keep cerebral voxels only.

SUV- and SUVR-normalized parametric PET images were generated for the radiotracer and co-registered to the mouse brain template. ΔSUVR was used to describe the % change in SUVR obtained in each mouse between session 1 and session 2 (after 1-month DCE treatment of placebo).

Corresponding ΔSUVR-normalized images were generated to perform voxel-wise statistical comparison described below.

2.2. Generation and culture of CTD patient derived brain organoids

BJ primary fibroblasts were obtained from ATCC (CRL-2522). SP Fibroblasts were isolated from normal placenta according to the protocol study approved by the local ethics committee (REC number: 18-05, Advisory Committee for the Protection of Persons in Biomedical Research Cochin Hospital, Paris,). BJ and SP-iPSCs were a generous gift of SEPIA laboratory (CEA Fontenay aux Roses). Fibroblasts from patients with confirmed diagnosis of CTD were obtained from Necker Hospital. Informed and a written consent was obtained from all anonymized human CTD subjects. Experiments were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. CTD fibroblasts were reprogrammed using the Sendai virus reprogramming method as recommended by the manufacturer (Life Technologies) and as described previously (Broca-Brisson et al., 2023). All iPSCs cell lines were maintained on hESC-qualified Matrigel (Corning®, NY, USA) in mTeSR™1 medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) and passaged using mechanical dissociation at the beginning of the establishment of the cell line. Then cells were passaged using ReLeSR™ (STEMCELL Technologies). To generate brain organoids, we followed the protocol published by Lancaster *et al* with minor modifications from Pavoni *et al* and Nassor *et al* (Lancaster and Knoblich, 2014; Nassor et al., 2020; Pavoni et al., 2018). At day 0, iPSCs were dissociated and counted. Hanging drops of 20 µl of embryoid bodies (EBs) medium containing 15000 cells per drop were cultured on a Petri dish cover to allow them to aggregate before being collected and placed in a well of a non-treated 24-well plate (Sarstedt). Media changes, neural induction and neural differentiation were performed following the published protocol (Pavoni et al, 2018; Nassor et al, 2020; Lancaster & Knoblich, 2014) with the use of an organoid embedding sheet for the matrigel embedding step (STEMCELL Technologies). Brain organoids were used at 2 months-old.

2.3 Protein extraction, proteolysis and mass spectrometry

Total pelleted cell material from individual brain organoid (1 healthy and 3 CTD, n=4 brain organoids per condition) was supplemented with lithium dodecyl sulfate lysis buffer (Invitrogen) following the ratio of 25 µl of buffer per mg of material. Glass and silica beads (200 mg) were added to each sample, which was then subjected to 10 cycles of bead beating at 10,000 rpm for 30 sec followed by 30 sec halt with a Precellys tissue homogenizer (Bertin technologies) as previously described (Hayoun et al., 2019). The supernatants were transferred to a new tube and incubated at 99°C for 5 min. A volume of 20 µl of each sample was loaded on a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Thermo). Then, the proteins were separated by a short electrophoresis migration (5 min) at 200 V with MES/SDS 1X (Invitrogen/Thermo) as running buffer. Gels were stained for 5 min with SimplyBlue SafeStain (Thermo) and then washed overnight with water with gentle agitation. The polyacrylamide band containing the whole soluble proteome from each sample was excised, treated, and proteolyzed with trypsin as recommended (Rubiano-Labrador et al., 2014). Peptides (300 ng) were analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) using an Ultimate 3000 nano-LC system coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific) operated essentially as described previously (Klein et al., 2016). Peptides were eluted from the reverse phase chromatography column for 90 min with an acetonitrile gradient. The mass spectrometer was operated in Top20 mode, with a 10 s dynamic exclusion time for the selection of peptides to be fragmented.

2.4 MS/MS spectra interpretation

MS/MS spectra were assigned using the Mascot software version 2.6.1 (Matrix Science) and the Homo sapiens SwissProt database. The maximum of missed cleavages, primary ions tolerance, and secondary ions tolerance were set at 2, 5 ppm, and 0.02 Da, respectively. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine were considered as fixed and variable modification, respectively. Peptides were identified at a p-value below 0.05. Proteins were selected when at least two distinct peptides were identified (false discovery rate below 1%). Mass spectrometry proteomics

data corresponding to the 16 nanoLC-MS/MS runs are available from the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (https://www.ebi.ac.uk/pride/) under dataset identifiers PXD040185 and 10.6019/PXD040185.

2.5. Bioinformatics for differential proteomics

2.5.1. Raw data normalization and filtering

To identify the proteins differentially abundant between healthy and IPSC-CTD derived brain organoids, raw proteomic data were normalized and filtered using an in-house script constructed using the R programming language (version 4.4.0). Briefly, the Variance Stabilizing Normalization (VSN) (Motakis et al, 2006) was applied to normalize the data and remove the background noise. An unsupervised variation filter was then applied where any four samples with MS/MS spectral count detected were included (Hamoudi et al, 2010).

2.5.2.Proteomics identification of differentially abundant proteins between heathy and CTD brain organoids

The differential analysis of the protein abundances between heathy and CTD brain organoids was carried out using modification of the R package for Reproducibility-Optimized Test Statistic (ROTS) to eliminate the bias in the data (Suomi et al, 2017). Differential expression was assessed between the following three pairs of conditions: Healthy (BJ) vs brain organoids from CTD patient (CTD1_4); Healthy (BJ) vs brain organoids from CTD patient (CTD2_3); Healthy (BJ) vs brain organoid from CTD patient (CTD3_7). The data was sorted according to p value based on Fold Discovery Rate (FDR). The differentially expressed proteins were selected by p value < 0.05 and FDR ≤ 0.25. The quality of the data separation between the various groups was assessed using Reproducibility plots and Principal Component Analysis (PCA). The identified differentially abundant proteins were visualized using volcano plots and heatmaps.

The heatmaps were generated using unsupervised hierarchical clustering carried out with Ward linkage and Euclidean distance measure to assess the degree of proteomic profile separation between the different groups as previously described (Mabondzo et al., 2023).

2.6. Validation of glucose metabolism alterations in CRT KO mice and brain organoids from CTD patients

2.6.1. Assessment of SLC2A1, SLC2A3

RNA was isolated from CTD mouse brain or CTD patients-derived organoids using the RNeasy plus universal tissue Mini kit (Qiagen, France). Total RNA was extracted with QIAZOL reagent and purified on RNEASY Plus Universal Tissue Mini Kit columns (Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, samples of brain tissue or organoids were homogenized with 1 mL of QIAZOL reagent while using a Precellys24 tissue homogenizer. A treatment for elimination of gDNA was performed. After addition of 180µL of chloroform, mixtures were centrifuged at 12 000 g for 15min at 4 °C. The resulting aqueous phases were mixed with 600µL of 70% ethanol and loaded onto RNEASY columns. Total RNA was washed and eluted with RNase-free water according to the manufacturer's protocol and stored at −80 °C. RNA concentration was measured spectrophotometrically at 260nm in a NanoDrop 2000c (Labtech France, Palaiseau, France). Sample A260 nm/A280 nm ratio about 2 indicated lack of protein and phenol contamination. cDNAs were synthesized from 0.5 µg of total RNA with the RT² HT First Strand kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol and stored at −80 °C. For qPCR, 2 µL of cDNA was mixed with 6.25µL of iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), 0.375µL of 10µM primer mix (*SLC2A1, SLC2A3, HKX1, HKX2*) and completed to 10µL with ultra-pure DNase-RNase-free distilled water. The qPCR reactions were performed in a CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with the following cycle conditions: denaturation at 95 °C for 10min, 40 cycles of 15 sec at 95 °C followed by 1min at 60 °C and fnished by 30 sec at 72 °C. Treshold cycles (Ct) of target gene and housekeeping gene (hypoxanthine

guanine phosphoribosyl transferase, HPRT) were recorded and gene expression was calculated as $2^{-\Delta Ct}$ (where ΔCt=Ct target − Ct HPRT). Specificity of PCR reactions were confirmed by melt curve analysis.

2.6.2. Assessment of dysregulated proteins involved in glucose transporters trafficking.

Western blotting was used to detect the abundance of phospho AMPK, AMPK α1 and AMPK α2. Briefly, cortex tissues of CrT KO mice and brain organoids were homogenized in freshly prepared lysis buffer of TBS 1X (Biorad) and supplemented with 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail 1X (cOmplete, Roche) and a mix of anti-phosphatase inhibitors 1X (ammonium molybdate, sodium glycerophosphate, sodium fluoride, sodium pyrophosphate, sodium orthovanadate) using a Precellys Evolution tissue homogenizer (Bertin). The samples were then centrifuged at 10000g for 20 min to produce lysate for electrophoresis. A quantity of 10 µg of proteins in Laemmli buffer and protein standard were loaded on 4%-15% Criterion TGX Stain-Free protein gel in running buffer TGS 1X (all from Bio-Rad) and transferred to a 0.2 µm PVDF membrane with the Trans-Blot Turbo RTA Midi Transfer Kit (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h in 5% low-fat milk in TBS-Tween 20 0.1% at room temperature. Blots were probed overnight at 4 °C with the following specific primary antibodies: phospho AMPK, AMPK α1 and AMPK α2 (Merck, 15-115). Primary antibodies were detected by horseradish peroxidase secondary antibodies diluted 1:10000 in 5% low-fat milk in TBS-Tween 20 0.1% at room temperature. For protein detection, membranes were exposed to the Immobilon Crescendo or Forte Western HRP substrate (Millipore) in a chemidoc touch imaging system for a measurable exposure time (Bio-Rad) and quantified with Image Lab Software (Bio-Rad).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis for PCR and western blot data was performed using GraphPad software (version 9.0). For [^{18}F]FDG PET, a one-way ANOVA and student's *t*-test were performed to compare regional SUV, SUVR and ΔSUVR values between groups. Then, comparison of parametric images ([^{18}F]FDG brain uptake obtained in each group (n=8 animals/group) during baseline acquisition and (n=4

animals/group) during treatment session, was performed using SPM12 software and a voxel-to-voxel analysis. Comparison was then performed using either an ANOVA or student *t* -test design to detect differences between groups. A significance level threshold of 0.05 (uncorrected for multiple comparisons) and a minimum cluster size of 200 voxels were selected. Only the clusters that were significant at P<0.05 levels (corrected for multiple comparisons) were considered (Vodovar et al., 2018 ; Hugon et al., 2022b). Statistical parametric maps were overlaid on mouse MRI template (Mirrione et al., 2007) to visualize which brain regions are affected by statistical differences on [^{18}F]FDG uptake.

For proteomic Statistical analysis of the differentially abundant proteomics, the data identified by ENRICHR analysis was used to construct a multivariate statistical model using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons between the healthy and CTD brain organoids.

3. Results

3.1. [^{18}F]FDG PET as a potential biomarker for the creatine transporter deficiency in CrT KO mice

The impact of CTD on brain glucose metabolism was first investigated using [^{18}F]FDG PET in CrT KO mice (Fig. 1). Visual evaluation of PET images unveiled a significantly lower uptake of [^{18}F]FDG in CrT KO *vs* WT mice. Decrease in [^{18}F]FDG uptake was predominant in subcortical regions including striatum, thalamus, midbrain and hippocampus, and very limited and non-significant in the brain stem (Suppl Fig. 1). Therefore, parametric SUVR images using the brain stem as a normalisation region were generated to take any change in the peripheral glucose or [^{18}F]FDG into account (Suppl. Fig. 1, Fig. 1A and C). Many regions anticipated to have significantly lower SUVR in CrT KO mice vs WT, suggesting lower brain glucose metabolism ($p<0.001$, Fig. 1A). Regional analysis was confirmed by statistical parametric mapping (SPM) analysis, which confirmed the lower uptake of [^{18}F]FDG in CrT KO mice *vs* WT at the voxel level, with no regional a priori ($P < 0.05$, Fig. 1B).

3.2. Impact of DCE on brain glucose metabolism in creatine knockout mice

We hypothesized that DCE may restore normal brain glucose metabolism in CrT KO mice. During session 2 (after one month of intra nasal DCE or placebo treatment), SUVR in KO untreated animals remained lower than in WT mice, consistent with results of the session 1 (Fig. 2A). However, at the regional level, there was no significant differences in [^{18}F]FDG uptake between DCE-treated and placebo-treated KO mice ($p>0.05$, Fig. 2A).

For longitudinal analysis, the % change in SUVR between session 1 (baseline) and session 2 (after one month of nasal administration of DCE or placebo) was calculated (ΔSUVR). In WT mice, mean ΔSUVR observed in selected regions reflected the test-retest variability of our [^{18}F]FDG PET method which ranged from 5.2 % in the cerebellum to 12,8 % in the striatum. At the regional level, ΔSUVR tended to be lower in WT vs placebo-treated KO mice, suggesting decline in glucose metabolism associated with CTD (Fig. 2B). Difference in ΔSUVR in placebo vs DCE-treated mice was not either significant in predefined brain regions (Fig.2B). However, voxel-wise analysis, performed with no regional a priori, showed that DCE-treatment significantly mitigated this decline in a large cluster which encompasses part of several predefined brain regions including cortical and subcortical structures ($p<0.05$, Fig. 2C). This cluster maps the brain volume where the decline in [^{18}F]FDG is mitigated by DCE in KO mice. Interestingly, this cluster is consistent with the brain volume where the decrease in [^{18}F]FDG uptake in KO vs WT mice was the most significant at session 1. Among selected brain regions, ΔSUVR values observed in the cerebellum of WT, KO, and DCE-treated KO mice were strikingly similar, suggesting limited involvement of CTD and DCE-treatment in this region, while supporting the precision and repeatability of our longitudinal [^{18}F]FDG PET design.

3.3. Investigation of glucose metabolism alterations in CRT KO mice identifies Glut trafficking as key mechanism

As the decrease [^{18}F]FDG uptake was unexpected, transcriptional expressions of glucose transporters were first investigated in CrT KO mice brains to further understand the glucose uptake regulations in the CTD pathology. The intake of glucose and [^{18}F]FDG into the cerebral cells is mediated by Glut

transporters belonging to the Solute carrier transporter family (SLC). We looked at mRNA expression of Glut 1 (*SLC2A1*) mainly expressed by astrocytes and glut 3 (*SLC2A3*) by neurons in the cortex of WT and CrT KO mice (Fig. 3). At the transcriptional level, no significant differences in Glut 1 and 3 mRNA expression were evidenced between wild type and CrT KO mice (Fig. 3). This observation suggests that decline of glucose uptake in CTD is not related to altered expression of glucose transporters Glut. Glut proteins are mostly stored in intracellular vesicular compartment and must be translocated to the cell surface to be fully functional. Thus, alterations in Gluts intracellular trafficking could lead to change in the uptake of [^{18}F]FDG. AMP-activated protein kinase (AMPK) is an energy-sensing enzyme that recognizes ATP depletion. AMPK is activated through Thr172 phosphorylation of the α-subunit. The catalytic domain from this subunit can transfer a high energy phosphate from ATP to a number of different target substrates including proteins involved in glucose transport. Activated AMPK is among other actions on glycolysis enzymes responsible for the translocation of intracellular Glut vesicles to the cell surface. We quantified the expression of activated/inactive AMPK in the brain of CrT KO Mice by western blot (Fig. 4). We demonstrated a decrease ratio of activated phospho AMPK/ AMPK α2 ($P \leq 0.05$) in the brain of CrT KO mice compared to wild type mice (Fig. 4). The ratio of activated AMPK/ AMPK α1 was not significantly decrease. These observations suggest a lack of AMPK activation in the brain of CrT KO mice while cerebral cells suffer from energy depletion. At the molecular level, the absence of activation of AMPK in the context of ATP depletion such as in CTD brain cells may explain the decrease uptake [^{18}F]FDG uptake which may be related to lack of functional Glut transporter at the cerebral cell surface.

3.4. Translational potential of brain organoids derived from CTD patient

In a second part, we investigated the translational potential of CTD patient organoids generated and cultured as previously described (Broca-Brisson et al., 2023 submitted to Cell Report). Three different cell lines from patients with different mutations of the CrT were used (Valayannopoulos et al., 2013).

3.4.1. Increase expression of key proteins implicated in glycolysis in CTD patient brain organoids

We performed extensive shotgun proteomics to identify the key protein profile of glucose metabolism pathway in brain organoids from CTD patients compared to the healthy brain organoids. From the large MS/MS dataset acquired (943,656 spectra), we identified 32,181 different peptide sequences and quantified 4,219 proteins. We focused in this study on the proteins involved in the glucose metabolism. The differential proteomic analysis demonstrated up-regulation of several enzymes implicated in the glycolysis (Fig. 5). As examples, the abundances of hexokinases 1 and 2 (HXK1 and 2) are 2.8 and 3.2 times increased in CTD organoids compared to healthy, GSK3α and β are 4.2 and 10 times increased, respectively, and enolase G (ENOG) is 3.8 times increased (supplementary table 1). This observation is consistent with our initial hypothesis of stimulation of glycolysis in CTD as an adaptive response to energy unbalance.

3.4.2. Glucose transporter mRNAs expression and AMPK regulation pathway in CTD patient brain organoids

We also assessed the transcriptional expression of glucose transporters and AMPK activation levels in CTD patient organoids to compare to regulations observed in CrT KO mice. We confirmed that there was no significance differences of transcriptional expression of Glut 1 and Glut 2 in CTD patient organoids compared to healthy (Fig. 6).

Consistently with the *in vivo* observation, there was a significant decrease of the ratio Tr172-phosphorylated AMPK/ AMPK α2 in CTD patient organoids compared with healthy brain organoids (Fig. 7A and B). The ratio to the isoform AMPK α1 was not significantly regulated.

4. Discussion

In the present study, we intended to visualize the metabolic signature of CTD in CrT KO mice and CTD patient-derived brain organoids in order to better characterize disease-related molecular mechanisms. Anaerobic glycolysis and oxidative phosphorylation continuously allow to maintain adenosine triphosphate (ATP) levels constituting energy supply for proper brain function. The Cr/ (P)Cr system complements this to serve as energy buffer and maintain constant ATP levels. Therefore, we expected that defect in Cr uptake due to non-functional CrT induces an adaptive response to the energetic unbalance by stimulating glycolysis and oxidative phosphorylation. The main findings are summarized in figure 8.

[^{18}F]FDG PET is a minimally-invasive imaging method to estimate brain glucose metabolism *in vivo* (Ref PMID: 34882261). Quantitative PET imaging may thus offer a readily available marker of CTD to monitor the pharmacological efficacy of innovative treatments in preclinical and clinical studies. For the first time, [^{18}F]FDG PET imaging data reported in the present study suggests significant decline of glucose metabolism in CrT KO mice. This suggests relevance of this translational method for quantifying the CNS impact of CTD on brain function. DCE previously demonstrated its potential to replenish creatine levels and ameliorate cognitive functions of CrT KO mice (Ullio-Gamboa et al., 2019). Interestingly, our longitudinal PET study design showed that DCE did not significantly restore normal brain glucose metabolism. However, positive impact of DCE treatment on brain function could non-invasively monitored be monitored through mitigated decline in brain glucose metabolism observed in CrT KO mice. Together, these results suggest that [^{18}F]FDG PET could be used as an outcome for inclusion and drug efficacy for future clinical trials in which a longitudinal design should be considered. The decrease of [^{18}F]FDG uptake in CrT KO mice was unexpected and goes against our initial hypothesis that was enhancement of glycolysis in CTD physiopathology. This observation suggests that either the glycolysis is not stimulated by the chronic energy depletion due to the deficiency of the Cr/ (P)Cr system, either the glucose uptake in cerebral cells is altered. We first evaluated transcriptional

expression of glucose transporters. Glut1 is the main glucose transporter at the neuron membranes whereas Glut3 is acting on the astrocytes (Koepsell, 2020; McEwen and Reagan, 2004). Analysis of mRNA expression of Glut1 (*SLC2A1*) and Glut3 (*SLC2A3*) in cortex of wild type and CrT KO mice reveals no significant modification in CTD context. This observation suggests that the regulation takes place after transcription, e.g. during trafficking of the Gluts. Gluts are mostly localized in intra cytosolic vesicles that need to be translocated to the surface. McClory et al. found that only 4% of Glut3 is located at the cell surface (McClory et al., 2014). Thus, the transcriptional expression of Gluts does not recapitulate the real functionality of the transporters. Translocation of gluts vesicles to the cell surface are mediated by AMPK (Muraleedharan and Dasgupta, 2022). Activated AMPK directly phosphorylates TXNIP and TBC1D1 in astrocytes and neurons respectively, thereby enhancing Gluts vesicles translocation to the cell surface. AMPK is activated in condition of energy deficit in particular increases AMP/ATP and ADP/ATP ratio (Steinberg and Hardie, 2022). AMPK not only activates Glut trafficking but also initiates a series of compensatory changes that maintain cellular ATP levels. As example, AMPK phosphorylates glycogen synthase to switch off glycogen synthesis and enhance ATP production through glycolysis. In the muscle of CrT KO mice, it was demonstrated that reduced ATP results in chronic AMPK activation to favor energy production (Stockebrand et al., 2018). However, in the brain of CrT KO mice, we demonstrated that AMPK is not activated. These observations suggest that CTD cerebral cells are not able to promote surface translocation of glucose transporters to enhance glucose up-take. The loss of AMPK activation in CTD cerebral cells may thus explain the decrease uptake of [^{18}F]-FDG in CrT KO mice. AMPK pathway have been implicated in neurodegeneration and other CNS pathologies (Muraleedharan and Dasgupta, 2022). Thus, AMPK pathway could be further investigated to understand the physiopathology of CTD and impact on cognitive impairment and neuropathological abnormalities.

The mice model recapitulates the main patho-physiological mechanism of CTD (Perna et al., 2016; Russell et al., 2014; Udobi et al., 2018). Nevertheless, the translation of findings generated by using transgenic mice with the same genotype has to be evaluated skeptically because of fundamental

differences between this animal model and patients with their specific mutations within the CTD transporter and their unique genomic background. We recently successfully obtained and characterized brain organoids from CTD patient cells (Broca-Brisson et al., 2023). In the present study, we confirm the translational potential of this organoid model, focusing on the regulation of glucose metabolism. Proteomic analysis of healthy *vs* CTD patient organoids indeed reveals that many key enzymes of glycolysis were up-regulated, confirming an enhancement of glycolysis in CTD physiopathology in response to the energy unbalance. Hexokinases 1 and 2 are overproduced in CTD patient-derived organoids compared to healthy. In addition, phosphofructosekinase (PFKAM) in charge of the conversion of frutose-6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate and Enolase G (ENOG) that converts 2-phosphoglycerate into phosphoenolpyruvate are also significantly overproduced in CTD organoids compared to controls.

The shotgun proteomic analysis demonstrated that cerebral cells in organoids synthesized more GSK3α/β. GSK3 phosphorylates glycogen synthase leading to inactivation of the enzyme and further degradation into the proteasome (Muraleedharan and Dasgupta, 2022). Consequently, glycose synthase is inactivated in CTD patient organoids; glucose is not stored into glycogen and immediately used in the glycolysis pathway to produce ATP. In addition, GSK3 enhances hexokinase 2 (Gimenez-Cassina et al., 2009) and phosphorylates pyruvate dehydrogenase (Hoshi et al., 1996), an important component of the mitochondrial Krebs cycle. GSK3 regulates more than 40 proteins with roles in different cellular processes including cell signaling, cell proliferation, differentiation, apoptosis, the cell cycle, the immune response, and organ development (Cormier and Woodgett, 2017; Doble and Woodgett, 2003; Grimes and Jope, 2001). The over accumulation of GSK3 in cerebral cells subsequently enhances the glucose metabolism by action on several key proteins but also acts on many other cellular processes. During the characterization of CTD patient-derived organoids, we consistently demonstrated this upregulation GSK3 by western Blot (Broca-Brisson et al., 2023). Together, the global upregulation of the expression of glycolysis enzymes observed in CTD patient brain organoids complement *in vivo* data in CrT KO mice and suggests that cerebral cells try to compensate the chronic

energy depletion due to the lack of energy buffer from the Cr/(P)Cr system. Analysis of glucose transporter expression and AMPK activation level in CTD patients-derived organoids also confirms *in vivo* data. Thus, observations in pathologic brain organoids from CTD patients strongly support the translational potential of the use of this model for drug discovery and development and to understand more deeply the mechanisms of the CTD pathology.

5. Conclusions

In this study, we highlight for the first time the alteration of brain glucose metabolism in CTD physiopathology. Unexpectedly, the glucose uptake is decreased in CTD due to dysregulation of the response to the energy unbalance. Dysregulations of AMPK activity and cellular trafficking of the glucose transporters appear as a central mechanism responsible for this unappropriated cell functioning. Biomarkers are needed to monitor the impact of investigational treatment on the disease in animal models and patients. To put it in a nutshell, [^{18}F]FDG PET imaging may offer a translational method to address this need *in vivo*.

Funding

The work presented was supported by CEA.

R.H. is supported by ASPIRE, the technology program management pillar of Abu Dhabi's Advanced Technology Research Council (ATRC), via the ASPIRE Precision Medicine Research Institute Abu Dhabi (VRI-20-10).

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

Elements of the illustrations were provided by Servier Medical Art by Servier (http://smart.servier.com) licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. Some of the elements were adapted. Guylaine Miotello, Mélodie Kielbasa, and Jean-Charles Gaillard (ProGénoMix platform, CEA) are acknowledged for their expert support with tandem mass spectrometry experiments.

Data availability

Data will be made available on request.

Mass spectrometry proteomics data corresponding to the 16 nanoLC-MS/MS runs were deposited at the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (https://www.ebi.ac.uk/pride/) under dataset identifiers PXD040185 and 10.6019/PXD040185.

Additional information

Mass spectrometry & proteomics data: The reviewers may access this currently private dataset using https://www.ebi.ac.uk/pride/ website with reviewer_pxd040185@ebi.ac.uk as the username and X8XHkHZV as password.

References

Braissant, O., Henry, H., Beard, E., Uldry, J., 2011. Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. Amino Acids 40, 1315-1324.

Bruun, T. U. J., Sidky, S., Bandeira, A. O., Debray, F. G., Ficicioglu, C., Goldstein, J., Joost, K., Koeberl, D. D., Luisa, D., Nassogne, M. C., O'Sullivan, S., Ounap, K., Schulze, A., van Maldergem, L., Salomons, G. S., Mercimek-Andrews, S., 2018. Treatment outcome of creatine transporter deficiency: international retrospective cohort study. Metabolic Brain Disease 33, 875-884.

Cormier, K. W., Woodgett, J. R., 2017. Recent advances in understanding the cellular roles of GSK-3. F1000Res 6.

DesRoches, C. L., Patel, J., Wang, P. X., Minassian, B., Salomons, G. S., Marshall, C. R., Mercimek-Mahmutoglu, S., 2015. Estimated carrier frequency of creatine transporter deficiency in females in the general population using functional characterization of novel missense variants in the SLC6A8 gene. Gene 565, 187-191.

Dezortova, M., Jiru, F., Petrasek, J., Malinova, V., Zeman, J., Jirsa, M., Hajek, M., 2008. 1H MR spectroscopy as a diagnostic tool for cerebral creatine deficiency. Magma 21, 327-332.
Doble, B. W., Woodgett, J. R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. J Cell Sci 116, 1175-1186.
Fernandes-Pires, G., Braissant, O., 2022. Current and potential new treatment strategies for creatine deficiency syndromes. Mol Genet Metab 135, 15-26.
Fueger, B. J., Czernin, J., Hildebrandt, I., Tran, C., Halpern, B. S., Stout, D., Phelps, M. E., Weber, W. A., 2006. Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. J Nucl Med 47, 999-1006.
Gimenez-Cassina, A., Lim, F., Cerrato, T., Palomo, G. M., Diaz-Nido, J., 2009. Mitochondrial hexokinase II promotes neuronal survival and acts downstream of glycogen synthase kinase-3. J Biol Chem 284, 3001-3011.
Goutal, S., Tournier, N., Guillermier, M., Van Camp, N., Barret, O., Gaudin, M., Bottlaender, M., Hantraye, P., Lavisse, S., 2020. Comparative test-retest variability of outcome parameters derived from brain [18F]FDG PET studies in non-human primates. PLoS One 15, e0240228.
Grimes, C. A., Jope, R. S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. Prog Neurobiol 65, 391-426.
Hayoun, K., Gouveia, D., Grenga, L., Pible, O., Armengaud, J., Alpha-Bazin, B., 2019. Evaluation of Sample Preparation Methods for Fast Proteotyping of Microorganisms by Tandem Mass Spectrometry. Front Microbiol 10, 1985.
Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., Imahori, K., 1996. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 2719-2723.
Hugon, G., Goutal, S., Sarazin, M., Bottlaender, M., Caillé, F., Droguerre, M., Charvériat, M., Winkeler, A., Tournier, N., 2022a. Impact of Donepezil on Brain Glucose Metabolism Assessed Using [(18)F]2-Fluoro-2-deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography Imaging in a Mouse Model of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Injection of Amyloid-Beta Peptide. Front Neurosci 16, 835577.
Hugon, J., Queneau, M., Sanchez Ortiz, M., Msika, E. F., Farid, K., Paquet, C., 2022b. Cognitive decline and brainstem hypometabolism in long COVID: A case series. Brain Behav 12, e2513.
Jaggumantri, S., Dunbar, M., Edgar, V., Mignone, C., Newlove, T., Elango, R., Collet, J. P., Sargent, M., Stockler-Ipsiroglu, S., van Karnebeek, C. D., 2015. Treatment of Creatine Transporter (SLC6A8) Deficiency With Oral S-Adenosyl Methionine as Adjunct to L-arginine, Glycine, and Creatine Supplements. Pediatr Neurol 53, 360-363.e362.
Klein, G., Mathé, C., Biola-Clier, M., Devineau, S., Drouineau, E., Hatem, E., Marichal, L., Alonso, B., Gaillard, J. C., Lagniel, G., Armengaud, J., Carrière, M., Chédin, S., Boulard, Y., Pin, S., Renault, J. P., Aude, J. C., Labarre, J., 2016. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. Nanotoxicology 10, 1555-1564.
Koepsell, H., 2020. Glucose transporters in brain in health and disease. Pflugers Arch 472, 1299-1343.
Lancaster, M. A., Knoblich, J. A., 2014. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc 9, 2329-2340.
Mabondzo, A., Harati, R., Broca-Brisson, L., Guyot, A.-C., Costa, N., Cacciante, F., Putignano, E., Baroncelli, L., Skelton, M. R., Saab, C., Martini, E., Benech, H., Joudinaud, T., Gaillard, J.-C., Armengaud, J., Hamoudi, R., 2023. Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency. Frontiers in Molecular Neuroscience 16.

McClory, H., Williams, D., Sapp, E., Gatune, L. W., Wang, P., DiFiglia, M., Li, X., 2014. Glucose transporter 3 is a rab11-dependent trafficking cargo and its transport to the cell surface is reduced in neurons of CAG140 Huntington's disease mice. Acta Neuropathol Commun 2, 179.
McEwen, B. S., Reagan, L. P., 2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. Eur J Pharmacol 490, 13-24.
Mirrione, M. M., Schiffer, W. K., Fowler, J. S., Alexoff, D. L., Dewey, S. L., Tsirka, S. E., 2007. A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator. Neuroimage 38, 34-42.
Muraleedharan, R., Dasgupta, B., 2022. AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. Febs j 289, 2247-2262.
Nassor, F., Jarray, R., Biard, D. S. F., Maïza, A., Papy-Garcia, D., Pavoni, S., Deslys, J. P., Yates, F., 2020. Long Term Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a Neurodegenerative Disease. Front Cell Neurosci 14, 14.
Pavoni, S., Jarray, R., Nassor, F., Guyot, A. C., Cottin, S., Rontard, J., Mikol, J., Mabondzo, A., Deslys, J. P., Yates, F., 2018. Small-molecule induction of A beta-42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. Plos One 13.
Perna, M. K., Kokenge, A. N., Miles, K. N., Udobi, K. C., Clark, J. F., Pyne-Geithman, G. J., Khuchua, Z., Skelton, M. R., 2016. Creatine transporter deficiency leads to increased whole body and cellular metabolism. Amino Acids 48, 2057-2065.
Rubiano-Labrador, C., Bland, C., Miotello, G., Guérin, P., Pible, O., Baena, S., Armengaud, J., 2014. Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. J Proteomics 97, 36-47.
Russell, A. P., Ghobrial, L., Wright, C. R., Lamon, S., Brown, E. L., Kon, M., Skelton, M. R., Snow, R. J., 2014. Creatine transporter (SLC6A8) knockout mice display an increased capacity for in vitro creatine biosynthesis in skeletal muscle. Frontiers in Physiology 5.
Salomons, G. S., van Dooren, S. J. M., Verhoeven, N. M., Cecil, K. M., Ball, W. S., Degrauw, T. J., Jakobs, C., 2001. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: A new creatine-deficiency syndrome. American Journal of Human Genetics 68, 1497-1500.
Schiffer, W. K., Mirrione, M. M., Dewey, S. L., 2007. Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents. J Nucl Med 48, 277-287.
Skelton, M. R., Schaefer, T. L., Graham, D. L., Degrauw, T. J., Clark, J. F., Williams, M. T., Vorhees, C. V., 2011. Creatine Transporter (CrT; Slc6a8) Knockout Mice as a Model of Human CrT Deficiency. Plos One 6.
Steinberg, G. R., Hardie, D. G., 2022. New insights into activation and function of the AMPK. Nat Rev Mol Cell Biol.
Stockebrand, M., Sasani, A., Das, D., Hornig, S., Hermans-Borgmeyer, I., Lake, H. A., Isbrandt, D., Lygate, C. A., Heerschap, A., Neu, A., Choe, C. U., 2018. A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism. Frontiers in Physiology 9.
Stockler, S., Schutz, P. W., Salomons, G. S., 2007. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. Subcell Biochem 46, 149-166.
Tournier, N., Comtat, C., Lebon, V., Gennisson, J. L., 2021. Challenges and Perspectives of the Hybridization of PET with Functional MRI or Ultrasound for Neuroimaging. Neuroscience 474, 80-93.
Toyama, H., Ichise, M., Liow, J. S., Modell, K. J., Vines, D. C., Esaki, T., Cook, M., Seidel, J., Sokoloff, L., Green, M. V., Innis, R. B., 2004. Absolute quantification of regional cerebral glucose utilization in mice by 18F-FDG small animal PET scanning and 2-14C-DG autoradiography. J Nucl Med 45, 1398-1405.

Trotier-Faurion, A., Dezard, S., Taran, F., Valayannopoulos, V., de Lonlay, P., Mabondzo, A., 2013. 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 of Medicinal Chemistry 56, 5173-5181.
Trotier-Faurion, A., Passirani, C., Bejaud, J., Dezard, S., Valayannopoulos, V., Taran, F., de Lonlay, P., Benoit, J. P., Mabondzo, A., 2015. Dodecyl creatine ester and lipid nanocapsule: a double strategy for the treatment of creatine transporter deficiency. Nanomedicine 10, 185-191.
Udobi, K. C., Kokenge, A. N., Hautman, E. R., Ullio, G., Coene, J., Williams, M. T., Vorhees, C. V., Mabondzo, A., Skelton, M. R., 2018. Cognitive deficits and increases in creatine precursors in a brain-specific knockout of the creatine transporter gene Slc6a8. Genes Brain and Behavior 17.
Ullio-Gamboa, G., Udobi, K. C., Dezard, S., Perna, M. K., Miles, K. N., Costa, N., Taran, F., Pruvost, A., Benoit, J. P., Skelton, M. R., de Lonlay, P., Mabondzo, A., 2019. Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as a promising therapy for creatine transporter deficiency. Nanomedicine 14, 1579-1593.
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., 2013. Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. Journal of Inherited Metabolic Disease 36, 103-112.
van de Kamp, J. M., Mancini, G. M., Salomons, G. S., 2014. X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. Journal of Inherited Metabolic Disease 37, 715-733.

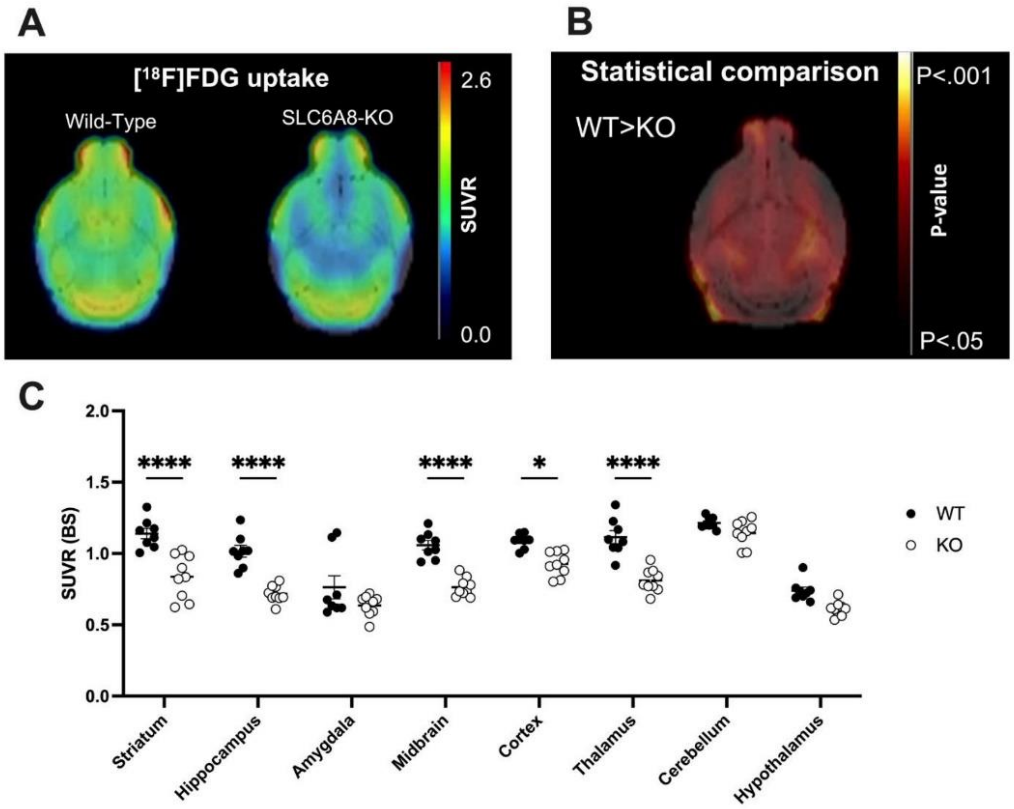


Figure 1: Brain uptake of [^{18}F]FDG in brain regions of Wild-type vs CrT KO mice. (A) Brain [^{18}F]FDG in brain regions of Wild-type or Slc6a8-/y mice was normalized by radioactivity measured in the brain stem to generate SUVR-normalized PET images, coregistered to a MRI mouse brain template (B) Parametric mapping of [^{18}F]FDG brain uptake reflecting pathologic aspect. A significance level threshold of .05 and a minimum cluster size of 200 voxels were selected to identify significant clusters. (C) Individual SUVR values of [^{18}F]FDG uptake in selected brain region in Wild-Type and CrT KO mice. Values represent individual data n=8/WT; n=9/KO) . Comparisons were performed using two-way analysis of variance followed by multiple comparison tests using Bonferroni's correction. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001,****P<0.0001.

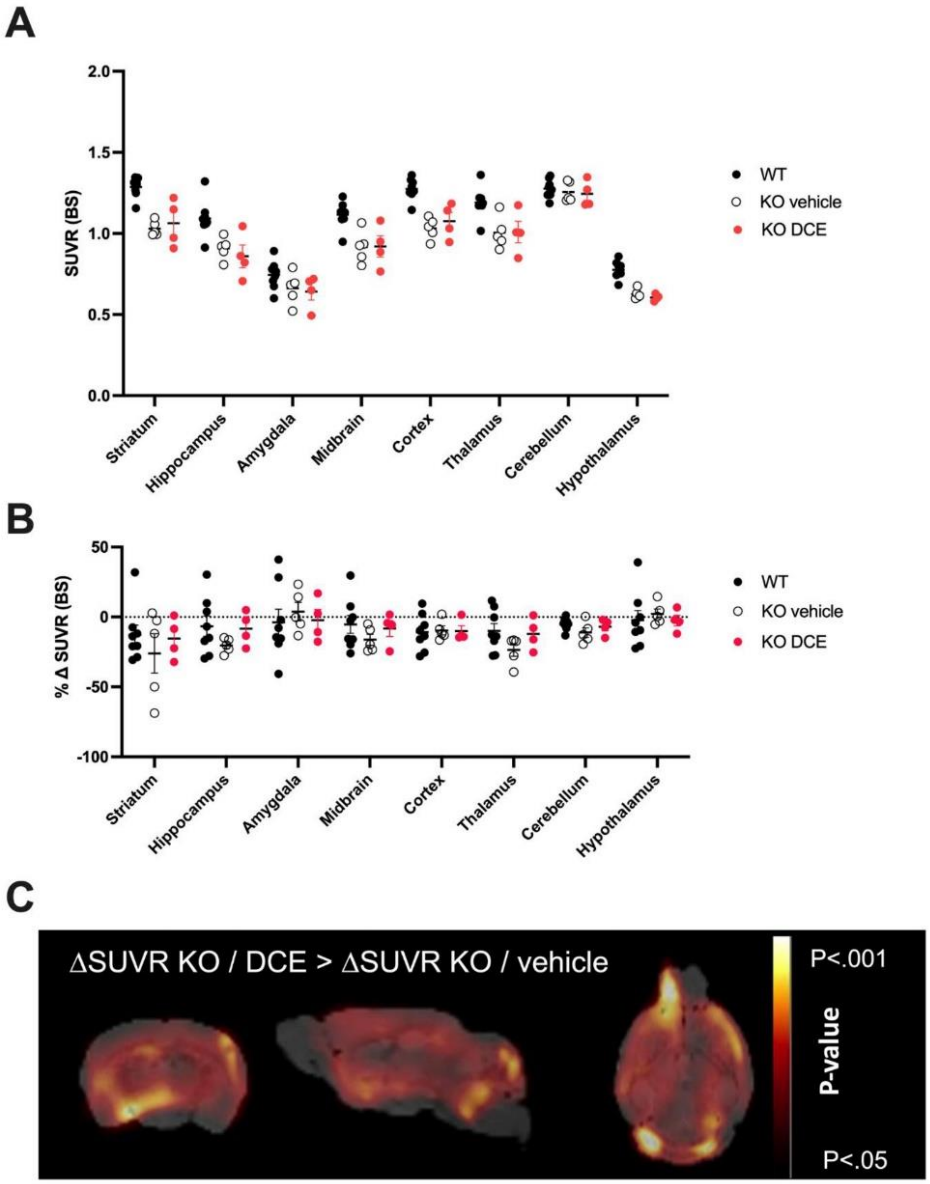


Figure 2: Comparison of [^{18}F]FDG uptake in the brain of Wild-Type, DCE-treated and placebo-treated KO mice. (A) [^{18}F]FDG brain uptake was expressed as standardized uptake values and normalized by the radioactivity in the brain stem (SUVR). Values represent individual data (n=8/WT; n=5/vehicle; n=4/DCE). Comparisons were performed using two-way analysis of variance followed by multiple comparison tests using Bonferroni's correction and showed no significant difference in regional SUVR between conditions. (B) [^{18}F]FDG brain uptake was expressed as the % change in SUVR before and after one month treatment by DCE or vehicle in KO mice, and the test-retest variability of the procedure in WT mice over the same period. Values represent mean (standard error of the mean; n=8/WT; n=5/KO vehicle; n=4/KO DCE). (C) Parametric mapping of [^{18}F]FDG brain uptake mapping the brain clusters with mitigated decline in [^{18}F]FDG uptake in DCE treated vs placebo-treated KO mice. ($p < 0.05$; threshold: 200 voxels).

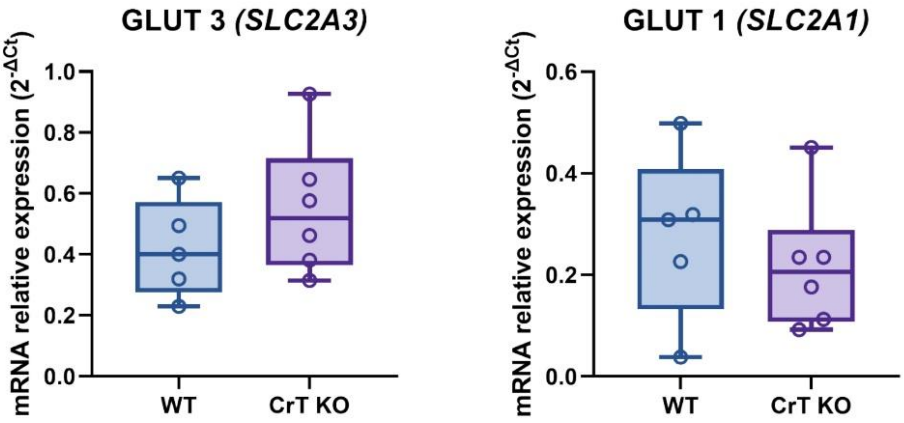


Figure 3: mRNA expression of glucose transporters, Glut3 (*SLC2A3*) and Glut 1 (*SLC2A1*), in CrT KO mice compared to wild type mice. Each data point represents one animals with median of n=5-6 mice per group and RT-qPCR was performed in duplicate for each single preparation.

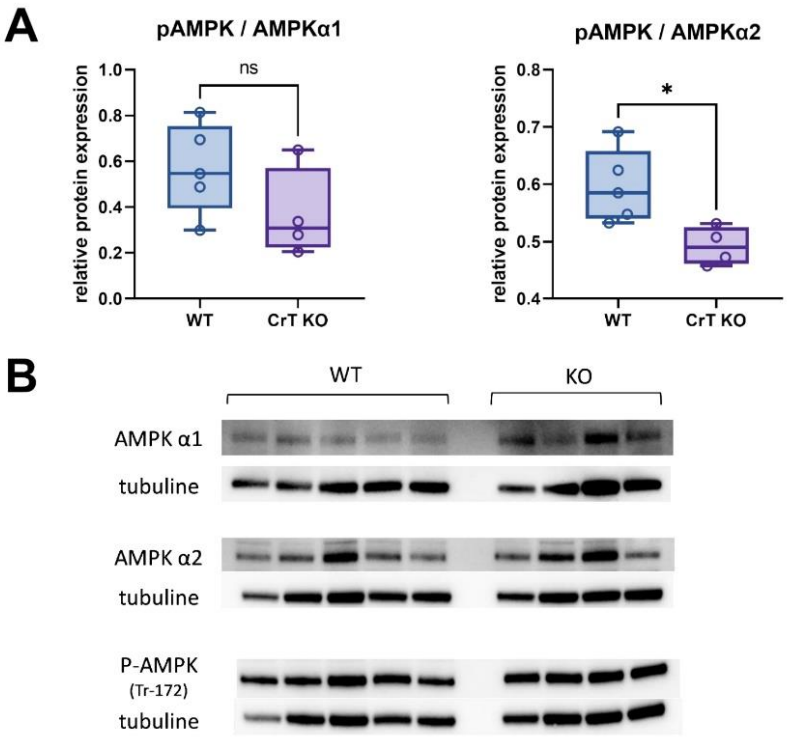


Figure 4: Dysregulation of AMPK in CrT KO mice. (A) graph showing analysis of pAMPK/AMPK α1 and pAMPK/AMPK α2 ratio. Each data point represents one animal with median of n= 5-6 mice per group. Significant differences determined using Mann-Withney test. *$P < 0.05$ indicate significant differences between CrT KO mice and WT mice. (B) Representative immunoblot of pAMPK, AMPK α1 and AMPK α2 in CrT KO mice and wild type mice (WT).

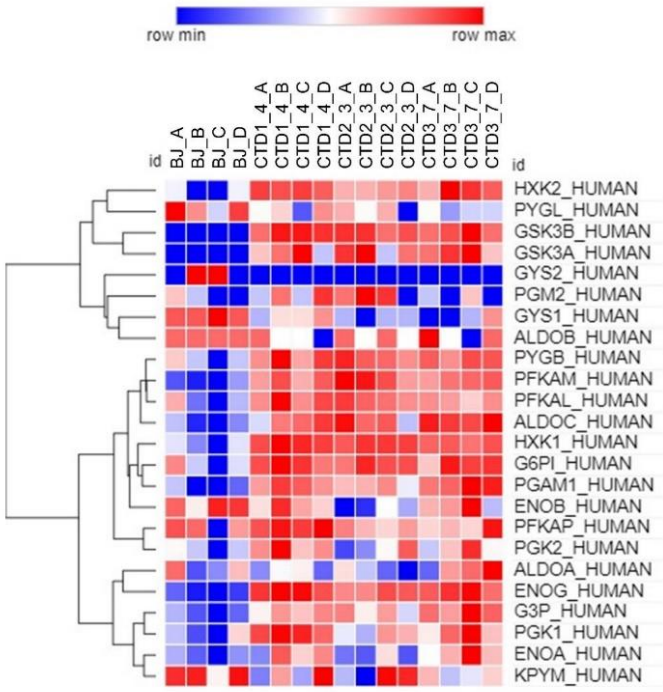


Figure 5: Heatmaps showing the abundance levels of the glycolysis enzymes in heathy *versus* CTD patient organoids.

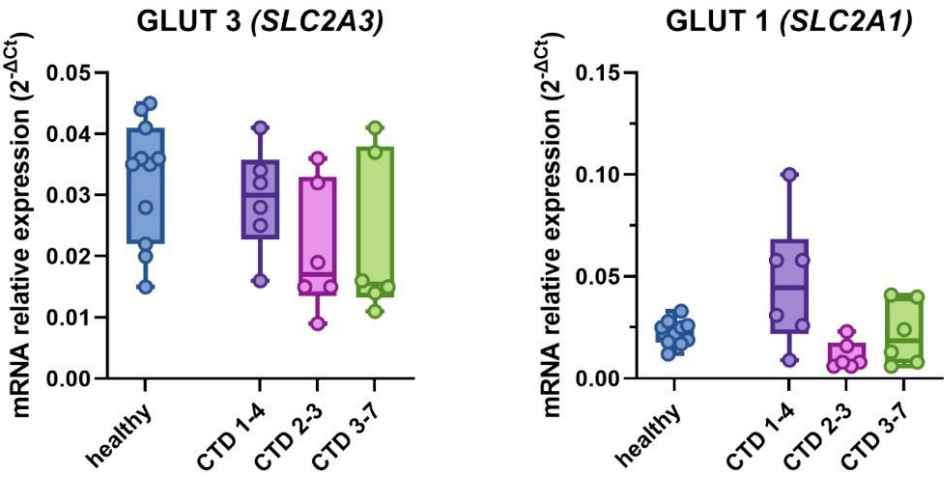


Figure 6: mRNA expression of Glut3 (*SLC2A3*) and Glut 1 (*SLC2A1*) in CTD organoids (3 patients) compared to healthy (3 lines). Each data point represents one organoid with median of n=5 to 6 organoids and RT-qPCR was performed in duplicate for each single preparation of organoids.

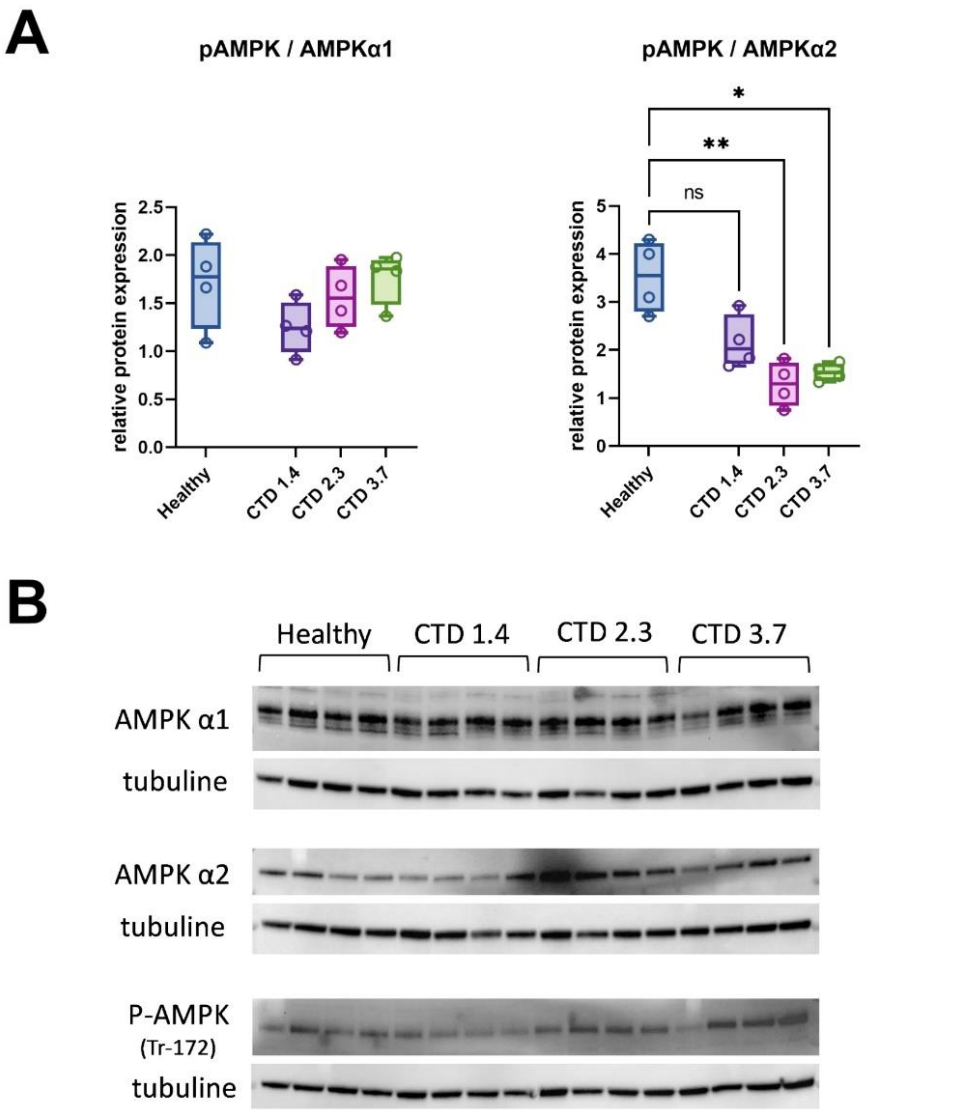


Figure 7: Dysregulation of proteins implicated in glucose transporters trafficking in CTD patient organoids. (A) graph showing analysis of pAMPK/AMPK α1 and pAMPK/AMPK α2 ratio. Each data point represents one organoid with median of n= 4 organoids. Significant differences determined using Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. *$P < 0.05$ and **$P < 0.01$ indicate significant differences between CTD patient organoids and healthy organoids. (B) Representative immunoblot of pAMPK, AMPK α1 and AMPK α2 in heathy organoids and CTD organoids (3 patients).

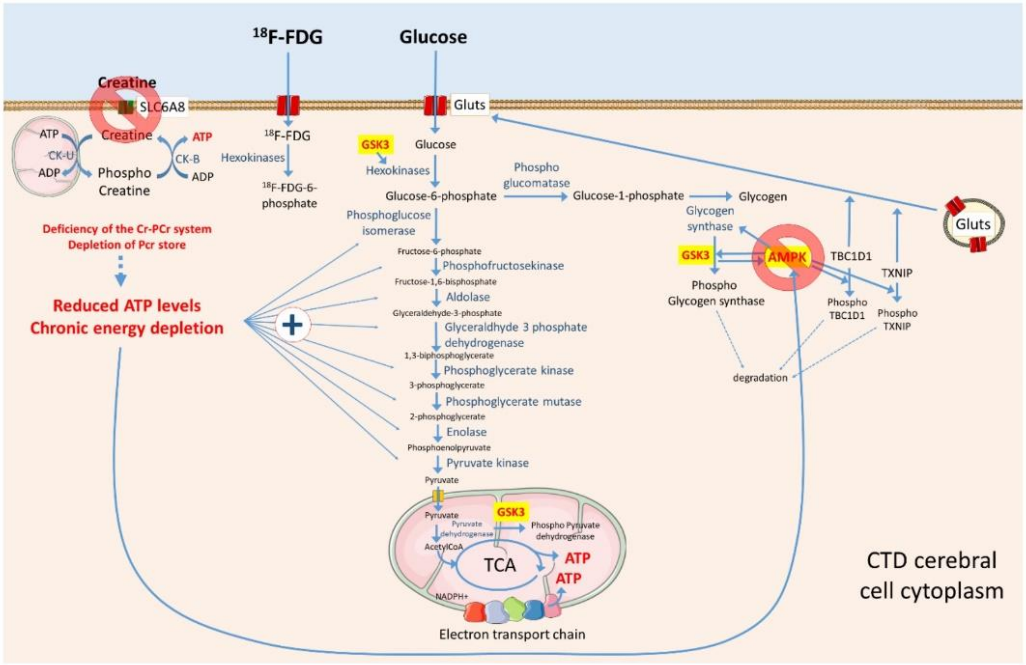
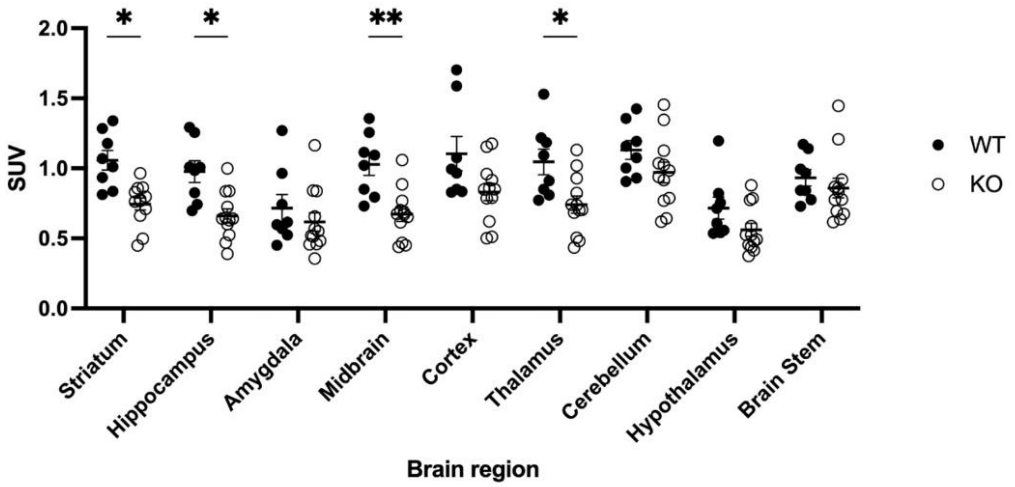


Figure 8: Main study findings and potential mechanisms of glucose metabolism dysregulation in CTD



Supplementary figure 1: Brain uptake of [18F]FDG in brain regions of Wild-type vs CrT KO mice. Individual SUV values of [18F]FDG uptake in selected brain region in Wild-Type and CrT KO mice. Values represent individual data n=8/WT; n=9/KO). Comparisons were performed using two-way analysis of variance followed by multiple comparison tests using Bonferroni's correction, with a Tukey's post-hoc analysis *P<0.05, **P<0.01.

	Healthy versus CTD1-4		Healthy versus CTD2-3		Healthy versus CTD3-7	
	fold change	P value	fold change	P value	fold change	P value
HXK2	3,56	0,021	2,44	0,116	3,63	0,043
PYGL	0,64	0,060	0,62	0,049	0,53	0,040
GSK3B	10,67	0,008	9,67	0,016	9,67	0,023
GSK3A	3,75	0,019	4,25	0,021	4,50	0,023
GYS2	0,67	0,169	0,67	0,175	0,33	0,079
PGM2	2,17	0,323	2,00	0,248	0,88	0,578
GYS1	0,55	0,044	0,32	0,019	0,36	0,024
ALDOB	0,67	0,098	0,83	0,168	0,83	0,152
PYGB	2,09	0,109	2,04	0,166	2,00	0,195
PFKAM	1,97	0,141	2,26	0,125	2,00	0,232
PFKAL	1,67	0,284	1,62	0,506	1,43	0,942
ALDOC	1,78	0,253	1,85	0,340	2,19	0,159
HXK1	3,09	0,019	2,85	0,044	2,53	0,074
G6PI	1,43	0,637	1,39	0,996	1,38	0,897
PGAM1	2,08	0,098	1,73	0,392	2,35	0,110
ENOB	0,91	0,161	0,62	0,034	0,92	0,122
PFKAP	1,40	0,635	1,03	0,333	1,08	0,342
PGK2	1,26	0,800	1,06	0,283	1,16	0,382
ALDOA	0,97	0,202	0,94	0,143	1,08	0,255
ENOG	4,28	0,007	3,31	0,030	3,88	0,024
G3P	1,58	0,374	1,52	0,734	1,89	0,273
PGK1	1,42	0,648	1,16	0,418	1,31	0,666
ENOA	1,30	0,950	1,05	0,252	1,38	0,831
KPYM	0,92	0,162	0,93	0,136	0,91	0,116

Supplementary table 1: Dysregulated expression of glycolysis enzymes in heathy *versus* CTD patient organoids.

2.3 Principaux résultats

Le jeu de données protéomiques obtenu dans les organoïdes cérébraux CTD montre une tendance à l'augmentation de l'abondance de plusieurs enzymes de la glycolyse. Parmi ces protéines, les hexokinases 1 et 2 (HXK1 et 2), GSK3α et β, et l'enolase G (ENOG) sont significativement surexprimées dans les organoïdes CTD (Figure 5 – Article 3). Ces observations tendent à renforcer notre hypothèse initiale d'une stimulation de la glycolyse dans les cellules CTD de manière à s'adapter au déséquilibre de la balance énergétique.

Cependant, l'imagerie TEP au [18F]FDG chez les souris KO CRT par rapport aux souris sauvages montre une diminution de l'incorporation du [18F]FDG principalement dans les régions subcorticales, ce qui suggère une diminution du métabolisme du glucose dans le cerveau CTD (Figure 1 – Article 3).

Pour expliquer l'hypométabolisme observé chez les souris KO CRT, nous avons regardé l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3 principalement exprimés par les astrocytes et les neurones, respectivement. Cependant, les niveaux d'ARNm de ces transporteurs du glucose ne sont pas différents entre les souris KO CRT et sauvages (Figure 3 – Article 3). Pour être pleinement fonctionnels, ces transporteurs doivent être transloqués à la membrane plasmique. Nous nous sommes donc intéressés au trafic intracellulaire des transporteurs du glucose, et plus particulièrement à l'AMPK, qui est responsable de la présence ou non des transporteurs à la membrane plasmique. L'AMPK est une enzyme de détection de l'énergie qui reconnaît la diminution des réserves en ATP. Elle est activée par une phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α qui peut ensuite phosphoryler plusieurs cibles dont des protéines impliquées dans le transport des transporteurs GLUT. Nous avons ainsi montré une diminution des ratio phospho-AMPK/AMPK α2 dans le cerveau des souris KO CRT, ce qui suggère une absence d'activation de l'AMPK (Figure 4 – Article 3). Ces résultats peuvent expliquer la diminution de l'incorporation du [18F]FDG qui peut être liée à l'absence de transporteur de glucose fonctionnel à la surface des cellules cérébrales.

Les résultats obtenus chez le modèle animal tendent à être confirmés dans les organoïdes cérébraux. En effet, il n'y a pas de différence d'expression des transporteurs GLUT dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes sains (Figure 6 – Article 3). De plus, le ratio phospho-AMPK/AMPK α2 est diminué dans les organoïdes CTD ce qui souligne une absence d'activation de l'AMPK dans le modèle *in vitro* humain (Figure 7 – Article 3).

Puisque le métabolisme énergétique dans le cerveau dépend également de la mitochondrie avec l'OXPHOS, nous nous sommes aussi intéressés au réseau mitochondrial dans les organoïdes CTD. De plus, l'efficacité mitochondriale est essentielle au maintien de la fonction neuronale et de la plasticité, et l'intégrité mitochondriale est une composante essentielle de l'apprentissage et de la mémoire (Martin *et al*, 2018). Les mitochondries semblent également importantes dans la régulation des cellules progénitrices neurales pendant le processus de neurogenèse (Brunetti *et al*, 2021). D'autres parts, certaines protéines mises en évidence par les analyses protéomiques sont d'importants régulateurs des fonctions mitochondriales tels que les kinases GSK3β et SRC (Yang *et al*, 2017; Hebert-Chatelain, 2013). La morphologie du réseau mitochondrial varie en fonction des besoins de la cellule et dépend d'une balance entre les processus de fusion et de fission mitochondriales. Cependant, cette balance peut être dérégulée dans des neuropathologies et provoquer une fragmentation du réseau mitochondrial.

Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de protéines impliquées dans la fusion mitochondriale telles que la mitofusine 1 (MFN1), l'ATPase YME1L1 qui joue un rôle dans le maintien de la morphologie des mitochondries (Figure 43) (Archer, 2013), ainsi que PHB1 et PHB2 qui ont des rôles multiples dans la fonction et la morphologie mitochondriale (Figure 44) (Thuaud *et al*, 2013). Dans les organoïdes CTD, toutes ces protéines mitochondriales sont sous-exprimées (Figure 45), tandis que DNM1L, une protéine impliquée dans la fission mitochondriale (Figure 43), est plus abondante dans les analyses protéomiques des organoïdes CTD par rapport au sain (Fold change=2,37 ; $p<0.001$). Ces résultats suggèrent une potentielle fragmentation excessive du réseau mitochondrial dans les organoïdes CTD.

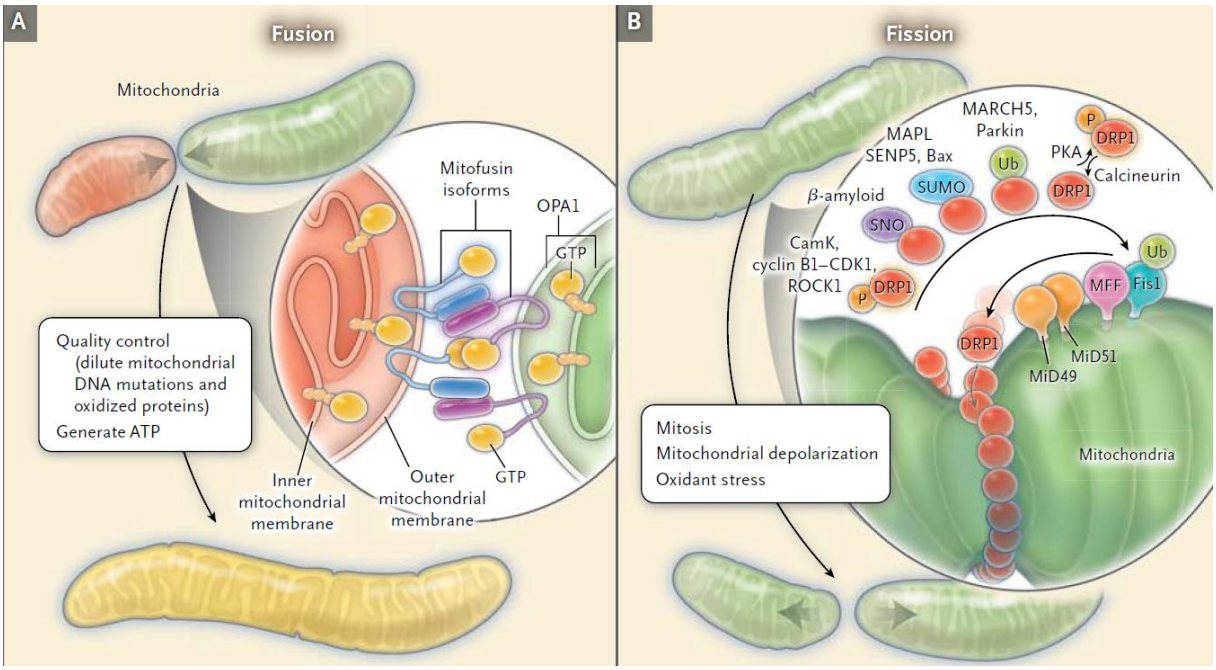


Figure 43 : Fusion et fission mitochondriales

(A) Processus de fusion mitochondriale coordonnée par les mitofusines pour les membranes externes mitochondriales et par OPA1 pour les membranes internes mitochondriales. (B) Processus de fission mitochondriale coordonnée par DRP1 (DNM1L) et la machinerie de fission. D'après Archer, 2013.

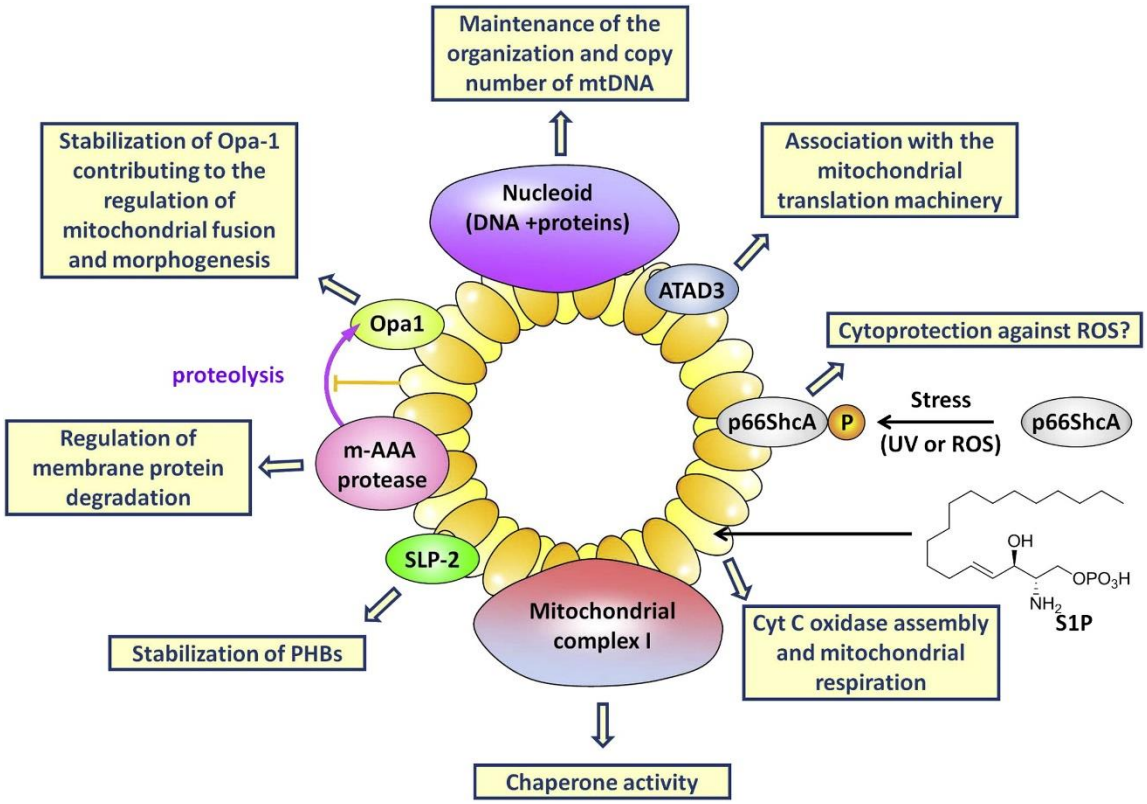


Figure 44 : Fonctions des prohibitines PHB1 et PHB2 dans la mitochondrie

Dans la membrane interne mitochondriale, PHB1 et PHB2 sont organisés en anneaux qui maintiennent la structure et régulent les fonctions des mitochondries en interagissant avec OPA1, la protéase m-AAA, SLP-2, ATAD3 et l'ADNmt. D'après Thuaud *et al*, 2013.

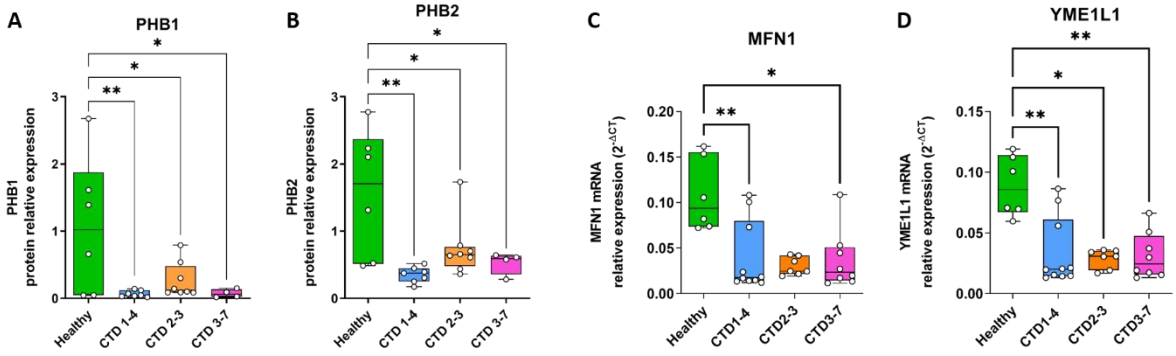


Figure 45 : Expression de marqueurs mitochondriaux dans les organoïdes cérébraux

(A-B) Expression relative de PHB1 et PHB2, n=4 à 8, one-way ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett, (C-D) Expression relative des ARNm de MFN1 et YME1L1, n=6 à 10, test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn. *p<0,05, **p<0.01

3. Processus de méthylation

3.1 Contexte

L'apport de créatine cérébrale repose sur la synthèse *de novo* intracérébrale et le passage de la créatine périphérique par la barrière hématoencéphalique (BHE). Ce passage est toutefois assez limité puisque les pieds astrocytaires qui entourent la BHE n'expriment pas le CRT. Dans le cadre du CTD, ce passage est inexistant à cause de l'absence de CRT fonctionnel au niveau des cellules endothéliales de la BHE. Par conséquent, l'apport de créatine dans le cerveau CTD semble exclusivement reposer sur la synthèse intracérébrale. Les cellules cérébrales CTD pourraient ainsi augmenter leur synthèse de créatine pour essayer de compenser le déséquilibre énergétique comme dans les cellules musculaires des souris KO CRT (Russell *et al*, 2014). La synthèse de créatine nécessite d'utiliser de la S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur méthyl lors de la seconde étape (Figure 2). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'augmentation de consommation de SAM pourrait modifier l'efficacité d'autres processus de méthylation qui repose sur ce donneur de groupement méthyl, tels que la méthylation de l'ADN, des histones et des ARN. Ces modifications épigénétiques peuvent influencer la neurogenèse et sont impliquées dans plusieurs neuropathologies telles que les troubles du spectre de l'autisme, les troubles épileptiques ainsi que des maladies neurodégénératives (Yao *et al*, 2016; Younesian *et al*, 2022; Van Loo *et al*, 2022). De plus, GSK3β peut moduler ces processus épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou des ARNm dans les cellules souches embryonnaires murines (Faulds *et al*, 2018; Meredith *et al*, 2015).

Nous avons donc évalué les taux de méthylation de l'ADN dans le cerveau de souris KO CRT et dans les organoïdes cérébraux CTD. Pour déterminer si ces modifications épigénétiques peuvent constituer de nouveaux biomarqueurs d'efficacité de traitement, nous avons également regardé la modulation de la méthylation de l'ADN suite au traitement des souris KO CRT avec du DCE. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'un article qui sera soumis au journal *eLife* (Article 4).

3.2 Article 4 : Epigenetic alterations in creatine transporter deficiency: a new marker for therapeutic efficacy monitoring

Cet article résume les résultats du taux de méthylation de l'ADN dans le cerveau de souris KO CRT traitées ou non avec du DCE, ainsi que le taux de méthylation de l'ADN dans les organoïdes cérébraux CTD.

L'article 4 est prévu pour soumission fin 2023 dans le journal *eLife*.

Epigenetic alterations in creatine transporter deficiency: a new marker for therapeutic efficacy monitoring

Léa Broca-Brisson[1], Clémence Disdier[2], Aloïse Mabondzo[1]*

Affiliations

[1]Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Gif-sur-Yvette cedex 91191, France.

[2]CERES BRAIN Therapeutics, Paris, France. ICM-Hôpital Pitié-Salpétrière, 47 boulevard de l'Hôpital 73013 Paris, France.

*Corresponding author : Dr Aloïse Mabondzo, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, LENIT, Gif-sur-Yvette cedex 91191, France.
Phone: 33 1 69081321; E-mail: aloise.mabondzo@cea.fr

Abstract

Creatine transporter deficiency (CTD) is an X-linked disease caused by mutations in the *Slc6a8* gene. The impaired creatine uptake in the brain leads to developmental delays with intellectual disability. *In vitro* and *in vivo* preclinical data obtained in recent years have begun to elucidate the pathophysiology of CTD. However, no data are available regarding the epigenetic modifications that play a role in various neurological disorders. In this study, we determined the status of DNA methylation, an epigenetic mechanism, in both *Slc6a8* knockout mouse model and brain organoids derived from CTD patients. We also investigated the effect of Dodecyl Creatine Ester (DCE), a promising prodrug that increases brain creatine content. The level of 5-methylcytosine in DNA was significantly reduced in both *in vivo* and *in vitro* CTD models. This DNA hypomethylation tended to be regulated by DCE treatment *in vivo*. These results suggest that increased brain creatine after DCE treatment restores normal levels of DNA methylation, unveiling the potential of using DNA methylation as a marker to monitor the drug efficacy.

Introduction

Creatine Transporter Deficiency (CTD) is an inborn error of creatine metabolism in which creatine (Cr) is not properly transported to the brain and muscles due to defective creatine transporters (CrT). Patients with CTD express speech and behavior abnormalities, intellectual disabilities, development delay, seizures, and autistic behavior due to lack of brain creatine as energy buffer (Braissant et al., 2011). There is no pharmacological treatment to alleviate behavioral symptoms of CTD (Fernandes-Pires and Braissant, 2022). Consequently, there is an urgent need to develop new therapeutic strategies and new relevant tools such as translational models and markers to evaluate therapeutic efficacy and speed up drug development.

Creatine plays a central role in brain energetics (Fernandes-Pires and Braissant, 2022). Cerebral creatine originates from diet after transport across the blood brain barrier and cerebral cells membranes or from *de novo* synthesis. In CTD, the peripheral creatine is not distributed to the brain cells due to the non-functional CrT. Consequently, the creatine store of CTD patient brain cells only rely on *de novo* cerebral synthesis. CTD brain cells may increase their Cr synthesis to compensate the energy unbalance. Indeed, this upregulation of Cr biosynthesis was previously demonstrated in the muscle of CrT knockout (KO) mice (Russell et al., 2014; Stockebrand et al., 2018). Creatine *de novo* synthesis need S-adenosylmethionine (SAM) as a methyl donor, this group being transfer to guanidinoacetate by guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) in the second step (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015). This last step consume approximately 40% of methyl groups supplied by SAM and consequently places a significant burden on the labile methyl groups store (Brosnan et al., 2011; Stead et al., 2001). In this study, we hypothesized that the methyl unbalance could lead to various consequences including altered DNA methylation since DNA methyltransferase also use SAM as precursor.

In order to validate this hypothesis we looked at DNA methylation status in both CrT knockout mouse model and brain organoids derived from CTD patients. In an intent to assess the use as possible marker

of treatment efficacy, mice were exposed to dodecyl creatine ester (DCE). DCE, as a Cr prodrug, was demonstrated as a promising drug to treat CTD after administration by the nasal route taking advantage of the nose-to-brain pathway (Mabondzo et al., 2023; Ullio-Gamboa et al., 2019).

Materials and methods

Chemicals

DCE was synthesized as described previously (Trotier-Faurion et al., 2013). Kollisolv MCT70 was from BASF and Montanox 80 from SEPPIC.

Animals and intranasal treatment

All procedures were in accordance with European directives on the protection and use of laboratory animals (Council Directive 2010/63/UE, French decree 2013-118). The experimental protocol was evaluated and validated by a local ethic committee for animal use and approved by the French government (n° APAFIS#7466-2016110417049220).

Male $CrT^{-/y}$ and $CrT^{+/y}$ mice were generated on the C57BL/6J background as previously described (Skelton et al., 2011). The mice were housed at 22°C on a 12–12 h light–dark cycle and provided food and water *ad libitum*.

DCE was synthesized as described previously (Trotier-Faurion et al., 2013). The emulsion formulation comprised 22.3% w/w kollisolv MCT70 (BASF), 19% w/w of Montanox 80 (SEPPIC) and 56.7% w/w of regular saline. The specified amount of DCE (2%w/w) was first suspended in the mix of oil and surfactant with magnetic stirring at room temperature. The premix and the saline were preheat at 40°C. Finally, a fixed amount of preheat regular saline was added to the above mixture and stirred continuously for 10 min until a homogenous emulsion was obtained. The emulsion was kept under stirring during the cooling phase then store at 4°C until use. The vehicle was prepare with the same process with replacement of the 2% w/w of DCE by regular saline.

DCE was intra-nasally administered as previously reported (Disdier *et al.*, 2023, submitted) to CrT KO mice for 30 days, while wild-type (WT) and vehicle-treated CrT KO mice were used as controls. Using a P20 micropipette, 6 µl of DCE formulation or vehicle was placed in the nostril. The intranasal treatment DCE (20 mg/g) or vehicle was given twice bilaterally (24 µl total volume) for 30 days. In the DCE treated group, each mouse received 0.48 mg of DCE daily.

iPSC culture and Brain organoids generation

Healthy BJ iPSC were a generous gift of Frank Yates (Pavoni et al., 2018). CTD iPSCs were obtained by reprogramming CTD patient's fibroblasts in a previous study (Broca-Brisson *et al.*, 2023, preprint). All the mutations were previously described by Valayannopoulos et al (Valayannopoulos et al., 2013):

- Patient 1: c1006_1008delAAC (pAsn336del): 9 years old showing mild mental retardation, speech delay, learning difficulties, mild behavioral impairment and facial hypotonia.
- Patient 2: c1497_1500delGAG (pGly499del): 10 years old showing mild psychomotor retardation, speech delay, seizures, impulsivity, facial and trunk hypotonia.
- Patient 3: c1221_1223delTTC (pGly414del): 3 years old showing no speech, autistic behavior with hyperactivity and emotional instability.

All iPSC lines were maintained on hESC-qualified Matrigel (Corning) in mTeSR™1 medium (STEMCELL Technologies) and passaged using ReLeSR™ (STEMCELL Technologies).

Brain organoids were generated as previously described (Broca-Brisson *et al.*, 2023, preprint) following the protocol published by Lancaster & Knoblich with minor modifications from Nassor *et al* (Lancaster and Knoblich, 2014; Nassor et al., 2020). Brain organoids were used at 2 month-old.

DNA extraction and 5-methylcytosine (5mC) quantification

Total DNA was extracted from 20 to 25 mg of brain tissue or each brain organoids using the NucleoSpin Tissue Mini kit for DNA (Macherey-Nagel, 740952.50), according to manufacturer's instructions. The purity and concentration of DNA were measured using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer at 230, 260 and 280 nm (NanoDrop Technologies).

Global 5mC DNA content in brain tissue or brain organoids was quantify using the ELISA-based Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Abcam ab117128). The input DNA was diluted in TE buffer (Tris-EDTA buffer) to an optimum 100 ng per reaction. The assay was performed in duplicates according to the manufacturer's instructions. Plates was read at 450 nm on a BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer (Agilent Technologies). The negative control absorbance was subtracted to all measurements for background absorbance correction. A calibration curve was generated for quantification (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 ng/µL). With this curve, the levels of 5mC were calculated according to the manufacturer's instructions.

Statistics

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 9.3 program. Experimental comparisons with multiple groups were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for post hoc analysis, or Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test for post hoc analysis.

Results

To investigate our hypothesis of deficient DNA methylation in CTD, we first used CrT KO mice, a model that recapitulates cognitive impairments and major pathophysiological aspects of CTD (Skelton et al., 2011). We demonstrated a hypo-methylation of DNA in CrT KO mice brain corresponding to a decrease of 5-methylcytosine (5mC) of about 30% compared to wild type mice (Fig 1). This hypo-methylation of DNA could impact gene expression leading to cognitive dysfunctions observed in the CrT KO mice

model. In addition, 0.4 mg of intranasal DCE for 30 days tends to restore DNA methylation level in the brain of CrT KO mice. This observation demonstrated that restauration of creatine store in the brain directly impact DNA methylation and consequently a wild variety of gene expression.

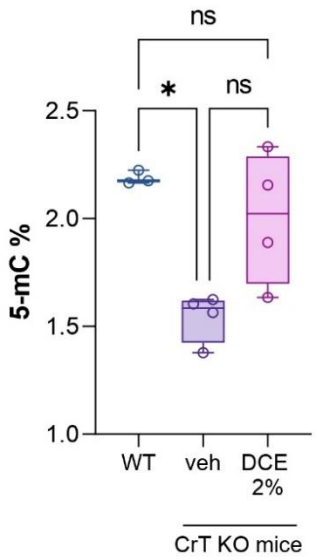


Figure 1: DNA methylation level in brain tissue of wild type (WT) and CrT KO mice with and without DCE treatment. N= 5 mice per group (WT = wild type; veh = CrT KO mice treated with the vehicle; DCE 2% = CrT KO mice treated with the dodecyl creatine ester formulation 2% w/w, 0.8mg/day intranasally for 30 days). Data were analyzed using Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. Data are means ± standard deviation of the mean. * P≤ 0.05.

In a second step, to evaluate the potential translation of this marker in a human model, we used a CTD brain organoid model described previously (Broca-Brisson et al., 2023, preprint). Consistently, we highlight a significant reduction of 5mC in DNA of all CTD brain organoids compared to heathy organoids (Fig 2). This hypo-methylation corresponds to a 31%, 43% and 36% decrease of 5mC in CTD 1-4, 2-3 and 3-7 respectively (Fig 2). These observations from a translatable human model confirm data obtained *in vivo* in the CrT KO mice model.

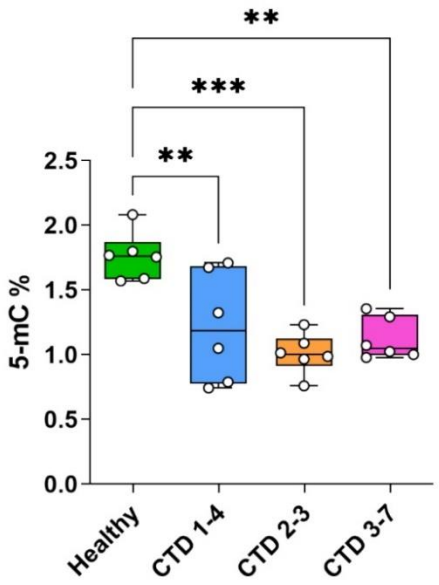


Figure 2: DNA methylation level in CTD brain organoids (CTD 1-4, 2-3 and 3-7) vs healthy brain organoids (n = 6). One-way ANOVA follow by Tukey's multiple comparisons test. ** P< 0.01; *** P<0.001.

Discussion

Creatine (Cr) Transporter Deficiency (CTD) is an X-linked metabolic and genetic disorder caused by non-functional Cr transporter (SLC6A8) leading to low cerebral Cr levels. Patients present intellectual disability, autistic behavior, and epilepsy but pathophysiologic mechanisms remain understudy. Creatine plays a pivotal role in energy metabolism but it is also implicated in many cellular processes, especially in the brain (Fernandes-Pires and Braissant, 2022). In this study, we used both CrT KO mice and CTD human brain organoids to investigate the epigenetic changes in CTD pathology. In addition, we evaluate how DCE, a promising creatine prodrug can ameliorate this marker.

Creatine *de novo* synthesis places a huge burden on methyl balance (Brosnan et al., 2011; Stead et al., 2001). The implication of creatine synthesis on the methylation cycle is schematized on Figure 3. In this study, we demonstrated that in CTD cerebral cells, the burden on the labile methyl groups leads

to genome wild hypo-methylation using both CrT KO mice model and CTD patient's derived brain organoids.

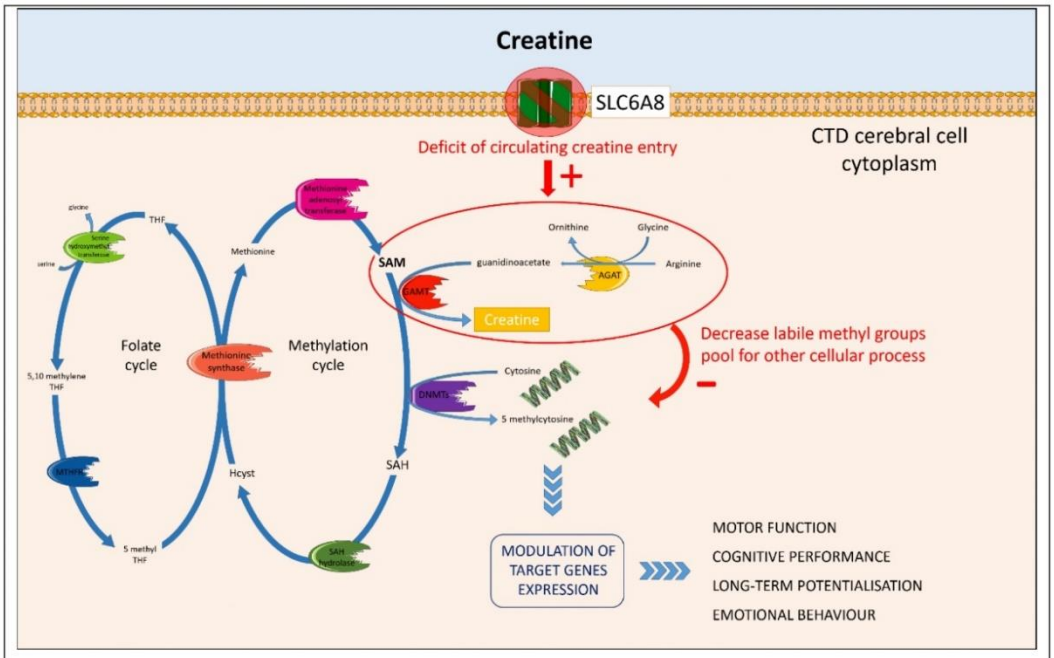


Figure 3: Schematic representation of the link between creatine intracerebral synthesis and DNA methylation in CTD patient brain. THF = tetrahydrofolate; MTHFR = 5,10 methylene THF reductase; Hcys = homocystein; SAM = S-adenosylmethionine; SAH = S-adenosylhomocystein; AGAT = glycine amidinotransferase; GAMT = guanidinoacetate methyltransferase ; DNMT = DNA methyltransferase

DNA methylation is one of several epigenetic mechanisms that cells can use to control gene expression which play key regulatory roles in organogenesis, homeostasis and pathological processes (Yao et al., 2016). This is one of the normal cellular processes that also requires SAM. In the central nervous system, DNA methylation is crucial for normal brain development and functioning (Younesian et al., 2022). Recent studies have pointed to the role of epigenetic changes such as DNA methylation or histone modifications in various neurological disorders (Younesian et al., 2022). As example, observations in patients suffering of autism spectrum disorders, that share similar symptomatology with CTD, highlight the importance of DNA methylation in this disease (Williams and LaSalle, 2022). The DNA hypo-methylation observed in both CrT KO mice and CTD brain organoids validates our hypothesis of methylation dysregulation and could be related to the CTD symptomatology. This study

highlights for the first time an epigenetic marker and new pathophysiological pathway in CTD. In the future, it will be interesting to look at other epigenetic processes such as N6 methyladenosine (m6A) of RNA or methylation of histones.

We established previously that DCE, a prodrug of creatine improves creatine cerebral levels and cognitive functions of CrT KO mice after one month of intranasal administration (Ullio-Gamboa et al., 2019). Restauration of the DNA methylation balance after treatment with DCE in CrT KO mice places this dysregulation as a potential biomarker of pharmacology efficacy for preclinical studies. It would be interesting to determine whether this hypo-methylation of DNA can be found in extra-cerebral regions such as plasma or fibroblasts.

In addition, this hypo-methylation of DNA is a potential target for adjunctive therapies. Indeed, the SAM supply relies on the one-carbon cycle in which enter folate, vitamin B12, vitamin B2, and other precursors such as serine, glycine, histidine, tryptophan and choline. Even after restoring creatine cerebral levels, CTD patients may benefit from dietary supplementation with known methyl donors such as betaine, methionine or precursors of SAM in the one-carbon cycle that will balance the DNA methylation.

Today, several CrT knockout rodent models are available and recapitulate many aspect of the human pathophysiology including cognitive disorders (Baroncelli et al., 2014; Duran-Trio et al., 2021; Skelton et al., 2011). Those models are used for pre-clinical investigations but development of new therapeutic strategy is slow down by the lack of easily quantifiable markers to monitor pharmacological efficacy. In addition to rodent models, human cell-based organoids are recently allow to study human-specific aspects of the physiopathology and may offer new opportunities to better understand molecular pathways involved in the disease, discover new markers, and potential targets (Broca-Brisson et al., 2023, preprint; Disdier et al., 2023, submitted). Consistency of the observations in *in vivo* model and CTD patient's brain organoids confirm the translational potential of this *in vitro* model for preclinical pharmacology studies.

198 Overall, using mouse model of CTD and human cell based brain organoids, we demonstrate for the
199 first time the implication of epigenetic alterations in the pathophysiology of CTD. Increase creatine in
200 the brain of CrT KO mice after DCE treatment restore normal DNA methylation levels, which unveils
201 the potential of using DNA methylation as a marker to monitor the drug efficacy.

202

203 **Acknowledgements**

204 This study was supported by the association Xtraordinaire and the Association for Creatine Deficiencies
205 (ACD) as well as the CEA. We are grateful to the patients included in this study.

206

207 **Conflict of interest**

208 The authors declare that they have no conflict of interest.

209

210 **References**

211 Baroncelli L, Alessandrì MG, Tola J, Putignano E, Migliore M, Amendola E, Gross C, Leuzzi V, Cioni G,
212 Pizzorusso T. 2014. A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Res* **3**:228.
213 doi:10.12688/f1000research.5369.1
214 Braissant O, Henry H, Béard E, Uldry J. 2011. Creatine deficiency syndromes and the importance of
215 creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* **40**:1315–1324. doi:10.1007/s00726-011-0852-z
216 Brosnan JT, da Silva RP, Brosnan ME. 2011. The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*
217 **40**:1325–1331. doi:10.1007/s00726-011-0853-y
218 Duran-Trio L, Fernandes-Pires G, Simicic D, Grosse J, Roux-Petronelli C, Bruce SJ, Binz P-A, Sandi C,
219 Cudalbu C, Braissant O. 2021. A new rat model of creatine transporter deficiency reveals
220 behavioral disorder and altered brain metabolism. *Sci Rep* **11**:1636. doi:10.1038/s41598-020-
221 80824-x
222 Fernandes-Pires G, Braissant O. 2022. Current and potential new treatment strategies for creatine
223 deficiency syndromes. *Mol Genet Metab* **135**:15–26. doi:10.1016/j.ymgme.2021.12.005
224 Joncquel-Chevalier Curt M, Voicu P-M, Fontaine M, Dessein A-F, Porchet N, Mention-Mulliez K,
225 Dobbelaere D, Soto-Ares G, Cheillan D, Vamecq J. 2015. Creatine biosynthesis and transport in
226 health and disease. *Biochimie* **119**:146–165. doi:10.1016/j.biochi.2015.10.022
227 Lancaster MA, Knoblich JA. 2014. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells.
228 *Nat Protoc* **9**:2329–2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
229 Mabondzo A, Harati R, Broca-Brisson L, Guyot A-C, Costa N, Cacciante F, Putignano E, Baroncelli L,
230 Skelton MR, Saab C, Martini E, Benech H, Joudinaud T, Gaillard J-C, Armengaud J, Hamoudi R.
231 2023. Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers

232 including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency. *Front Mol*
233 *Neurosci* **16**:1118707. doi:10.3389/fnmol.2023.1118707
234 Nassor F, Jarray R, Biard DSF, Maïza A, Papy-Garcia D, Pavoni S, Deslys J-P, Yates F. 2020. Long Term
235 Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a
236 Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci* **14**:14. doi:10.3389/fncel.2020.00014
237 Pavoni S, Jarray R, Nassor F, Guyot A-C, Cottin S, Rontard J, Mikol J, Mabondzo A, Deslys J-P, Yates F.
238 2018. Small-molecule induction of Aβ-42 peptide production in human cerebral organoids to
239 model Alzheimer's disease associated phenotypes. *PLoS One* **13**:e0209150.
240 doi:10.1371/journal.pone.0209150
241 Russell AP, Ghobrial L, Wright CR, Lamon S, Brown EL, Kon M, Skelton MR, Snow RJ. 2014. Creatine
242 transporter (SLC6A8) knockout mice display an increased capacity for in vitro creatine
243 biosynthesis in skeletal muscle. *Front Physiol* **5**:314. doi:10.3389/fphys.2014.00314
244 Skelton MR, Schaefer TL, Graham DL, deGrauw TJ, Clark JF, Williams MT, Vorhees CV. 2011. Creatine
245 Transporter (CrT; Slc6a8) Knockout Mice as a Model of Human CrT Deficiency. *PLoS ONE*
246 **6**:e16187. doi:10.1371/journal.pone.0016187
247 Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. 2001. Methylation demand and homocysteine
248 metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol*
249 *Endocrinol Metab* **281**:E1095-1100. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.5.E1095
250 Stockebrand M, Sasani A, Das D, Hornig S, Hermans-Borgmeyer I, Lake HA, Isbrandt D, Lygate CA,
251 Heerschap A, Neu A, Choe C-U. 2018. A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency
252 Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism. *Front Physiol* **9**:773.
253 doi:10.3389/fphys.2018.00773
254 Trotier-Faurion A, Dézard S, Taran F, Valayannopoulos V, de Lonlay P, Mabondzo A. 2013. Synthesis
255 and biological evaluation of new creatine fatty esters revealed dodecyl creatine ester as a
256 promising drug candidate for the treatment of the creatine transporter deficiency. *J Med Chem*
257 **56**:5173–5181. doi:10.1021/jm400545n
258 Ullio-Gamboa G, Udobi KC, Dezard S, Perna MK, Miles KN, Costa N, Taran F, Pruvost A, Benoit J-P,
259 Skelton MR, Lonlay P de, Mabondzo A. 2019. Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as
260 a promising therapy for creatine transporter deficiency. *Nanomedicine (Lond)* **14**:1579–1593.
261 doi:10.2217/nnm-2019-0059
262 Valayannopoulos V, Bakouh N, Mazzuca M, Nonnenmacher L, Hubert L, Makaci F-L, Chabli A, Salomons
263 GS, Mellot-Draznieks C, Brulé E, de Lonlay P, Toulhoat H, Munnich A, Planelles G, de Keyzer Y.
264 2013. Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations
265 responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab Dis*
266 **36**:103–112. doi:10.1007/s10545-012-9495-9
267 Williams LA, LaSalle JM. 2022. Future Prospects for Epigenetics in Autism Spectrum Disorder. *Mol*
268 *Diagn Ther* **26**:569–579. doi:10.1007/s40291-022-00608-z
269 Yao B, Christian KM, He C, Jin P, Ming G-L, Song H. 2016. Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat*
270 *Rev Neurosci* **17**:537–549. doi:10.1038/nrn.2016.70
271 Younesian S, Yousefi A-M, Momeny M, Ghaffari SH, Bashash D. 2022. The DNA Methylation in
272 Neurological Diseases. *Cells* **11**:3439. doi:10.3390/cells11213439
273

3.3 Principaux résultats et résultats complémentaires

Parmi les 32 protéines retenues suite aux analyses protéomiques de l'article 1, MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2), un lecteur important de la méthylation de l'ADN, a été mis en évidence. Son domaine de liaison méthyl-CpG reconnaît et lie les régions 5-méthylcytosine (5-mC). L'abondance de MeCP2 est ainsi augmentée dans les organoïdes CTD.

Nous nous sommes donc intéressés au taux de méthylation de l'ADN dans les organoïdes cérébraux. Nous avons ainsi démontré une diminution de la 5-mC de l'ADN dans les organoïdes CTD (Figure 2 – Article 4). Nous avons confirmé ces résultats dans le cerveau du modèle de souris KO CRT (Figure 1 – Article 4). De plus, le taux de 5-mC de l'ADN tend à être restauré suite au traitement avec le DCE. Ces observations démontrent que la restauration des réserves de créatine cérébrale module la méthylation de l'ADN et par conséquent l'expression génique.

4. Discussion

Ce projet de thèse établit pour la première fois l'utilisation d'organoïdes cérébraux CTD humains comme modèle de haute-fidélité pour comprendre la physiopathologie de cette maladie. Grâce à l'obtention de résultats complémentaires avec ce modèle humain et le modèle murin KO CRT, nous avons pu mettre en évidence une possible altération de la neurogenèse et de la synaptogenèse dans le CTD, ainsi qu'un hypométabolisme et une hypométhylation de l'ADN.

Les organoïdes cérébraux CTD présentent une taille et une diversité de types cellulaires similaires à ceux obtenus à partir de donneurs sains, mais ils ont une expression réduite des marqueurs liés à la neurogenèse. Les facteurs de transcription SOX2 et PAX6 sont des régulateurs essentiels de la différenciation et de la prolifération des cellules souches neurales, assurant le processus de neurogenèse (Cimadamore *et al*, 2013; Manuel *et al*, 2015). Les mutations de SOX2 sont associées à des déficiences intellectuelles (Dennert *et al*, 2017), à des crises d'épilepsie et à un développement défectueux de l'hippocampe (Mercurio *et al*, 2021), des symptômes similaires aux patients CTD. En plus de la diminution de l'expression des marqueurs des progéniteurs, nous montrons que les organoïdes CTD ont une expression réduite des marqueurs GABAergiques (GABBR1), glutamatergiques (GRIA2) et postsynaptiques (PSD95), suggérant une réduction de la synaptogenèse. Ceci est en accord avec nos résultats chez les souris KO CRT (*Slc6a8*$^{-/y}$) qui ont montré une réduction de l'expression des ARNm de PSD95 et CREB (Ullio-Gamboa *et al*, 2019). De plus, une densité réduite des épines corticales et des réductions des niveaux de protéines de plusieurs marqueurs synaptiques ont été observées dans le cerveau des souris KO CRT (Chen *et al*, 2021; Baroncelli *et al*, 2016; Ghirardini *et al*, 2023) et des rats KI^{Y389C} (Duran-Trio *et al*, 2022). Ainsi, notre modèle d'organoïdes cérébraux CTD récapitule les altérations de la neurogenèse et de la synaptogenèse observées dans les modèles murins CTD et ces altérations peuvent conduire aux déficits cognitifs observés chez les patients CTD. De plus, une étude a montré que la délétion du gène *Slc6a8* dans le cerveau murin en

développement est nécessaire pour obtenir les mêmes déficits cognitifs que ceux observés chez les souris KO CRT ubiquitaires (Udobi *et al*, 2019). Ces résultats en accord avec nos observations, apportent une preuve supplémentaire de l'importance de la créatine dans le développement du cerveau. Le déficit de neurogenèse est également observé dans d'autres pathologies de déficience intellectuelle telles que le syndrome de Down (DS). En effet, Tang *et al* ont montré dans des organoïdes cérébraux de patients DS, une diminution de la prolifération et des marqueurs des couches II et IV des neurones corticaux dans les régions sous-corticales (Tang *et al*, 2021).

Pour mieux comprendre le lien mécanistique entre le manque de créatine et les potentiels déficits de neurogenèse et synaptogenèse, nous avons analysé le protéome des organoïdes CTD (Article 1) et de différentes régions cérébrales de souris KO CRT (Article 2). Nos analyses protéomiques nous ont ainsi permis d'identifier les protéines et les voies moléculaires susceptibles d'être perturbées dans le CTD. Les principaux résultats de l'article 1 sur les organoïdes cérébraux CTD sont résumés schématiquement dans la Figure 7 – Article 1, tandis que les principaux résultats de l'article 2 sur les souris KO CRT sont résumés dans la Figure 5 – Article 2.

Dans les organoïdes cérébraux humains, nous avons mis en évidence 32 protéines dont l'abondance est modifiée dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes sains. Parmi ces 32 protéines, 21 ont déjà été associées aux troubles du spectre autistique, à la déficience intellectuelle, aux troubles du neurodéveloppement et aux encéphalopathies épileptiques. Ces profils d'expression protéique modifiée indiquent que les organoïdes cérébraux CTD peuvent refléter de manière appropriée la physiopathologie moléculaire des patients. Nous avons également révélé que deux voies clés, celles de la GSK3β et de SRC, étaient altérées dans les organoïdes cérébraux CTD. L'outil web STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) a confirmé que les deux voies étaient associées aux 32 protéines les plus abondantes mises en évidence dans nos analyses sur les organoïdes cérébraux.

GSK3β est une kinase clé constitutivement active, régulée négativement par sa phosphorylation à la Ser9 (Hur & Zhou, 2010). La GSK3 possède une large gamme de substrats et régule donc un large éventail de processus cellulaires, notamment la neurogenèse, la polarisation neuronale, la croissance des axones au cours du développement du cerveau, ainsi que la régulation des microtubules, le métabolisme énergétique et la dynamique du réseau mitochondrial (Hur & Zhou, 2010). Ces régulations s'effectuent soit par action directe, soit par modulation transcriptionnelle. Par exemple, la GSK3β activée module directement la dynamique des microtubules en phosphorylant les protéines associées aux microtubules (MAP) (Rippin & Eldar-Finkelman, 2021), comme MAP1B et la stathmine qui ont été mises en évidence dans notre analyse protéomique. MAP1B participe à son tour à la régulation de la structure et de la physiologie des épines dendritiques dans les synapses glutamatergiques (Tortosa *et al*, 2011). De plus, les modulations de l'activité de MAP1B et d'autres MAP telles que CRMP2, APC et Tau par GSK3β permettent de réguler la croissance axonale en modifiant la dynamique des microtubules (Hur & Zhou, 2010; Goold & Gordon-Weeks, 2004). GSK3β peut également réguler les protéines motrices sur les microtubules et impacter le trafic dans la cellule (Rippin & Eldar-Finkelman, 2021).

GSK3β influence aussi l'expression des gènes en contrôlant le niveau, la localisation nucléaire et la liaison à l'ADN des facteurs de transcription, régulant ainsi indirectement la neurogenèse (Hur & Zhou, 2010). Ainsi, parmi ces nombreux substrats figurent les facteurs de transcription, « Nuclear Factor of Activated T-cells » ou NFAT, SMAD1, NF-κB, β-caténine et « cAMP Response Element Binding » ou CREB (Hur & Zhou, 2010; Rippin & Eldar-Finkelman, 2021). Ainsi, la suractivation de GSK3β dans les organoïdes cérébraux CTD est cohérente avec des précédentes observations dans un modèle de souris KO CRT, où il a été montré que le niveau d'ARNm de CREB était diminué (Ullio-Gamboa *et al*, 2019). De nombreuses études ont montré que la modulation de l'activité de GSK3β peut réguler l'homéostasie des progéniteurs neuraux (Dohare *et al*, 2019; Guyot *et al*, 2020; Hur & Zhou, 2010; Jurado-Arjona *et al*, 2016; Kim *et al*, 2009) et GSK3 est également impliqué dans l'homéostasie énergétique, l'apoptose et l'autophagie,

ainsi que dans les interactions avec les protéines liées à la neurodégénérescence (Hernandez *et al*, 2013). De plus, les altérations de l'activité de GSK3 ont été associées à des maladies neurodéveloppementales telles que les troubles du spectre autistique (Hernandez *et al*, 2013; Rizk *et al*, 2021).

La suractivation de GSK3β dans nos organoïdes cérébraux CTD a été associée à une diminution du niveau des marqueurs synaptiques et des progéniteurs neuraux par rapport aux organoïdes sains. Ces altérations sont corrigées suite à l'expression d'un transporteur SLC6A8 fonctionnel, rétablissant le transport de créatine dans les organoïdes cérébraux CTD. L'introduction d'un CRT fonctionnel dans les organoïdes CTD conduit à une réduction de l'activation de GSK3β, à une restauration du niveau du marqueur de progéniteur SOX2, ainsi que des protéines mises en évidence liées aux déficiences intellectuelles telles que PAK1 et MAP1B.

Chez les souris KO CRT, nous avons mis en évidence 14 protéines dont l'abondance est modifiée dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et le tronc cérébral et qui est modulée par le traitement DCE. Parmi ces 14 protéines, 13 sont liées à la déficience intellectuelle, aux troubles du spectre autistique, au trouble bipolaire, aux neuropathies axonales, à la régulation de la croissance des neurites, à la leucodystrophie, à l'ataxie cérébelleuse, à des encéphalopathies épileptiques ou à des maladies neurodégénératives. Parmi ces 14 protéines, l'abondance de KIF1A dans les quatre régions du cerveau (cortex, hippocampe, cervelet et tronc cérébral) était significativement corrélée avec l'index de discrimination dans le test de reconnaissance d'objets (ORT), tandis que l'abondance de cette protéine dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet était corrélée avec l'alternance spontanée dans le test Y-maze. L'analyse de co-immunoprécipitation a confirmé que KIF1A interagit avec PLCB1 dans les différentes régions du cerveau, suggérant un rôle clé de KIF1A dans le CTD. L'association de KIF1A et PLCB1 aux fonctions cognitives a déjà été rapporté dans différents troubles cérébraux (Manning *et al*, 2012; Lee *et al*, 2015).

Le test ORT se concentre principalement sur la fonction hippocampique. L'augmentation de l'abondance de KIF1A dans l'hippocampe des souris KO CRT suggère que le transport axonal antérograde peut être altéré dans les neurones de l'hippocampe, ce qui peut conduire à des changements dans les protéines synaptiques, contribuant ainsi à des changements dans la neurotransmission de l'hippocampe et à des troubles cognitifs et de la mémoire. Dans un modèle d'α-synucléinopathie chez le rat, des niveaux élevés de KIF1A ont été observés dans la substance noire (Chung *et al*, 2009), ce qui suggère la possibilité d'un déséquilibre dans la dégradation et la synthèse des protéines et/ou d'un déficit dans le transport axonal. Des mutations du gène KIF1A ont également été trouvées chez des patients atteints du syndrome de Rett qui est un trouble neurodéveloppemental grave (Wang *et al*, 2019a). KIF1A participe au transport vésiculaire. Les vésicules contenant la neurotrophine BDNF sont sous le contrôle de KIF1A (Kondo *et al*, 2012). Le BDNF est produit dans le néocortex tout au long du développement du cerveau et accélère la redistribution globale des neurones corticaux. La régulation des niveaux de KIF1A par le traitement DCE chez les souris KO CRT entraîne des niveaux plus élevés de pro-BDNF/BDNF, qui sont liés à l'amélioration de la fonction cognitive. Ces résultats suggèrent qu'une expression normale de KIF1A, mais pas une surexpression, pourrait être indispensable à la fonction cognitive médiée par le BDNF. L'effet direct du DCE sur la régulation de l'expression du pro-BDNF/BDNF n'est cependant pas exclu. La surabondance de KIF1A dans le cerveau en développement des souris KO CRT entraîne probablement un dysfonctionnement synaptique, contribuant ainsi à des troubles cognitifs et de la mémoire (Iki *et al*, 2005; Lu *et al*, 2014). Nous avons également remarqué que l'abondance de KIF1A dans l'hippocampe et le cortex des souris KO CRT est corrélée avec les performances cognitives du test Y-maze qui permet d'évaluer la mémoire de travail et la flexibilité cognitive chez les souris. Ces résultats indiquent que KIF1A est l'un des acteurs clés potentiels de la physiopathologie du CTD.

Le dérèglement de la signalisation de PLCB1 est lié à plusieurs troubles cérébraux, notamment l'épilepsie, la schizophrénie, les troubles bipolaires, la maladie de

Huntington, la dépression et la maladie d'Alzheimer (Alberini, 2009; Cholewa-Waclaw *et al*, 2016). Nous avons démontré que le traitement DCE module l'abondance relative de PLCB1 dans différentes régions du cerveau. PLCB1 semble réguler la voie NF-κβ en régulant les niveaux de protéines inhibitrices IκBα chez les souris KO CRT. La signalisation NF-κβ dans le cerveau est impliquée dans la régulation de la survie et de la fonction neuronale (Meffert *et al*, 2003; Kaltschmidt *et al*, 2006). Lorsqu'il n'est pas lié à IκBα, NF-κβ se déplace dans le noyau pour activer les gènes cibles. Les souris déficientes en IκBα présentent ainsi une activation dérégulée et soutenue de NF-κβ (Lian *et al*, 2012). Les souris KO CRT montrent une diminution de l'abondance de IκBα dans le cortex et l'hippocampe, ce qui est compensé par le traitement au DCE. Il semble probable que la régulation à la hausse des niveaux de PLCB1 dans le cortex, induite par le DCE, conduise à la production d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) (Rusciano *et al*, 2021), et que l'IP3 pourrait moduler la voie NF-κβ via la régulation d'IκBα, modifiant ainsi l'abondance des gènes induits par NF-κβ. Il se pourrait également que la voie NF-κβ soit régulée par la suractivation de GSK3β qui est connu pour réguler positivement ce facteur (Lee & Kim, 2007). La diminution de l'abondance de l'IκBα pourrait réguler la neuroinflammation ainsi que la formation de la mémoire spatiale et la plasticité synaptique, probablement par le biais de la signalisation du BDNF. La régulation de la neuroinflammation est également soutenue par l'identification de NCAM1 chez les souris KO CRT dont l'abondance est altérée et restaurée par le traitement DCE.

La modulation de GSK3β dans les organoïdes cérébraux CTD, mise en évidence par les observations protéomiques, suggère un potentiel impact sur le métabolisme énergétique. En effet, GSK3β est impliqué dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, ainsi que sa motilité (Yang *et al*, 2017). Cette kinase interagit également avec les différents complexes de l'OXPHOS et pourrait moduler l'homéostasie du glucose, notamment à cause de ces interactions avec la glycogène synthase (Yang *et al*, 2017; Lee & Kim, 2007). De plus, lors d'un stress dans un modèle

murin KO pour une sous-unité du complexe IV de l'OXPHOS, les neurones présentent une augmentation transitoire de l'incorporation de glucose et de l'activité des enzymes de la glycolyse pour compenser le déficit énergétique (Garcia *et al*, 2022).

Nous avons cherché à étudier les voies du métabolisme énergétique dans les organoïdes CTD et chez les souris KO CRT. Les principaux résultats sont résumés dans la Figure 8 – Article 3. La glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative permettent de maintenir en permanence les niveaux d'ATP qui constituent l'apport énergétique nécessaire au bon fonctionnement du cerveau. Le système Cr/PCr vient en complément pour servir de tampon énergétique et maintenir des niveaux constants d'ATP. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que le manque d'incorporation de créatine dans les cellules CTD induit une réponse adaptative au déséquilibre énergétique en stimulant la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Cependant, les données d'imagerie TEP au [18F]FDG rapportées dans l'article 3 suggèrent un déclin significatif du métabolisme du glucose chez les souris KO CRT. Cette observation suggère que soit la glycolyse n'est pas stimulée par la diminution énergétique chronique due à la déficience du système Cr/PCr, soit l'incorporation du glucose dans les cellules cérébrales est altérée.

L'évaluation de l'expression des transporteurs du glucose, GLUT1 pour les neurones, et GLUT3 pour les astrocytes (Koepsell, 2020; McEwen & Reagan, 2004), ne révèle aucune modification significative dans le cerveau des souris KO CRT et dans les organoïdes cérébraux CTD. Ces observations suggèrent que la régulation a lieu après la transcription, par exemple pendant le trafic des transporteurs. Les GLUT sont principalement localisés dans des vésicules intracellulaires qui doivent être transloquées vers la surface. Une étude a constaté que seulement 4 % de GLUT3 est localisé à la surface de la cellule (McClory *et al*, 2014). Ainsi, l'expression transcriptionnelle des GLUT ne récapitule pas la fonctionnalité réelle des transporteurs. La translocation des vésicules de GLUT vers la surface cellulaire est médiée par l'AMPK (Muraleedharan & Dasgupta, 2022). L'AMPK activée phosphoryle directement TXNIP

et TBC1D1 dans les astrocytes et les neurones respectivement, augmentant ainsi la translocation des vésicules de GLUT vers la surface cellulaire. L'AMPK est activée en cas de déficit énergétique notamment lorsqu'il y a une augmentation des rapports AMP/ATP et ADP/ATP (Steinberg & Hardie, 2023). L'AMPK n'active pas seulement le trafic de GLUT, mais initie également une série de changements compensatoires qui maintiennent les niveaux d'ATP cellulaires. Par exemple, l'AMPK phosphoryle la glycogène synthase pour arrêter la synthèse du glycogène et augmenter la production d'ATP par la glycolyse. Dans le muscle des souris KO CRT, il a été démontré que la réduction de l'ATP entraîne une activation chronique de l'AMPK pour favoriser la production d'énergie (Stockebrand *et al*, 2018). Cependant, dans le cerveau des souris KO CRT, nous avons démontré que l'AMPK n'est pas activée. Ces observations suggèrent que les cellules cérébrales CTD ne sont pas en mesure de promouvoir la translocation de surface des transporteurs GLUT pour améliorer l'incorporation du glucose. La perte d'activation de l'AMPK dans les cellules cérébrales CTD peut donc expliquer la diminution d'incorporation du [18F]FDG chez les souris KO CRT. De plus, la voie de l'AMPK semble impliquée dans la neurodégénérescence et d'autres neuropathologies (Muraleedharan & Dasgupta, 2022). Le lien entre l'AMPK et le métabolisme de la créatine a déjà été souligné auparavant. En effet, l'AMPK serait un régulateur positif du transport de la créatine dans les cardiomyocytes, tandis qu'il inhiberait le transport dans les cellules rénales (van de Kamp *et al*, 2014).

GSK3 est également impliqué dans le métabolisme du glucose puisqu'elle phosphoryle la glycogène synthase (GYS), ce qui entraîne l'inactivation de l'enzyme et sa dégradation ultérieure dans le protéasome (Muraleedharan & Dasgupta, 2022). Par ailleurs, GYS1 et GYS2 sont moins abondantes dans les organoïdes CTD, ce qui suggère que le glucose n'est pas stocké sous forme de glycogène et est immédiatement utilisé dans la voie de la glycolyse pour produire de l'ATP. En outre, GSK3 renforce l'hexokinase 2 (Gimenez-Cassina *et al*, 2009) et phosphoryle la pyruvate déshydrogénase (Hoshi *et al*, 1996), un composant important du cycle de Krebs. Ces résultats suggèrent que les cellules cérébrales CTD tentent toutefois de compenser la

diminution énergétique chronique due à l'absence du système Cr/PCr. Cependant, la suractivation de GSK3β peut également inhiber l'AMPK et favoriser des dysfonctions mitochondriales (Rippin & Eldar-Finkelman, 2021; Martin *et al*, 2018). En effet, GSK3β est impliquée dans la régulation de la biogenèse mitochondriale et peut inhiber les différents complexes de l'OXPHOS (Yang *et al*, 2017). Lorsque la kinase GSK3β est active, elle phosphoryle PGC-1α ce qui favorise sa dégradation. PGC-1α est un co-activateur de transcription qui régule plusieurs aspects des fonctions mitochondriales (Rippin & Eldar-Finkelman, 2021). Lorsqu'il est actif, cela permet une augmentation de la biogenèse et de la respiration mitochondriale. De plus, GSK3β favorise la fragmentation du réseau mitochondrial en phosphorylant la protéine de fission DRP1 (DNM1L) ce qui augmente son activité GTPase, et en diminuant le niveau d'expression de la protéine de fusion MFN2 (Yang *et al*, 2017; Rippin & Eldar-Finkelman, 2021). La suppression de l'activité de GSK3β dans un modèle d'ischémie cérébrale permet de diminuer l'expression des protéines de fission et réduit ainsi la fragmentation du réseau mitochondrial (Zhang *et al*, 2015).

Plusieurs inhibiteurs de GSK3β sont développés comme potentiels traitement pour des maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives (Franklin *et al*, 2014; Rippin & Eldar-Finkelman, 2021). En effet, une étude a montré que des inhibiteurs de GSK3 peuvent inverser les déficits de la potentialisation à long terme et de la cognition chez un modèle de souris du syndrome de l'X fragile (Franklin *et al*, 2014).

Parmi les protéines mises en évidence dans les analyses protéomiques, plusieurs interagissent ou sont des régulateurs de mécanismes épigénétiques tels que MeCP2, HDAC 1 et 2, GSK3β (Meredith *et al*, 2015). La méthylation de l'ADN est l'un des nombreux mécanismes épigénétiques que les cellules peuvent utiliser pour contrôler l'expression des gènes qui jouent des rôles régulateurs clés dans l'organogenèse, l'homéostasie et les processus pathologiques (Xie *et al*, 2023). C'est l'un des processus cellulaires normaux qui nécessite également de la S-adénosylméthionine (SAM). Dans

le SNC, la méthylation de l'ADN influence également de multiples aspects de la neurogenèse, depuis le maintien et la prolifération des cellules souches, la différenciation et la maturation neuronales, et la synaptogenèse (Jobe & Zhao, 2017). Des études récentes ont mis en évidence le rôle des changements épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN ou les modifications des histones dans divers troubles neurologiques (Younesian *et al*, 2022). Par exemple, les observations faites chez des patients souffrant de troubles du spectre autistique et présentant des symptômes similaires aux patients CTD soulignent l'importance de la méthylation de l'ADN dans cette maladie (Williams & LaSalle, 2022). L'hypométhylation de l'ADN observée à la fois chez les souris KO CRT et dans les organoïdes CTD valide notre hypothèse d'une dérégulation de la méthylation et pourrait être liée aux symptômes des patients CTD. Ces résultats, résumés dans la Figure 3 – Article 4, mettent en évidence pour la première fois un marqueur épigénétique et une nouvelle voie physiopathologique dans le CTD.

De précédents résultats ont montré que le DCE, un dérivé lipophile de la créatine, améliore les niveaux cérébraux de créatine et les fonctions cognitives des souris KO CRT après un mois d'administration intranasale (Ullio-Gamboa *et al*, 2019). De plus, nous démontrons dans l'article 4 que le traitement avec le DCE augmente également l'intensité de la méthylation de l'ADN chez les souris KO CRT. La restauration de l'équilibre de la méthylation de l'ADN après un traitement au DCE chez les souris KO CRT place cette dérégulation comme un biomarqueur potentiel de l'efficacité de la pharmacologie pour les études précliniques.

De plus, cette hypométhylation de l'ADN est une cible potentielle pour de nouvelles thérapies. En effet, l'approvisionnement en SAM repose sur le cycle du folate et de la méthionine dans lequel entrent le folate, la vitamine B12, la vitamine B2 et d'autres précurseurs tels que la sérine, la glycine, l'histidine, le tryptophane et la choline. Même après avoir rétabli les niveaux cérébraux de créatine, les patients atteints de CTD peuvent bénéficier d'une supplémentation alimentaire avec des donneurs de

groupement méthyl connus tels que la bétaïne, la méthionine ou des précurseurs de la SAM qui pourraient équilibrer la méthylation de l'ADN.

CONCLUSION

Le déficit en transporteur de créatine (CTD) est une maladie métabolique et génétique rare dans laquelle la perte de fonctionnalité du transporteur de la créatine (CRT) conduit à une absence de créatine (Cr) dans le cerveau des patients. Ainsi, le système nerveux central est l'organe principalement touché chez ces patients qui présentent un trouble neurodéveloppemental se manifestant par une déficience intellectuelle avec un retard de langage, ainsi que des troubles du comportement et de l'épilepsie dans certains cas (van de Kamp *et al*, 2014). Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace pour le CTD, et les patients atteints ont besoin d'une prise en charge familiale ou institutionnelle à vie.

Le système Cr/PCr ayant de multiples rôles dans les cellules (métabolisme énergétique, neuromodulation, stabilisation des membranes, anti-apoptotique, antioxydant, neuroprotecteur, osmolyte), son absence a des répercussions importantes en terme de physiologie (Fernandes-Pires & Braissant, 2022; Tokarska-Schlattner *et al*, 2012; Giusti *et al*, 2019; Sestili *et al*, 2011). Cependant, les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires cérébraux affectés par la diminution en créatine chez les patients CTD restent très limités bien qu'ils soient nécessaires dans l'identification de nouvelles cibles potentielles pour des traitements pharmacologiques. Plusieurs modèles murins CTD ont été développés, mais la plupart des études se sont concentrées sur la description des déficits comportementaux et cognitifs causés par un manque de créatine dans le cerveau et n'ont pas étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie (Skelton *et al*, 2011; Baroncelli *et al*, 2014; Duran-Trio *et al*, 2021). Nous avons récemment corrélé les fonctions cognitives d'un modèle de souris KO CRT avec des analyses protéomiques de leur tissu cérébral ce qui nous a permis de démontrer la régulation de protéines impliquées dans la synaptogenèse et dans la migration neuronale (Mabondzo *et al*, 2023). Cependant, ces observations nécessitent d'être validées dans un contexte humain. En effet, bien que ces modèles murins semblent récapituler le phénotype des patients CTD, les différences inter-espèces compliquent l'extrapolation des résultats à l'être humain. En outre, les cultures cellulaires humaines classiques sont souvent considérées comme non physiologiques

de par l'utilisation de cellules immortalisées, ainsi que l'absence de modélisation de l'architecture du tissu et des interactions des différents types cellulaires. Le rationnel de ce projet de thèse repose sur le développement d'un modèle cellulaire humain mimant le cerveau des patients CTD pour mieux appréhender le rôle de la créatine dans les dysfonctionnements cérébraux des patients atteints. L'objectif est d'identifier des signatures moléculaires pouvant être utilisées pour suivre l'efficacité de traitement lors des études précliniques et cliniques.

Les résultats de ce projet de thèse sont résumés dans la Figure 46 et la Figure 47.

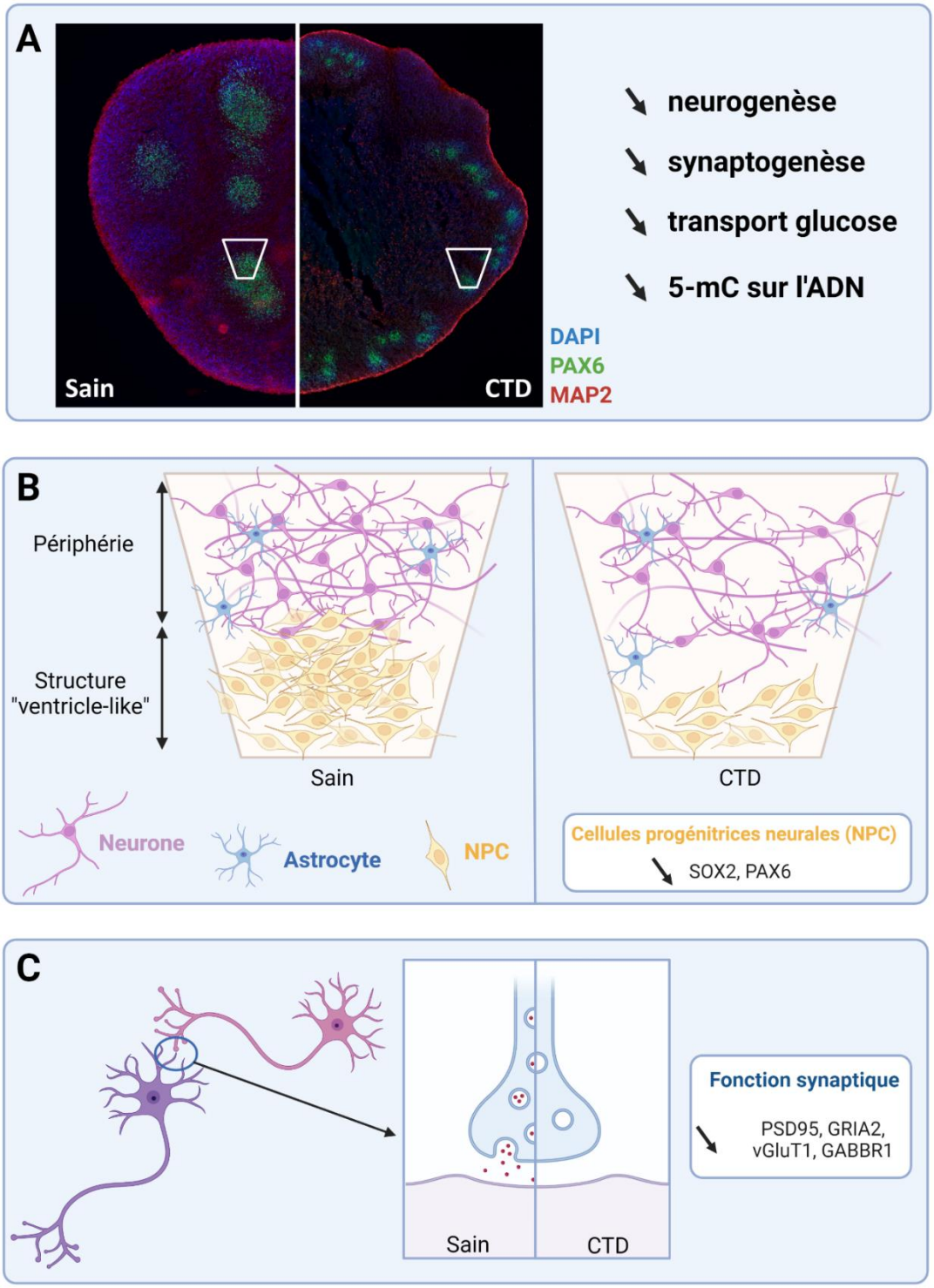


Figure 46 : Observations générales sur les organoïdes cérébraux CTD

(A) Observations générales sur la physiopathologie du CTD avec les organoïdes cérébraux CTD et les souris KO CRT : potentiels déficits de neurogenèse et de synaptogenèse, diminution du transport du glucose et hypométhylation de l'ADN. Les encadrés blancs sont des portions de structures *ventricle-like* schématisées dans la partie B. (B) Schéma de comparaison d'une portion de structures *ventricle-like* des organoïdes cérébraux sains (à gauche) et CTD (à droite). Les structures dans les organoïdes CTD présentent une diminution des marqueurs de progéniteurs neuraux (jaune), SOX2 et PAX6. (C) Les organoïdes CTD présentent également une diminution de marqueurs synaptiques (PSD95 : post-synaptique ; GRIA2 et vGluT1 : glutamatergiques ; GABBR1 : GABAergique). Créé avec BioRender

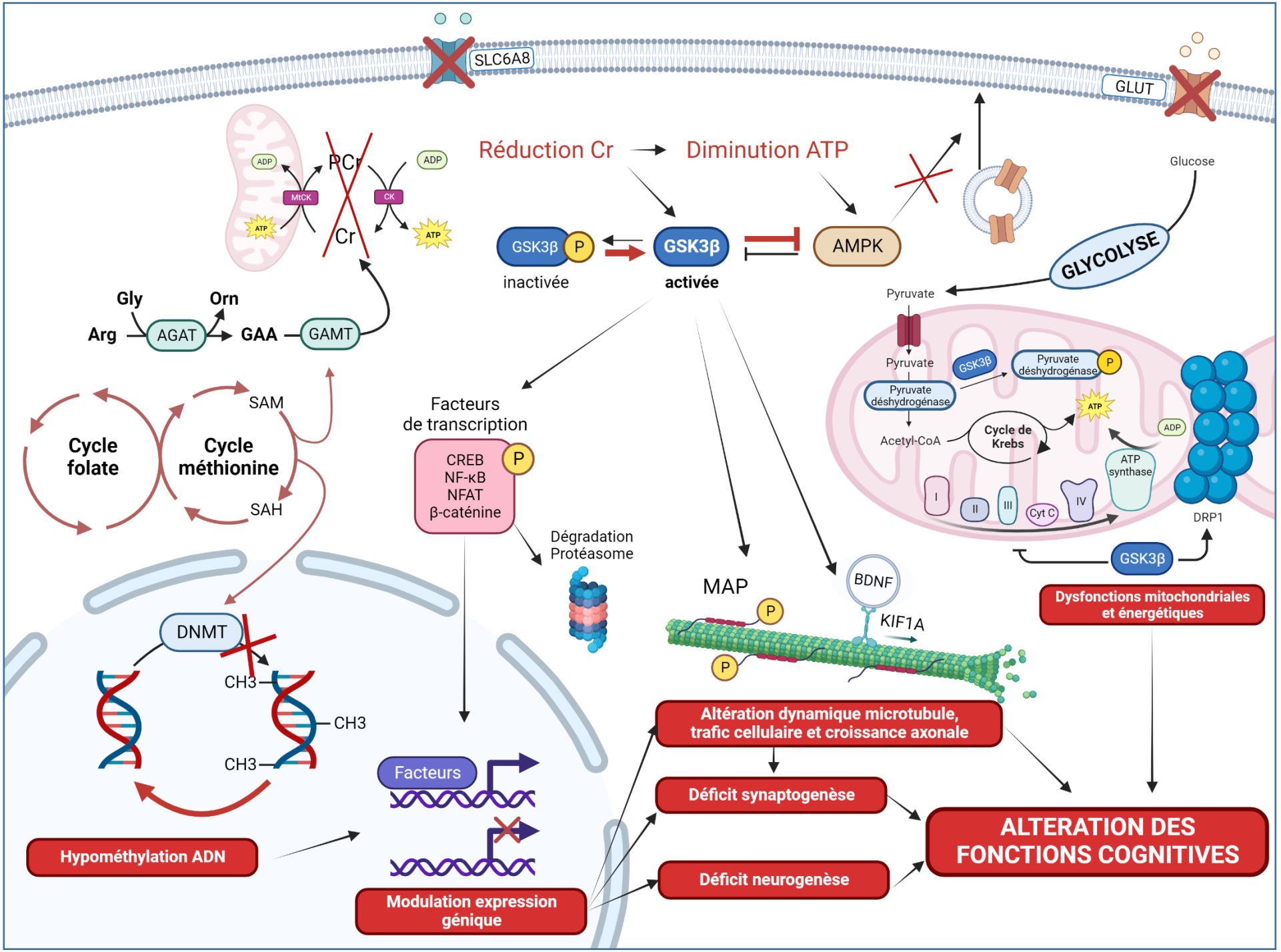


Figure 47 : Représentation des mécanismes mis en évidence dans la physiopathologie du CTD

Légende Figure 47 :

Dans les cellules CTD, l'absence de CRT (SLC6A8) entraine la diminution des réserves de Cr et PCr provoquant une diminution chronique d'énergie (ATP). Ce déficit entraine la suractivation de GSK3β qui est moins phosphorylée. La kinase GSK3β peut ensuite agir sur de nombreuses cibles. Elle agit sur des facteurs de transcription, modifiant ainsi leur dégradation, leur translocation dans le noyau ou leur capacité de fixation à l'ADN, ce qui module l'expression génique. L'hypométhylation de l'ADN peut également agir sur l'expression génique. La modification de l'expression d'un panel de gènes peut être responsable des potentiels déficits de neurogenèse et de synaptogenèse observés dans le CTD. GSK3β peut également altérer la dynamique du cytosquelette en agissant sur les protéines associées aux microtubules (telles que MAP1B) et sur les protéines de transport de cargo, ce qui modifie la croissance axonale et la synaptogenèse. La diminution d'ATP engendrée par la réduction de Cr a tendance à augmenter l'AMPK pour mettre en place des mécanismes permettant à la cellule de compenser ce déficit énergétique. Cependant, l'AMPK est moins active car elle est potentiellement inhibée par GSK3β. L'inactivation de l'AMPK empêche la translocation des vésicules contenant les transporteurs GLUT à la membrane basale, entrainant une diminution de l'apport de glucose dans les cellules CTD malgré la mise en place d'un système de compensation. Le réseau mitochondrial est également altéré par GSK3β qui tend à inactiver la pyruvate déshydrogénase et les différents complexes de l'OXPHOS. De plus, GSK3β active DRP1 et favorise ainsi la fission mitochondriale, tandis que l'expression des protéines de fusion est diminuée. Les dysfonctions mitochondriales et énergétiques, en combinaison avec l'altération de la dynamique des microtubules, des déficits de neurogenèse et de synaptogenèse, peuvent expliquer les altérations des fonctions cognitives dans le cerveau de patients CTD. Créé avec BioRender

Développement et caractérisation du modèle :

Nous avons développé le premier modèle d'organoïdes cérébraux CTD à partir de cellules de trois patients présentant différentes mutations. Les fibroblastes de ces patients ont été reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Ces iPSC expriment bien les marqueurs de pluripotence et n'ont pas de CRT fonctionnel.

Les organoïdes cérébraux dérivés à partir de ces iPSC semblent modéliser le cerveau antérieur et sont composés de divers types cellulaires tels que des cellules progénitrices neurales (SOX2 et PAX6) dans des structures « ventricle-like », des astrocytes (GFAP) et des oligodendrocytes immatures (NG2), des neurones immatures et matures (TBR1 et NeuN) à la périphérie des structures de progéniteurs (Figure 46A-B). Les organoïdes cérébraux CTD présentent une absence d'incorporation de créatine.

Afin d'infirmer et ou de confirmer nos résultats, nous avons également généré des organoïdes CTD-rescue pour restaurer les niveaux de créatine intracellulaire. Pour cela, nous avons inséré le gène *Slc6a8* fonctionnel dans les iPSC CTD et généré des organoïdes à partir de ces cellules rescue. Les iPSC et les organoïdes CTD-rescue sont capables d'incorporer de la créatine à des niveaux plus élevés que les cellules saines. Cependant, le niveau basal de créatine est similaire entre les CTD-rescue et le sain.

Suractivation de GSK3β :

Les analyses protéomiques de nos organoïdes cérébraux CTD par rapport aux sains ont permis de mettre en évidence un panel de 32 protéines dérégulées en lien avec les symptômes des patients et d'autres troubles neurodéveloppementaux. De plus, les analyses ont mis en évidence que les voies de signalisation de GSK3β et SRC sont altérées dans les organoïdes CTD.

GSK3β est une kinase clé impliquée dans de nombreux processus cellulaires qui a la particularité d'être active à l'état basal et d'être inactivée par des stimulations extracellulaires qui inhibent l'activité de la kinase. Cependant, GSK3β est suractivée

dans de nombreuses neuropathologies telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, la sclérose en plaque amyotrophique, le syndrome de l'X fragile ainsi que les troubles du spectre autistique (Rippin & Eldar-Finkelman, 2021; Hernandez *et al*, 2013; Rizk *et al*, 2021). Dans les organoïdes CTD, GSK3β est moins phosphorylée ce qui tend à la suractiver. De plus, les résultats des expérimentations menées sur les organoïdes cérébraux CTD tendent souvent à montrer un lien entre le mécanisme dérégulé et GSK3β, ce qui suggère un rôle potentiellement central de cette kinase dans la physiopathologie du CTD (Figure 47).

Régulation de la neurogenèse et de la synaptogenèse :

Nous montrons que les organoïdes cérébraux CTD présentent des potentiels déficits de neurogenèse et de synaptogenèse au vu de la diminution de différents marqueurs de progéniteurs et de marqueurs synaptiques. Ces déficits peuvent être dus directement à l'absence du système Cr/PCr, mais également à la dérégulation de l'état d'activation de GSK3β. En effet, la kinase a de nombreuses cibles parmi les facteurs de transcription et peut ainsi moduler l'expression génique. Elle peut également moduler le trafic le long du cytosquelette ainsi que la stabilité des microtubules (MT) en modifiant l'affinité des protéines associées au MT (MAP). Ces régulations peuvent ainsi impacter la neurogenèse et la synaptogenèse (Figure 47 et Figure 46C).

Régulation du métabolisme énergétique :

Nous montrons également que les organoïdes cérébraux CTD présentent un déficit d'incorporation du glucose et un déficit mitochondrial. Or, l'énergie cellulaire est indispensable au développement des cellules cérébrales lors de la neurogenèse ainsi qu'au bon fonctionnement des neurones. De plus, l'efficacité mitochondriale est essentielle au maintien de la fonction neuronale et de la plasticité, et l'intégrité

mitochondriale est une composante essentielle de l'apprentissage et de la mémoire (Martin *et al*, 2018).

Bien que les cellules essaient de compenser le déficit énergétique provoqué par l'absence du système Cr/PCr en augmentant l'abondance de certaines enzymes de la glycolyse, cette compensation n'est pas assez efficace. En effet, les transporteurs du glucose ne sont probablement pas acheminés à la membrane plasmique à cause d'une inactivation de l'AMPK qui peut être due à la suractivation de GSK3β (Figure 47).

De plus, il semblerait qu'il y ait un déficit mitochondrial dans les cellules CTD qui pourrait s'accompagner d'une fragmentation excessive du réseau mitochondrial notamment à cause de la suractivation de GSK3β.

Régulation des processus de méthylation :

Les organoïdes cérébraux CTD présentent une hypométhylation de l'ADN (Figure 47). Les processus de méthylation de l'ADN, des histones et des ARN sont des mécanismes épigénétiques qui peuvent dépendre de la disponibilité des donneurs de groupement méthyl tels que la S-adénosylméthionine (SAM) qui est également utilisée pour la synthèse de créatine. Les modifications épigénétiques peuvent influencer la neurogenèse et sont impliquées dans plusieurs neuropathologies telles que les troubles du spectre autistique, les troubles épileptiques ainsi que des maladies neurodégénératives (Yao *et al*, 2016; Younesian *et al*, 2022; Van Loo *et al*, 2022). De plus, GSK3β peut moduler ces processus épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou des ARNm dans les cellules souches embryonnaires murines (Faulds *et al*, 2018; Meredith *et al*, 2015).

Somme toute, l'absence du système Cr/PCr entraîne plusieurs mécanismes tels que la suractivation de voies de signalisation clés à l'instar de GSK3β, l'expression génique de facteurs, la stabilité des microtubules, le déficit d'incorporation de glucose, le déficit

mitochondrial et l'hypométhylation de l'ADN. Ces modifications peuvent altérer les processus de neurogenèse et de synaptogenèse et par conséquent être responsables des altérations des fonctions cognitives chez les patients. Ces différentes voies dérégulées, décrites pour la première fois dans le CTD grâce à l'utilisation conjointe d'organoïdes cérébraux CTD humains et de modèles murins *Slc6a8*$^{-/y}$, mettent en évidence de nouveaux biomarqueurs qui peuvent être utilisés pour tester l'efficacité thérapeutique de candidats médicaments dans des études précliniques et cliniques.

Au total, ce travail de thèse met en exergue la manière dont le dysfonctionnement d'une seule protéine de transport peut altérer de manière significative la biochimie du cerveau, jouant un rôle crucial dans la déficience intellectuelle chez les patients souffrant d'un déficit en transporteur de créatine. Les retombées expérimentales améliorent de façon indiscutable notre compréhension de la physiopathologie du CTD, offrant ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques et une base solide pour la poursuite de la recherche dans ce domaine.

PERSPECTIVES

Nous avons développé le premier modèle d'organoïdes cérébraux CTD à partir de cellules de patients. Nous proposons d'apporter des améliorations au protocole de différenciation pour augmenter la reproductibilité et faciliter l'obtention d'un nombre important d'organoïdes cérébraux. Ces modifications pourraient également améliorer la maturité de certains types cellulaires dans le modèle. Ainsi, nous pourrions apporter les types cellulaires manquants tels que des cellules microgliales et des cellules endothéliales, et mieux contrôler le ratio cellules gliales/neurones. En effet, les cellules gliales sont connues pour tenir des rôles essentiels dans les fonctions cérébrales, et les dysfonctions gliales contribuent à la physiopathologie de troubles neurodéveloppementaux (Bhattacharya *et al*, 2022). De plus, Baroncelli *et al* ont montré une activation microgliale dans le cerveau de souris KO CRT (Baroncelli *et al*, 2016), un phénomène qui ne peut être reproduit dans notre modèle d'organoïde par manque de ce type cellulaire. L'utilisation de la microfluidique pourrait également permettre de mieux contrôler l'environnement dans lequel sont cultivés les organoïdes, améliorer la distribution des nutriments et favoriser la survie cellulaire (Cho *et al*, 2021). De plus, il existe des protocoles de différenciation guidée qui permettent de générer des organoïdes spécifiques d'une région cérébrale telle que le cervelet (Muguruma *et al*, 2015), le mésencéphale (Jo *et al*, 2016) et le tronc cérébral (Eura *et al*, 2020). Ces protocoles permettent de mieux contrôler la différenciation et de diminuer la variabilité du modèle. En outre, cela permet également de fusionner ces différents organoïdes pour former des assembloïdes et modéliser les interactions entre les différentes régions cérébrales (Chen *et al*, 2020). Ces assembloïdes sont ainsi utilisés pour modéliser la migration des interneurones, les projections neuronales, l'invasion tumorale, l'oligodendrogenèse et l'établissement de l'axe du cerveau antérieur.

Dans cette étude, les organoïdes cérébraux ont été développés à partir de cellules de patients CTD présentant des différentes mutations du gène *Slc6a8*. En revanche, ces mutations sont toutes des délétions d'un acide aminé. Nous poursuivrons le

développement du modèle en augmentant la diversité de ces mutations. Par exemple, nous pourrions utiliser des cellules de patients présentant des mutations non-sens ou faux-sens, notamment des mutations qui maintiennent une activité résiduelle du CRT. De plus, nous proposons d'inclure des cellules de patientes hétérozygotes.

Ainsi, constituer une banque d'organoïdes cérébraux de différents patients nous permettrait d'étudier davantage le lien entre la mutation du patient et les dérégulations des mécanismes moléculaires. Lors de tests de candidats médicaments, cette banque pourrait également permettre de prédire l'efficacité d'une molécule thérapeutique chez un patient.

Dans le contexte de l'étude de la physiopathologie du CTD, nous nous sommes focalisés sur les voies les plus dérégulées et en particulier celle de GSK3β. Nous proposons cette fois-ci de regarder les voies moins représentées, qui peuvent être spécifiques de la physiopathologie du CTD. Il serait également judicieux de détailler davantage les modifications épigénétiques dans les organoïdes CTD. Nous pourrions nous focaliser sur la méthylation des histones et des ARNm mais aussi sur l'acétylation des histones.

La restauration des réserves cérébrales en créatine est la principale stratégie thérapeutique dans le cadre du CTD. En effet, les efforts se focalisent sur la restauration d'un CRT fonctionnel (thérapie génique ou refolding) pour permettre l'incorporation de créatine, ou sur le développement de prodrogues de créatine capables d'être internalisées dans les cellules (passage lipophile ou via un autre transporteur) (Fernandes-Pires & Braissant, 2022). Parmi ces candidats médicaments, l'ester dodécylique de créatine (DCE) a montré sa capacité à augmenter les réserves cérébrales de créatine et à améliorer les fonctions cognitives dans des modèles animaux (Mabondzo *et al*, 2023). Il est donc intéressant de tester le DCE dans un

contexte humain, récapitulant diverses mutations de patients, tel que dans les organoïdes cérébraux.

De plus, les dérégulations moléculaires mises en évidence dans ce projet ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques qui pourraient être utilisées en complément du DCE pour maximiser l'efficacité du traitement (Figure 48). En effet, la kinase GSK3 étant impliquée dans de nombreuses neuropathologies, plusieurs inhibiteurs sont en cours d'évaluation et pourrait constituer des candidats médicaments pour le CTD (Rippin & Eldar-Finkelman, 2021). Dans le cadre de la méthylation de l'ADN, les patients CTD pourraient bénéficier d'une supplémentation alimentaire avec des donneurs connus de groupement méthyl tels que la bétaïne ou la méthionine, des précurseurs de SAM dans le cycle du carbone unique, qui équilibreraient la méthylation de l'ADN. Les régulations du déficit mitochondrial et du transport du glucose constituent également des cibles thérapeutiques potentielles.

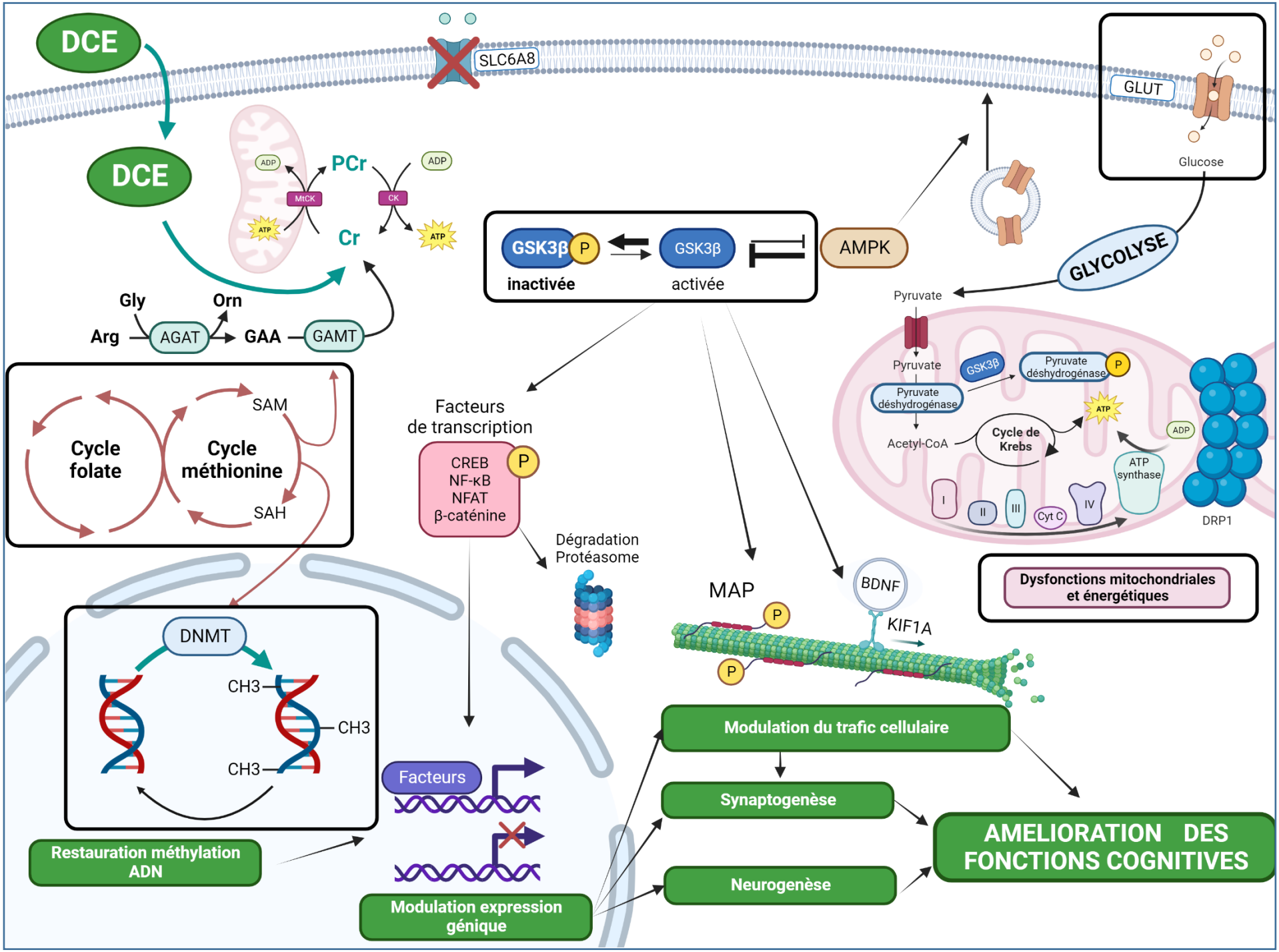


Figure 48 : Représentation des bénéfices du traitement au DCE sur la physiopathologie du CTD et identifications de nouvelles cibles thérapeutiques

Légende Figure 48 :

L'ester dodécylique de créatine (DCE, en vert) peut traverser passivement les membranes plasmiques et être clivé par des estérases plasmatiques pour donner de la créatine. Dans les cellules cérébrales des souris KO CRT, le traitement au DCE permet d'augmenter les réserves de créatine et de moduler l'expression de gènes impliqués dans l'altération des fonctions cognitives. Il permet ainsi de moduler des protéines en lien avec la dynamique et le trafic des microtubules, ce qui pourrait impacter la synaptogenèse et expliquer les améliorations des performances cognitives des souris KO CRT. Le DCE semble également réguler le phénomène d'hypométhylation de l'ADN pour tendre vers une restauration des niveaux de 5-mC en conditions saines.

Dans les organoïdes cérébraux CTD, l'apport de créatine dans les cellules CTD-rescue permet également de moduler plusieurs mécanismes dérégulés dans les cellules CTD. Ainsi les cellules CTD-rescue ont une diminution de la suractivation de GSK3β, qui est davantage phosphorylée. Cela entraine une modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'altération des fonctions cognitives, ce qui favorise la neurogenèse.

De nouvelles cibles thérapeutiques (encadrées en noir) sont mises en évidence par les résultats de ce projet thèse : la kinase GSK3β ; le transport du glucose et les dysfonctions mitochondriales ; les processus de méthylation avec les cycles folate et méthionine qui régénèrent le donneur méthyl (SAM). Créé avec BioRender

RÉFÉRENCES

Abdulla ZI, Pahlevani B, Lundgren KH, Pennington JL, Udobi KC, Seroogy KB & Skelton MR (2020a) Deletion of the Creatine Transporter (Slc6a8) in Dopaminergic Neurons Leads to Hyperactivity in Mice. *J Mol Neurosci* 70: 102–111

Abdulla ZI, Pennington JL, Gutierrez A & Skelton MR (2020b) Creatine transporter knockout mice (Slc6a8) show increases in serotonin-related proteins and are resilient to learned helplessness. *Behav Brain Res* 377: 112254

Adriano E, Garbati P, Damonte G, Salis A, Armirotti A & Balestrino M (2011) Searching for a therapy of creatine transporter deficiency: some effects of creatine ethyl ester in brain slices in vitro. *Neuroscience* 199: 386–393

Adriano E, Garbati P, Salis A, Damonte G, Millo E & Balestrino M (2017) Creatine salts provide neuroprotection even after partial impairment of the creatine transporter. *Neuroscience* 340: 299–307

Adriano E, Gulino M, Arkel M, Salis A, Damonte G, Liessi N, Millo E, Garbati P & Balestrino M (2018) Di-acetyl creatine ethyl ester, a new creatine derivative for the possible treatment of creatine transporter deficiency. *Neurosci Lett* 665: 217–223

Adriano E, Salis A, Damonte G, Millo E & Balestrino M (2022) Effects of Delivering Guanidinoacetic Acid or Its Prodrug to the Neural Tissue: Possible Relevance for Creatine Transporter Deficiency. *Brain Sci* 12: 85

Ahn Y, An J-H, Yang H-J, Lee DG, Kim J, Koh H, Park Y-H, Song B-S, Sim B-W, Lee HJ, *et al* (2021) Human Blood Vessel Organoids Penetrate Human Cerebral Organoids and Form a Vessel-Like System. *Cells* 10: 2036

Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89: 121–145

Alcaide P, Merinero B, Ruiz-Sala P, Richard E, Navarrete R, Arias A, Ribes A, Artuch R, Campistol J, Ugarte M, *et al* (2011) Defining the pathogenicity of creatine deficiency syndrome. *Hum Mutat* 32: 282–291

Alfieri RR, Bonelli MA, Cavazzoni A, Brigotti M, Fumarola C, Sestili P, Mozzoni P, De Palma G, Mutti A, Carnicelli D, *et al* (2006) Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress. *J Physiol* 576: 391–401

Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C & Schoffelmeer ANM (2006) Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* 60: 118–123

Andersen J, Revah O, Miura Y, Thom N, Amin ND, Kelley KW, Singh M, Chen X, Thete MV, Walczak EM, *et al* (2020) Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids. *Cell* 183: 1913-1929.e26

Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T & Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76: 329–343

Archer SL (2013) Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 369: 2236–2251

Ardon O, Procter M, Mao R, Longo N, Landau YE, Shilon-Hadass A, Gabis LV, Hoffmann C, Tzadok M, Heimer G, *et al* (2016) Creatine transporter deficiency: Novel mutations and functional studies. *Mol Genet Metab Rep* 8: 20–23

Badr-Eldin SM, Aldawsari HM, Kotta S, Deb PK & Venugopala KN (2022) Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects. *Pharmaceuticals (Basel)* 15: 926

Baroncelli L, Alessandrì MG, Tola J, Putignano E, Migliore M, Amendola E, Gross C, Leuzzi V, Cioni G & Pizzorusso T (2014) A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Res* 3: 228

Baroncelli L, Molinaro A, Cacciante F, Alessandrì MG, Napoli D, Putignano E, Tola J, Leuzzi V, Cioni G & Pizzorusso T (2016) A mouse model for creatine transporter deficiency reveals early onset cognitive impairment and neuropathology associated with brain aging. *Hum Mol Genet* 25: 4186–4200

Bayou N, M'rad R, Belhaj A, Daoud H, Zemni R, Briault S, Helayem MB, Ben Jemaa L & Chaabouni H (2008) The creatine transporter gene paralogous at 16p11.2 is expressed in human brain. *Comp Funct Genomics* 2008: 609684

Béard E & Braissant O (2010) Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* 115: 297–313

Berger T, Lee H, Young AH, Aarsland D & Thuret S (2020) Adult Hippocampal Neurogenesis in Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med* 26: 803–818

Betsalel OT, Pop A, Rosenberg EH, Fernandez-Ojeda M, Creatine Transporter Research, Group, Jakobs C & Salomons GS (2012) Detection of variants in SLC6A8 and functional analysis of unclassified missense variants. *Mol Genet Metab* 105: 596–601

Bhattacharya A, Choi WWY, Muffat J & Li Y (2022) Modeling Developmental Brain Diseases Using Human Pluripotent Stem Cells-Derived Brain Organoids - Progress and Perspective. *J Mol Biol* 434: 167386

Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Alessandri' MG, Cipriani P, De Vito G & Canapicchi R (2000) Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann Neurol* 47: 511–513

Bodnar B, Zhang Y, Liu J, Lin Y, Wang P, Wei Z, Saribas S, Zhu Y, Li F, Wang X, *et al* (2021) Novel Scalable and Simplified System to Generate Microglia-Containing Cerebral Organoids From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Neurosci* 15: 682272

Bothwell JH, Styles P & Bhakoo KK (2002) Swelling-activated taurine and creatine effluxes from rat cortical astrocytes are pharmacologically distinct. *J Membr Biol* 185: 157–164

Bourdenx M, Dutheil N, Bezard E & Dehay B (2014) Systemic gene delivery to the central nervous system using Adeno-associated virus. *Front Mol Neurosci* 7: 50

Braissant O (2012) Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Inherit Metab Dis* 35: 655–664

Braissant O, Cagnon L, Monnet-Tschudi F, Speer O, Wallimann T, Honegger P & Henry H (2008) Ammonium alters creatine transport and synthesis in a 3D culture of developing brain cells, resulting in secondary cerebral creatine deficiency. *Eur J Neurosci* 27: 1673–1685

Braissant O & Henry H (2008) AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. *J Inherit Metab Dis* 31: 230–239

Braissant O, Henry H, Béard E & Uldry J (2011) Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* 40: 1315–1324

Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B & Bachmann C (2001) Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 86: 193–201

Braissant O, Henry H, Villard A-M, Zurich M-G, Loup M, Eilers B, Parlascino G, Matter E, Boulat O, Honegger P, *et al* (2002) Ammonium-induced impairment of axonal growth is prevented through glial creatine. *J Neurosci* 22: 9810–9820

Brewer GJ & Wallimann TW (2000) Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 74: 1968–1978

Brosnan JT & Brosnan ME (2010) Creatine metabolism and the urea cycle. *Mol Genet Metab* 100 Suppl 1: S49-52

Brosnan JT, da Silva RP & Brosnan ME (2011) The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* 40: 1325–1331

Brunetti D, Dykstra W, Le S, Zink A & Prigione A (2021) Mitochondria in neurogenesis: Implications for mitochondrial diseases. *Stem Cells* 39: 1289–1297

Bruun TUJ, Sidky S, Bandeira AO, Debray F-G, Ficicioglu C, Goldstein J, Joost K, Koeberl DD, Luísa D, Nassogne M-C, *et al* (2018) Treatment outcome of creatine transporter deficiency: international retrospective cohort study. *Metab Brain Dis* 33: 875–884

Burov S, Leko M, Dorosh M, Dobrodumov A & Veselkina O (2011) Creatinyl amino acids: new hybrid compounds with neuroprotective activity. *J Pept Sci* 17: 620–626

Cacciante F, Gennaro M, Sagona G, Mazziotti R, Lupori L, Cerri E, Putignano E, Butt M, Do M-HT, McKew JC, *et al* (2020) Cyclocreatine treatment ameliorates the cognitive, autistic and epileptic phenotype in a mouse model of Creatine Transporter Deficiency. *Sci Rep* 10: 18361

Cameron JM, Levandovskiy V, Roberts W, Anagnostou E, Scherer S, Loh A & Schulze A (2017) Variability of Creatine Metabolism Genes in Children with Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci* 18: 1665

Camp JG, Badsha F, Florio M, Kanton S, Gerber T, Wilsch-Bräuninger M, Lewitus E, Sykes A, Hevers W, Lancaster M, *et al* (2015) Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 15672–15677

Carter M, Essner R, Goldstein N & Iyer M (2022) Cell Culture Techniques. In *Guide to Research Techniques in Neuroscience* pp 291–308. Elsevier

Cecil KM, Salomons GS, Ball WS, Wong B, Chuck G, Verhoeven NM, Jakobs C & DeGrauw TJ (2001) Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect? *Ann Neurol* 49: 401–404

Cheillan D, Cognat S, Vandenberghe N, Des Portes V & Vianey-Saban C (2005) [Creatine deficiency syndromes]. *Rev Neurol (Paris)* 161: 284–289

Cheillan D, Joncquel-Chevalier Curt M, Briand G, Salomons GS, Mention-Mulliez K, Dobbelaere D, Cuisset J-M, Lion-François L, Portes VD, Chabli A, *et al* (2012) Screening for primary creatine deficiencies in French patients with unexplained neurological symptoms. *Orphanet J Rare Dis* 7: 96

Chen A, Guo Z, Fang L & Bian S (2020) Application of Fused Organoid Models to Study Human Brain Development and Neural Disorders. *Front Cell Neurosci* 14: 133

Chen H-R, Zhang-Brotzge X, Morozov YM, Li Y, Wang S, Zhang HH, Kuan IS, Fugate EM, Mao H, Sun Y-Y, *et al* (2021) Creatine transporter deficiency impairs stress adaptation and brain energetics homeostasis. *JCI Insight* 6: e140173

Chen N-H, Reith MEA & Quick MW (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* 447: 519–531

Cho A-N, Jin Y, An Y, Kim J, Choi YS, Lee JS, Kim J, Choi W-Y, Koo D-J, Yu W, *et al* (2021) Microfluidic device with brain extracellular matrix promotes structural and functional maturation of human brain organoids. *Nat Commun* 12: 4730

Cholewa-Waclaw J, Bird A, von Schimmelmann M, Schaefer A, Yu H, Song H, Madabhushi R & Tsai L-H (2016) The Role of Epigenetic Mechanisms in the Regulation of Gene Expression in the Nervous System. *J Neurosci* 36: 11427–11434

Christie DL (2007) Functional insights into the creatine transporter. *Subcell Biochem* 46: 99–118

Chung CY, Koprich JB, Siddiqi H & Isacson O (2009) Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J Neurosci* 29: 3365–3373

Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang C-T & Terskikh AV (2013) SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E3017-3026

Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE & Salomons GS (2006) X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* 119: 604–610

Clevers H (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165: 1586–1597

Corrò C, Novellasdemunt L & Li VSW (2020) A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol* 319: C151–C165

Daneman R & Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020412

Dennert N, Engels H, Cremer K, Becker J, Wohlleber E, Albrecht B, Ehret JK, Lüdecke H-J, Suri M, Carignani G, *et al* (2017) De novo microdeletions and point mutations affecting SOX2 in three individuals with intellectual disability but without major eye malformations. *Am J Med Genet A* 173: 435–443

DesRoches C-L, Patel J, Wang P, Minassian B, Salomons GS, Marshall CR & Mercimek-Mahmutoglu S (2015) Estimated carrier frequency of creatine transporter deficiency in females in the general population using functional characterization of novel missense variants in the SLC6A8 gene. *Gene* 565: 187–191

Dodd JR & Christie DL (2007) Selective amino acid substitutions convert the creatine transporter to a gamma-aminobutyric acid transporter. *J Biol Chem* 282: 15528–15533

Dohare P, Kidwai A, Kaur J, Singla P, Krishna S, Klebe D, Zhang X, Hevner R & Ballabh P (2019) GSK3β Inhibition Restores Impaired Neurogenesis in Preterm Neonates With Intraventricular Hemorrhage. *Cereb Cortex* 29: 3482–3495

Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U & Wallimann T (2003) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278: 17760–17766

Dunbar M, Jaggumantri S, Sargent M, Stockler-Ipsiroglu S & van Karnebeek CDM (2014) Treatment of X-linked creatine transporter (SLC6A8) deficiency: systematic review of the literature and three new cases. *Mol Genet Metab* 112: 259–274

Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar A-M, Fyfe J, Moullier P, Colle M-A & Barkats M (2009) Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 17: 1187–1196

Duran-Trio L, Fernandes-Pires G, Grosse J, Soro-Arnaiz I, Roux-Petronelli C, Binz P-A, De Bock K, Cudalbu C, Sandi C & Braissant O (2022) Creatine transporter-deficient rat model shows motor dysfunction, cerebellar alterations, and muscle creatine deficiency without muscle atrophy. *J Inherit Metab Dis* 45: 278–291

Duran-Trio L, Fernandes-Pires G, Simicic D, Grosse J, Roux-Petronelli C, Bruce SJ, Binz P-A, Sandi C, Cudalbu C & Braissant O (2021) A new rat model of creatine transporter deficiency reveals behavioral disorder and altered brain metabolism. *Sci Rep* 11: 1636

Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K & Sasai Y (2008) Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3: 519–532

El-Kasaby A, Kasture A, Koban F, Hotka M, Asjad HMM, Kubista H, Freissmuth M & Sucic S (2019) Rescue by 4-phenylbutyrate of several misfolded creatine transporter-1 variants linked to the creatine transporter deficiency syndrome. *Neuropharmacology* 161: 107572

Eura N, Matsui TK, Luginbühl J, Matsubayashi M, Nanaura H, Shiota T, Kinugawa K, Iguchi N, Kiriyama T, Zheng C, *et al* (2020) Brainstem Organoids From Human Pluripotent Stem Cells. *Front Neurosci* 14: 538

Fagerlund I, Dougalis A, Shakirzyanova A, Gómez-Budia M, Pelkonen A, Konttinen H, Ohtonen S, Fazaludeen MF, Koskuvi M, Kuusisto J, *et al* (2021) Microglia-like Cells Promote Neuronal Functions in Cerebral Organoids. *Cells* 11: 124

Fang Y & Eglen RM (2017) Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* 22: 456–472

Farr CV, El-Kasaby A, Freissmuth M & Sucic S (2020) The Creatine Transporter Unfolded: A Knotty Premise in the Cerebral Creatine Deficiency Syndrome. *Front Synaptic Neurosci* 12: 588954

Fatehullah A, Tan SH & Barker N (2016) Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol* 18: 246–254

Faulds KJ, Egelston JN, Sedivy LJ, Mitchell MK, Garimella S, Kozlowski H, D'Alessandro A, Hansen KC, Balsbaugh JL & Phiel CJ (2018) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity regulates mRNA methylation in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 293: 10731–10743

Fernandes-Pires G & Braissant O (2022) Current and potential new treatment strategies for creatine deficiency syndromes. *Mol Genet Metab* 135: 15–26

Fezai M, Elvira B, Borras J, Ben-Attia M, Hoseinzadeh Z & Lang F (2014) Negative regulation of the creatine transporter SLC6A8 by SPAK and OSR1. *Kidney Blood Press Res* 39: 546–554

Fezai M, Jemaà M, Fakhri H, Chen H, Elsir B, Pelzl L & Lang F (2016) Down-Regulation of the Na+,Cl-Coupled Creatine Transporter CreaT (SLC6A8) by Glycogen Synthase Kinase GSK3ß. *Cell Physiol Biochem* 40: 1231–1238

Fezai M, Warsi J & Lang F (2015) Regulation of the Na+,Cl- Coupled Creatine Transporter CreaT (SLC6A8) by the Janus Kinase JAK3. *Neurosignals* 23: 11–19

Fons C, Arias A, Sempere A, Póo P, Pineda M, Mas A, López-Sala A, Garcia-Villoria J, Vilaseca MA, Ozaez L, *et al* (2010) Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency. *Mol Genet Metab* 99: 296–299

Forbes SC, Cordingley DM, Cornish SM, Gualano B, Roschel H, Ostojic SM, Rawson ES, Roy BD, Prokopidis K, Giannos P, *et al* (2022) Effects of Creatine Supplementation on Brain Function and Health. *Nutrients* 14: 921

Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM & Kaspar BK (2009) Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 27: 59–65

Franklin AV, King MK, Palomo V, Martinez A, McMahon LL & Jope RS (2014) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors reverse deficits in long-term potentiation and cognition in fragile X mice. *Biol Psychiatry* 75: 198–206

Freissmuth M, Stockner T & Sucic S (2018) SLC6 Transporter Folding Diseases and Pharmacochaperoning. *Handb Exp Pharmacol* 245: 249–270

Garbati P, Adriano E, Salis A, Ravera S, Damonte G, Millo E & Balestrino M (2014) Effects of amide creatine derivatives in brain hippocampal slices, and their possible usefulness for curing creatine transporter deficiency. *Neurochem Res* 39: 37–45

Garcia S, Saldana-Caboverde A, Anwar M, Raval AP, Nissanka N, Pinto M, Moraes CT & Diaz F (2022) Enhanced glycolysis and GSK3 inactivation promote brain metabolic adaptations following neuronal mitochondrial stress. *Hum Mol Genet* 31: 692–704

Ghirardini E, Calugi F, Sagona G, Di Vetta F, Palma M, Battini R, Cioni G, Pizzorusso T & Baroncelli L (2021) The Role of Preclinical Models in Creatine Transporter Deficiency: Neurobiological Mechanisms, Biomarkers and Therapeutic Development. *Genes (Basel)* 12: 1123

Ghirardini E, Sagona G, Marquez-Galera A, Calugi F, Navarron CM, Cacciante F, Chen S, Di Vetta F, Dadà L, Mazziotti R, *et al* (2023) Cell-specific vulnerability to metabolic failure: the crucial role of parvalbumin expressing neurons in creatine transporter deficiency. *Acta Neuropathol Commun* 11: 34

Giandomenico SL, Mierau SB, Gibbons GM, Wenger LMD, Masullo L, Sit T, Sutcliffe M, Boulanger J, Tripodi M, Derivery E, *et al* (2019) Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nat Neurosci* 22: 669–679

Gimenez-Cassina A, Lim F, Cerrato T, Palomo GM & Diaz-Nido J (2009) Mitochondrial hexokinase II promotes neuronal survival and acts downstream of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 284: 3001–3011

Giusti L, Molinaro A, Alessandrì MG, Boldrini C, Ciregia F, Lacerenza S, Ronci M, Urbani A, Cioni G, Mazzoni MR, *et al* (2019) Brain mitochondrial proteome alteration driven by creatine deficiency suggests novel therapeutic venues for creatine deficiency syndromes. *Neuroscience* 409: 276–289

Goold RG & Gordon-Weeks PR (2004) Glycogen synthase kinase 3beta and the regulation of axon growth. *Biochem Soc Trans* 32: 809–811

Gorshkov K, Wang AQ, Sun W, Fisher E, Frigeni M, Singleton M, Thorne N, Class B, Huang W, Longo N, *et al* (2019) Phosphocyclocreatine is the dominant form of cyclocreatine in control and creatine transporter deficiency patient fibroblasts. *Pharmacol Res Perspect* 7: e00525

Gosselet F (2017) [Modelling of the blood-brain barrier]. *Med Sci (Paris)* 33: 423–431

Gribkoff VK & Kaczmarek LK (2017) The need for new approaches in CNS drug discovery: Why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes. *Neuropharmacology* 120: 11–19

Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR & Lancha Junior AH (2010) Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids* 38: 31–44

Guedj E, Varrone A, Boellaard R, Albert NL, Barthel H, van Berckel B, Brendel M, Cecchin D, Ekmekcioglu O, Garibotto V, *et al* (2022) EANM procedure guidelines for brain PET imaging using [18F]FDG, version 3. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 49: 632–651

Guerreiro S & Maciel P (2023) Transition from Animal-Based to Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Based Models of Neurodevelopmental Disorders: Opportunities and Challenges. *Cells* 12: 538

Guyot A-C, Leuxe C, Disdier C, Oumata N, Costa N, Roux GL, Varela PF, Duchon A, Charbonnier JB, Herault Y, *et al* (2020) A Small Compound Targeting Prohibitin with Potential Interest for Cognitive Deficit Rescue in Aging mice and Tau Pathology Treatment. *Sci Rep* 10: 1143

Guzun R, Gonzalez-Granillo M, Karu-Varikmaa M, Grichine A, Usson Y, Kaambre T, Guerrero-Roesch K, Kuznetsov A, Schlattner U & Saks V (2012) Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome. *Biochim Biophys Acta* 1818: 1545–1554

Hall CHT, Lee JS, Murphy EM, Gerich ME, Dran R, Glover LE, Abdulla ZI, Skelton MR & Colgan SP (2020) Creatine Transporter, Reduced in Colon Tissues From Patients With Inflammatory Bowel Diseases, Regulates Energy Balance in Intestinal Epithelial Cells, Epithelial Integrity, and Barrier Function. *Gastroenterology* 159: 984-998.e1

Hanna-El-Daher L, Béard E, Henry H, Tenenbaum L & Braissant O (2015) Mild guanidinoacetate increase under partial guanidinoacetate methyltransferase deficiency strongly affects brain cell development. *Neurobiol Dis* 79: 14–27

Hautman ER, Kokenge AN, Udobi KC, Williams MT, Vorhees CV & Skelton MR (2014) Female mice heterozygous for creatine transporter deficiency show moderate cognitive deficits. *J Inherit Metab Dis* 37: 63–68

Hebert-Chatelain E (2013) Src kinases are important regulators of mitochondrial functions. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 90–98

Hernandez F, Lucas JJ & Avila J (2013) GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1: S141-144

Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T & Imahori K (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2719–2723

Hur E-M & Zhou F-Q (2010) GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11: 539–551

Hwang J & Qi L (2018) Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci* 43: 593–605

Iki J, Inoue A, Bito H & Okabe S (2005) Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. *Eur J Neurosci* 22: 2985–2994

Ipser JC, Syal S, Bentley J, Adnams CM, Steyn B & Stein DJ (2012) 1H-MRS in autism spectrum disorders: a systematic meta-analysis. *Metab Brain Dis* 27: 275–287

Item CB, Stöckler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Mühl A, Alessandrì MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F & Cioni G (2001) Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* 69: 1127–1133

Jaggumantri S, Dunbar M, Edgar V, Mignone C, Newlove T, Elango R, Collet JP, Sargent M, Stockler-Ipsiroglu S & van Karnebeek CDM (2015) Treatment of Creatine Transporter (SLC6A8) Deficiency With Oral S-Adenosyl Methionine as Adjunct to L-arginine, Glycine, and Creatine Supplements. *Pediatr Neurol* 53: 360-363.e2

Jeong E, Choi S & Cho S-W (2023) Recent Advances in Brain Organoid Technology for Human Brain Research. *ACS Appl Mater Interfaces* 15: 200–219

Ji L, Zhao X, Zhang B, Kang L, Song W, Zhao B, Xie W, Chen L & Hu X (2019) Slc6a8-Mediated Creatine Uptake and Accumulation Reprogram Macrophage Polarization via Regulating Cytokine Responses. *Immunity* 51: 272-284.e7

Jo J, Xiao Y, Sun AX, Cukuroglu E, Tran H-D, Göke J, Tan ZY, Saw TY, Tan C-P, Lokman H, *et al* (2016) Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell* 19: 248–257

Jobe EM & Zhao X (2017) DNA Methylation and Adult Neurogenesis. *Brain Plast* 3: 5–26

Jorgensen C & Wang Z (2020) Hormonal Regulation of Mammalian Adult Neurogenesis: A Multifaceted Mechanism. *Biomolecules* 10: 1151

Jurado-Arjona J, Llorens-Martín M, Ávila J & Hernández F (2016) GSK3β Overexpression in Dentate Gyrus Neural Precursor Cells Expands the Progenitor Pool and Enhances Memory Skills. *J Biol Chem* 291: 8199–8213

Kale VP, Wallery J, Novak J, Gibbs S, Bourdi M, Do M-HT, McKew JC & Terse PS (2020) Evaluation of chronic toxicity of cyclocreatine, a creatine analog, in Sprague Dawley rat after oral gavage administration for up to 26 weeks. *Regul Toxicol Pharmacol* 117: 104750

Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prüllage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israël A, *et al* (2006) NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* 26: 2936–2946

van de Kamp JM, Betsalel OT, Mercimek-Mahmutoglu S, Abulhoul L, Grünewald S, Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B, *et al* (2013) Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J Med Genet* 50: 463–472

van de Kamp JM, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren SJM, Mancini GM, Steinberg SJ, *et al* (2015) Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin Genet* 87: 141–147

van de Kamp JM, Mancini GM & Salomons GS (2014) X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J Inherit Metab Dis* 37: 715–733

van de Kamp JM, Mancini GMS, Pouwels PJW, Betsalel OT, van Dooren SJM, de Koning I, Steenweg ME, Jakobs C, van der Knaap MS & Salomons GS (2011) Clinical features and X-inactivation in females heterozygous for creatine transporter defect. *Clin Genet* 79: 264–272

Khoja S, Lambert J, Nitzahn M, Eliav A, Zhang Y, Tamboline M, Le CT, Nasser E, Li Y, Patel P, *et al* (2022) Gene therapy for guanidinoacetate methyltransferase deficiency restores cerebral and myocardial creatine while resolving behavioral abnormalities. *Mol Ther Methods Clin Dev* 25: 278–296

Kim J, Koo B-K & Knoblich JA (2020) Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 571–584

Kim MS, Kim D-H, Kang HK, Kook MG, Choi SW & Kang K-S (2021) Modeling of Hypoxic Brain Injury through 3D Human Neural Organoids. *Cells* 10: 234

Kim W-Y, Wang X, Wu Y, Doble BW, Patel S, Woodgett JR & Snider WD (2009) GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci* 12: 1390–1397

Klein AM & Ferrante RJ (2007) The neuroprotective role of creatine. *Subcell Biochem* 46: 205–243

Koepsell H (2020) Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch* 472: 1299–1343

Kondo M, Takei Y & Hirokawa N (2012) Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron* 73: 743–757

Kook MG, Lee S-E, Shin N, Kong D, Kim D-H, Kim M-S, Kang HK, Choi SW & Kang K-S (2022) Generation of Cortical Brain Organoid with Vascularization by Assembling with Vascular Spheroid. *Int J Stem Cells* 15: 85–94

Kurosawa Y, Degrauw TJ, Lindquist DM, Blanco VM, Pyne-Geithman GJ, Daikoku T, Chambers JB, Benoit SC & Clark JF (2012) Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J Clin Invest* 122: 2837–2846

Lancaster MA & Knoblich JA (2014a) Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345: 1247125

Lancaster MA & Knoblich JA (2014b) Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9: 2329–2340

Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP & Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501: 373–379

Lee J & Kim M-S (2007) The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1: S49-57

Lee J-R, Srour M, Kim D, Hamdan FF, Lim S-H, Brunel-Guitton C, Décarie J-C, Rossignol E, Mitchell GA, Schreiber A, *et al* (2015) De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. *Hum Mutat* 36: 69–78

Lian H, Shim DJ, Gaddam SSK, Rodriguez-Rivera J, Bitner BR, Pautler RG, Robertson CS & Zheng H (2012) IκBα deficiency in brain leads to elevated basal neuroinflammation and attenuated response following traumatic brain injury: implications for functional recovery. *Mol Neurodegener* 7: 47

Longo N, Ardon O, Vanzo R, Schwartz E & Pasquali M (2011) Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157C: 72–78

Lowe MTJ, Faull RLM, Christie DL & Waldvogel HJ (2015) Distribution of the creatine transporter throughout the human brain reveals a spectrum of creatine transporter immunoreactivity. *J Comp Neurol* 523: 699–725

Lu B, Nagappan G & Lu Y (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol* 220: 223–250

Lunardi G, Parodi A, Perasso L, Pohvozcheva AV, Scarrone S, Adriano E, Florio T, Gandolfo C, Cupello A, Burov SV, *et al* (2006) The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience* 142: 991–997

Mabondzo A, Harati R, Broca-Brisson L, Guyot A-C, Costa N, Cacciante F, Putignano E, Baroncelli L, Skelton MR, Saab C, *et al* (2023) Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency. *Front Mol Neurosci* 16: 1118707

Madhavan M, Nevin ZS, Shick HE, Garrison E, Clarkson-Paredes C, Karl M, Clayton BLL, Factor DC, Allan KC, Barbar L, *et al* (2018) Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. *Nat Methods* 15: 700–706

Mahla RS (2016) Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *Int J Cell Biol* 2016: 6940283

Mak CSW, Waldvogel HJ, Dodd JR, Gilbert RT, Lowe MTJ, Birch NP, Faull RLM & Christie DL (2009) Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. *Neuroscience* 163: 571–585

Manning EE, Ransome MI, Burrows EL & Hannan AJ (2012) Increased adult hippocampal neurogenesis and abnormal migration of adult-born granule neurons is associated with hippocampal-specific cognitive deficits in phospholipase C-β1 knockout mice. *Hippocampus* 22: 309–319

Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, Johnston S, Parylak SL, Jin X & Gage FH (2018) An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol* 36: 432–441

Manuel MN, Mi D, Mason JO & Price DJ (2015) Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci* 9: 70

Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, Amenduni M, Szekely A, Palejev D, Wilson M, *et al* (2015) FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* 162: 375–390

Martin SA, Souder DC, Miller KN, Clark JP, Sagar AK, Eliceiri KW, Puglielli L, Beasley TM & Anderson RM (2018) GSK3β Regulates Brain Energy Metabolism. *Cell Rep* 23: 1922-1931.e4

Martínez-Muñoz C, Rosenberg EH, Jakobs C & Salomons GS (2008) Identification, characterization and cloning of SLC6A8C, a novel splice variant of the creatine transporter gene. *Gene* 418: 53–59

Marton RM, Miura Y, Sloan SA, Li Q, Revah O, Levy RJ, Huguenard JR & Pașca SP (2019) Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nat Neurosci* 22: 484–491

Matsui TK, Tsuru Y, Hasegawa K & Kuwako K-I (2021) Vascularization of human brain organoids. *Stem Cells* 39: 1017–1024

Mazziotti R, Cacciante F, Sagona G, Lupori L, Gennaro M, Putignano E, Alessandrì MG, Ferrari A, Battini R, Cioni G, *et al* (2020) Novel translational phenotypes and biomarkers for creatine transporter deficiency. *Brain Commun* 2: fcaa089

McClory H, Williams D, Sapp E, Gatune LW, Wang P, DiFiglia M & Li X (2014) Glucose transporter 3 is a rab11-dependent trafficking cargo and its transport to the cell surface is reduced in neurons of CAG140 Huntington's disease mice. *Acta Neuropathol Commun* 2: 179

McEwen BS & Reagan LP (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490: 13–24

McGuire DM, Gross MD, Van Pilsum JF & Towle HC (1984) Repression of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase synthesis by creatine at a pretranslational level. *J Biol Chem* 259: 12034–12038

Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS & Baltimore D (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6: 1072–1078

Mercurio S, Alberti C, Serra L, Meneghini S, Berico P, Bertolini J, Becchetti A & Nicolis SK (2021) An early Sox2-dependent gene expression programme required for hippocampal dentate gyrus development. *Open Biol* 11: 200339

Meredith GD, D'Ippolito A, Dudas M, Zeidner LC, Hostetter L, Faulds K, Arnold TH, Popkie AP, Doble BW, Marnellos G, *et al* (2015) Glycogen synthase kinase-3 (Gsk-3) plays a fundamental role in maintaining DNA methylation at imprinted loci in mouse embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 26: 2139–2150

Molinaro A, Alessandrì MG, Putignano E, Leuzzi V, Cioni G, Baroncelli L & Pizzorusso T (2019) A Nervous System-Specific Model of Creatine Transporter Deficiency Recapitulates the Cognitive Endophenotype of the Disease: a Longitudinal Study. *Sci Rep* 9: 62

Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K & Sasai Y (2015) Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep* 10: 537–550

Muraleedharan R & Dasgupta B (2022) AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. *FEBS J* 289: 2247–2262

Namgoong JH & Bertoni C (2016) Clinical potential of ataluren in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 6: 37–48

Nasrallah F, Feki M & Kaabachi N (2010) Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol* 42: 163–171

Nassor F, Jarray R, Biard DSF, Maïza A, Papy-Garcia D, Pavoni S, Deslys J-P & Yates F (2020) Long Term Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci* 14: 14

Ndika JDT, Martinez-Munoz C, Anand N, van Dooren SJM, Kanhai W, Smith DEC, Jakobs C & Salomons GS (2014) Post-transcriptional regulation of the creatine transporter gene: functional relevance of alternative splicing. *Biochim Biophys Acta* 1840: 2070–2079

Nota B, Ndika JDT, van de Kamp JM, Kanhai WA, van Dooren SJM, van de Wiel MA, Pals G & Salomons GS (2014) RNA sequencing of creatine transporter (SLC6A8) deficient fibroblasts reveals impairment of the extracellular matrix. *Hum Mutat* 35: 1128–1135

Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H, Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K-I & Terasaki T (2002) The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 1327–1335

Ongür D, Prescot AP, Jensen JE, Cohen BM & Renshaw PF (2009) Creatine abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Res* 172: 44–48

Ozone C, Suga H, Eiraku M, Kadoshima T, Yonemura S, Takata N, Oiso Y, Tsuji T & Sasai Y (2016) Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. *Nat Commun* 7: 10351

Pankevich DE, Altevogt BM, Dunlop J, Gage FH & Hyman SE (2014) Improving and accelerating drug development for nervous system disorders. *Neuron* 84: 546–553

Pavoni S, Jarray R, Nassor F, Guyot A-C, Cottin S, Rontard J, Mikol J, Mabondzo A, Deslys J-P & Yates F (2018) Small-molecule induction of Aβ-42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. *PLoS One* 13: e0209150

Pellegrini L, Albecka A, Mallery DL, Kellner MJ, Paul D, Carter AP, James LC & Lancaster MA (2020) SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* 27: 951-961.e5

Perasso L, Adriano E, Ruggeri P, Burov SV, Gandolfo C & Balestrino M (2009) In vivo neuroprotection by a creatine-derived compound: phosphocreatine-Mg-complex acetate. *Brain Res* 1285: 158–163

Perasso L, Lunardi GL, Risso F, Pohvozcheva AV, Leko MV, Gandolfo C, Florio T, Cupello A, Burov SV & Balestrino M (2008) Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochem Res* 33: 765–775

Perna MK, Kokenge AN, Miles KN, Udobi KC, Clark JF, Pyne-Geithman GJ, Khuchua Z & Skelton MR (2016) Creatine transporter deficiency leads to increased whole body and cellular metabolism. *Amino Acids* 48: 2057–2065

Phillips BP, Gomez-Navarro N & Miller EA (2020) Protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 65: 96–102

Porciúncula LO, Goto-Silva L, Ledur PF & Rehen SK (2021) The Age of Brain Organoids: Tailoring Cell Identity and Functionality for Normal Brain Development and Disease Modeling. *Front Neurosci* 15: 674563

Pramod AB, Foster J, Carvelli L & Henry LK (2013) SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med* 34: 197–219

Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, Yao B, Hamersky GR, Jacob F, Zhong C, *et al* (2016) Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 165: 1238–1254

Qian X, Song H & Ming G-L (2019) Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development* 146: dev166074

Rae C, Digney AL, McEwan SR & Bates TC (2003) Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proc Biol Sci* 270: 2147–2150

Rae CD & Bröer S (2015) Creatine as a booster for human brain function. How might it work? *Neurochem Int* 89: 249–259

Ramirez S, Mukherjee A, Sepulveda S, Becerra-Calixto A, Bravo-Vasquez N, Gherardelli C, Chavez M & Soto C (2021) Modeling Traumatic Brain Injury in Human Cerebral Organoids. *Cells* 10: 2683

Ribeiro FF & Xapelli S (2021) An Overview of Adult Neurogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1331: 77–94

Rippin I & Eldar-Finkelman H (2021) Mechanisms and Therapeutic Implications of GSK-3 in Treating Neurodegeneration. *Cells* 10: 262

Rizk M, Saker Z, Harati H, Fares Y, Bahmad HF & Nabha S (2021) Deciphering the roles of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the treatment of autism spectrum disorder and related syndromes. *Mol Biol Rep* 48: 2669–2686

Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers H-H, Fryns J-P, deGrauw TJ, *et al* (2004) High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75: 97–105

Rosenberg EH, Muñoz CM, Degrauw TJ, Jakobs C nelis & Salomons GS (2006) Overexpression of wild-type creatine transporter (SLC6A8) restores creatine uptake in primary SLC6A8-deficient fibroblasts. *J Inherit Metab Dis* 29: 345–346

Rossi L, Nardecchia F, Pierigè F, Ventura R, Carducci C, Leuzzi V, Magnani M, Cabib S & Pascucci T (2021) Intellectual Disability and Brain Creatine Deficit: Phenotyping of the Genetic Mouse Model for GAMT Deficiency. *Genes (Basel)* 12: 1201

Rusciano I, Marvi MV, Owusu Obeng E, Mongiorgi S, Ramazzotti G, Follo MY, Zoli M, Morandi L, Asioli S, Fabbri VP, *et al* (2021) Location-dependent role of phospholipase C signaling in the brain: Physiology and pathology. *Adv Biol Regul* 79: 100771

Russell AP, Ghobrial L, Wright CR, Lamon S, Brown EL, Kon M, Skelton MR & Snow RJ (2014) Creatine transporter (SLC6A8) knockout mice display an increased capacity for in vitro creatine biosynthesis in skeletal muscle. *Front Physiol* 5: 314

Sabate-Soler S, Nickels SL, Saraiva C, Berger E, Dubonyte U, Barmpa K, Lan YJ, Kouno T, Jarazo J, Robertson G, *et al* (2022) Microglia integration into human midbrain organoids leads to increased neuronal maturation and functionality. *Glia* 70: 1267–1288

Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M, Takahashi J, Eiraku M & Sasai Y (2015) Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun* 6: 8896

Salazar MD, Zelt NB, Saldivar R, Kuntz CP, Chen S, Penn WD, Bonneau R, Koehler Leman J & Schlebach JP (2020) Classification of the Molecular Defects Associated with Pathogenic Variants of the SLC6A8 Creatine Transporter. *Biochemistry* 59: 1367–1377

Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ & Jakobs C (2001) X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 68: 1497–1500

Salomons GS, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, DeGrauw TJ & Jakobs C (2003) X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis* 26: 309–318

Schjelderup J, Hope S, Vatshelle C & van Karnebeek CDM (2021) Treatment experience in two adults with creatinfe transporter deficiency. *Mol Genet Metab Rep* 27: 100731

Schlattner U, Tokarska-Schlattner M & Wallimann T (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 164–180

Schulze A (2003) Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244: 143–150

Schulze A & Battini R (2007) Pre-Symptomatic Treatment of Creatine Biosynthesis Defects. In *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease*, Salomons GS & Wyss M (eds) pp 167–181. Dordrecht: Springer Netherlands

Serefidou M, Venkatasubramani AV & Imhof A (2019) The Impact of One Carbon Metabolism on Histone Methylation. *Front Genet* 10: 764

Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, *et al* (2010) Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1262–1272

Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S & Fimognari C (2011) Creatine as an antioxidant. *Amino Acids* 40: 1385–1396

Shaker MR, Pietrogrande G, Martin S, Lee J-H, Sun W & Wolvetang EJ (2021) Rapid and Efficient Generation of Myelinating Human Oligodendrocytes in Organoids. *Front Cell Neurosci* 15: 631548

Shojaiefard M, Christie DL & Lang F (2005) Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 742–746

Shojaiefard M, Christie DL & Lang F (2006) Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinase mTOR. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 945–949

Shojaiefard M, Hosseinzadeh Z, Bhavsar SK & Lang F (2012) Downregulation of the creatine transporter SLC6A8 by JAK2. *J Membr Biol* 245: 157–163

Sijens PE, Verbruggen KT, Oudkerk M, van Spronsen FJ & Soorani-Lunsing RJ (2005) 1H MR spectroscopy of the brain in Cr transporter defect. *Mol Genet Metab* 86: 421–422

da Silva B, Mathew RK, Polson ES, Williams J & Wurdak H (2018) Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion. *SLAS Discov* 23: 862–868

Simian M & Bissell MJ (2017) Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol* 216: 31–40

Skelton MR, Schaefer TL, Graham DL, deGrauw TJ, Clark JF, Williams MT & Vorhees CV (2011) Creatine Transporter (CrT; Slc6a8) Knockout Mice as a Model of Human CrT Deficiency. *PLoS ONE* 6: e16187

Snow RJ & Murphy RM (2001) Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol Cell Biochem* 224: 169–181

Sora I, Richman J, Santoro G, Wei H, Wang Y, Vanderah T, Horvath R, Nguyen M, Waite S & Roeske WR (1994) The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 419–427

Steinberg GR & Hardie DG (2023) New insights into activation and function of the AMPK. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24: 255–272

Stockebrand M, Sasani A, Das D, Hornig S, Hermans-Borgmeyer I, Lake HA, Isbrandt D, Lygate CA, Heerschap A, Neu A, *et al* (2018) A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism. *Front Physiol* 9: 773

Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hänicke W & Frahm J (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* 36: 409–413

Stockler S, Schutz PW & Salomons GS (2007) Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem* 46: 149–166

Stockler-Ipsiroglu S & van Karnebeek CDM (2014) Cerebral creatine deficiencies: a group of treatable intellectual developmental disorders. *Semin Neurol* 34: 350–356

Strutz-Seebohm N, Shojaiefard M, Christie D, Tavare J, Seebohm G & Lang F (2007) PIKfyve in the SGK1 mediated regulation of the creatine transporter SLC6A8. *Cell Physiol Biochem* 20: 729–734

Sun G, Chiuppesi F, Chen X, Wang C, Tian E, Nguyen J, Kha M, Trinh D, Zhang H, Marchetto MC, *et al* (2020) Modeling Human Cytomegalovirus-Induced Microcephaly in Human iPSC-Derived Brain Organoids. *Cell Rep Med* 1: 100002

Tachikawa M, Fujinawa J, Takahashi M, Kasai Y, Fukaya M, Sakai K, Yamazaki M, Tomi M, Watanabe M, Sakimura K, *et al* (2008) 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* 107: 768–778

Tachikawa M, Kasai Y, Yokoyama R, Fujinawa J, Ganapathy V, Terasaki T & Hosoya K (2009) The blood-brain barrier transport and cerebral distribution of guanidinoacetate in rats: involvement of creatine and taurine transporters. *J Neurochem* 111: 499–509

Tang X-Y, Xu L, Wang J, Hong Y, Wang Y, Zhu Q, Wang D, Zhang X-Y, Liu C-Y, Fang K-H, *et al* (2021) DSCAM/PAK1 pathway suppression reverses neurogenesis deficits in iPSC-derived cerebral organoids from patients with Down syndrome. *J Clin Invest* 131: e135763, 135763

Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil CG & Désaubry L (2013) Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chem Biol* 20: 316–331

Tokarska-Schlattner M, Epand RF, Meiler F, Zandomeneghi G, Neumann D, Widmer HR, Meier BH, Epand RM, Saks V, Wallimann T, *et al* (2012) Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS One* 7: e43178

Tortosa E, Montenegro-Venegas C, Benoist M, Härtel S, González-Billault C, Esteban JA & Avila J (2011) Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is required for dendritic spine development and synaptic maturation. *J Biol Chem* 286: 40638–40648

Tournier N, Comtat C, Lebon V & Gennisson J-L (2021) Challenges and Perspectives of the Hybridization of PET with Functional MRI or Ultrasound for Neuroimaging. *Neuroscience* 474: 80–93

Trotier-Faurion A, Dézard S, Taran F, Valayannopoulos V, de Lonlay P & Mabondzo A (2013) 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. *J Med Chem* 56: 5173–5181

Trotier-Faurion A, Passirani C, Béjaud J, Dézard S, Valayannopoulos V, Taran F, de Lonlay P, Benoit J-P & Mabondzo A (2015) Dodecyl creatine ester and lipid nanocapsule: a double strategy for the treatment of creatine transporter deficiency. *Nanomedicine (Lond)* 10: 185–191

Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, Gu J, Buchanan J, Preissl S, Wang A, Wu W, Haddad GG, Chaim IA, *et al* (2019) Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell* 25: 558-569.e7

Trujillo CA, Rice ES, Schaefer NK, Chaim IA, Wheeler EC, Madrigal AA, Buchanan J, Preissl S, Wang A, Negraes PD, *et al* (2021) Reintroduction of the archaic variant of NOVA1 in cortical organoids alters neurodevelopment. *Science* 371: eaax2537

Udobi KC, Delcimmuto N, Kokenge AN, Abdulla ZI, Perna MK & Skelton MR (2019) Deletion of the creatine transporter gene in neonatal, but not adult, mice leads to cognitive deficits. *J Inherit Metab Dis* 42: 966–974

Udobi KC, Kokenge AN, Hautman ER, Ullio G, Coene J, Williams MT, Vorhees CV, Mabondzo A & Skelton MR (2018) Cognitive deficits and increases in creatine precursors in a brain-specific knockout of the creatine transporter gene Slc6a8. *Genes Brain Behav* 17: e12461

Uemura T, Ito S, Masuda T, Shimbo H, Goto T, Osaka H, Wada T, Couraud P-O & Ohtsuki S (2020) Cyclocreatine Transport by SLC6A8, the Creatine Transporter, in HEK293 Cells, a Human Blood-Brain Barrier Model Cell, and CCDSs Patient-Derived Fibroblasts. *Pharm Res* 37: 61

Ullio-Gamboa G, Udobi KC, Dezard S, Perna MK, Miles KN, Costa N, Taran F, Pruvost A, Benoit J-P, Skelton MR, *et al* (2019) Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as a promising therapy for creatine transporter deficiency. *Nanomedicine (Lond)* 14: 1579–1593

Valayannopoulos V, Bakouh N, Mazzuca M, Nonnenmacher L, Hubert L, Makaci F-L, Chabli A, Salomons GS, Mellot-Draznieks C, Brulé E, *et al* (2013) Functional and electrophysiological characterization of four non-truncating mutations responsible for creatine transporter (SLC6A8) deficiency syndrome. *J Inherit Metab Dis* 36: 103–112

Van Loo KMJ, Carvill GL, Becker AJ, Conboy K, Goldman AM, Kobow K, Lopes-Cendes I, Reid CA, van Vliet EA & Henshall DC (2022) Epigenetic genes and epilepsy - emerging mechanisms and clinical applications. *Nat Rev Neurol* 18: 530–543

Verhoeven NM, Salomons GS & Jakobs C (2005) Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. *Clin Chim Acta* 361: 1–9

Villar C, Campistol J, Fons C, Armstrong J, Mas A, Ormazabal A & Artuch R (2012) Glycine and L-arginine treatment causes hyperhomocysteinemia in cerebral creatine transporter deficiency patients. *JIMD Rep* 4: 13–16

Wallery JJ, Kale VP, Novak J, Gibbs S, Do M-HT, McKew JC & Terse PS (2021) Evaluation of chronic toxicity of cyclocreatine in beagle dogs after oral gavage administration for up to 23 weeks. *Toxicol Appl Pharmacol* 430: 115680

Wang J, Zhang Q, Chen Y, Yu S, Wu X & Bao X (2019a) Rett and Rett-like syndrome: Expanding the genetic spectrum to KIF1A and GRIN1 gene. *Mol Genet Genomic Med* 7: e968

Wang L, Owusu-Hammond C, Sievert D & Gleeson JG (2023) Stem Cell-Based Organoid Models of Neurodevelopmental Disorders. *Biol Psychiatry*: S0006-3223(23)00039–2

Wang Y, Wang L, Zhu Y & Qin J (2018) Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure. *Lab Chip* 18: 851–860

Wang Z, Xiong G, Tsang WC, Schätzlein AG & Uchegbu IF (2019b) Nose-to-Brain Delivery. *J Pharmacol Exp Ther* 370: 593–601

Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K & Sasai Y (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8: 288–296

Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, *et al* (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25: 681–686

Williams LA & LaSalle JM (2022) Future Prospects for Epigenetics in Autism Spectrum Disorder. *Mol Diagn Ther* 26: 569–579

Wyss M & Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80: 1107–1213

Wyss M & Schulze A (2002) Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* 112: 243–260

Xie J, Xie L, Wei H, Li X-J & Lin L (2023) Dynamic Regulation of DNA Methylation and Brain Functions. *Biology (Basel)* 12: 152

Yang K, Chen Z, Gao J, Shi W, Li L, Jiang S, Hu H, Liu Z, Xu D & Wu L (2017) The Key Roles of GSK-3β in Regulating Mitochondrial Activity. *Cell Physiol Biochem* 44: 1445–1459

Yao B, Christian KM, He C, Jin P, Ming G-L & Song H (2016) Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* 17: 537–549

Yates PL, Case K, Sun X, Sullivan K, Baas PW & Qiang L (2022) Veteran-derived cerebral organoids display multifaceted pathological defects in studies on Gulf War Illness. *Front Cell Neurosci* 16: 979652

Younesian S, Yousefi A-M, Momeny M, Ghaffari SH & Bashash D (2022) The DNA Methylation in Neurological Diseases. *Cells* 11: 3439

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O & Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1129–1133

Zhang X-M, Zhang L, Wang G, Niu W, He Z, Ding L & Jia J (2015) Suppression of mitochondrial fission in experimental cerebral ischemia: The potential neuroprotective target of p38 MAPK inhibition. *Neurochem Int* 90: 1–8

Zhang Z, Witham S, Petukh M, Moroy G, Miteva M, Ikeguchi Y & Alexov E (2013) A rational free energy-based approach to understanding and targeting disease-causing missense mutations. *J Am Med Inform Assoc* 20: 643–651

ANNEXES

Annexe 1 – Matériels et méthodes

Amorce	Séquence (5'->3')	Efficacité amorce (%)
CREBh-for	ATGACCAATGCAGCAGCCAC	91,7
CREBh-rev	CTCCAGAGGCAGCTTGAACAAC	
CSPG4-for	AGCTAGCCAGGACTGATGGA	96,8
CSPG4-rev	CAGCCTAACCTGCTCCAAAG	
GABBR1h-for	CTTTCTTCCGAACGCACCCATC	100,2
GABBR1h-rev	AGCAATCTTCTTCCAGCCCCAC	
GRIA2h-for	AGGAAAAGACCAGTGCCCTCAG	101,0
GRIA2h-rev	AGCCACCAGCATTGCCAAAC	
IBA1h-for	GCTGAGCTATGAGCCAAACCAG	96,1
IBA1h-rev	TGCTTGTTGATCTCATCCAGCC	
MFN1-for	AGTAGACAGTCCAGGCACAG	95,6
MFN1-rev	GCGACCAAAACAAAGACATCAG	
NANOGh-for	CTGGACACTGGCTGAATCCTTC	105,0
NANOGh-rev	CCATGAGATTGACTGGATGGGC	
POU5F1h-for	GGGCTCTCCCATGCATTCAAAC	105,1
POU5F1h-rev	TCCCAAAAACCCTGGCACAAAC	
PAX6h-for	CCAACCAATTCCACAACCCACC	133,2
PAX6h-rev	GTGTTTGTGAGGGCTGTGTCTG	
PSD95h-for	ATCGTTCGCCTCTATGTCATGC	95,6
PSD95h-rev	TGCGATGCTGAAGCCAAGAC	
SIX3h-for	ACAACCCCCAACCACCATCTAC	109,0
SIX3h-rev	TTTCTGCCCGCAACATCAGC	
SLC2A1h-for	TGAGGGTAGGAGGTTTGGAT	108,7
SLC2A1h-rev	AAGAGGACACTGATGAGAGGTA	
SLC2A3h-for	CACACTTGAGAGGATGAATG	94,5
SLC2A3h-rev	GTAGGAACAAACACAGAGAAA	
SLC17A7h-for	ATGAAAGGGAATGGGGCAGGAG	85,4
SLC17A7h-rev	GCAGGGCAGGATTTACAGTCAC	
SOX2h-for	CACCAATCCCATCCACACTCAC	98,3
SOX2h-rev	GTCCCCCAAAAAGAAGTCCAGG	
YME1L1-for	CTCTTCGTTCTGCTGCTATTC	107,2
YME1L1-rev	TCAAGCCCTGTTGTTGTCC	
GAPDHh-for	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	99,4
GAPDHh-rev	AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC	

Tableau 5 : Amorces pour les PCR

L'efficacité des amorces (Tableau 5) est calculée à partir de la pente des graphes dans la Figure 49, selon la formule suivante : Efficacité (%) = (-1+10^(-1/-pente))*100

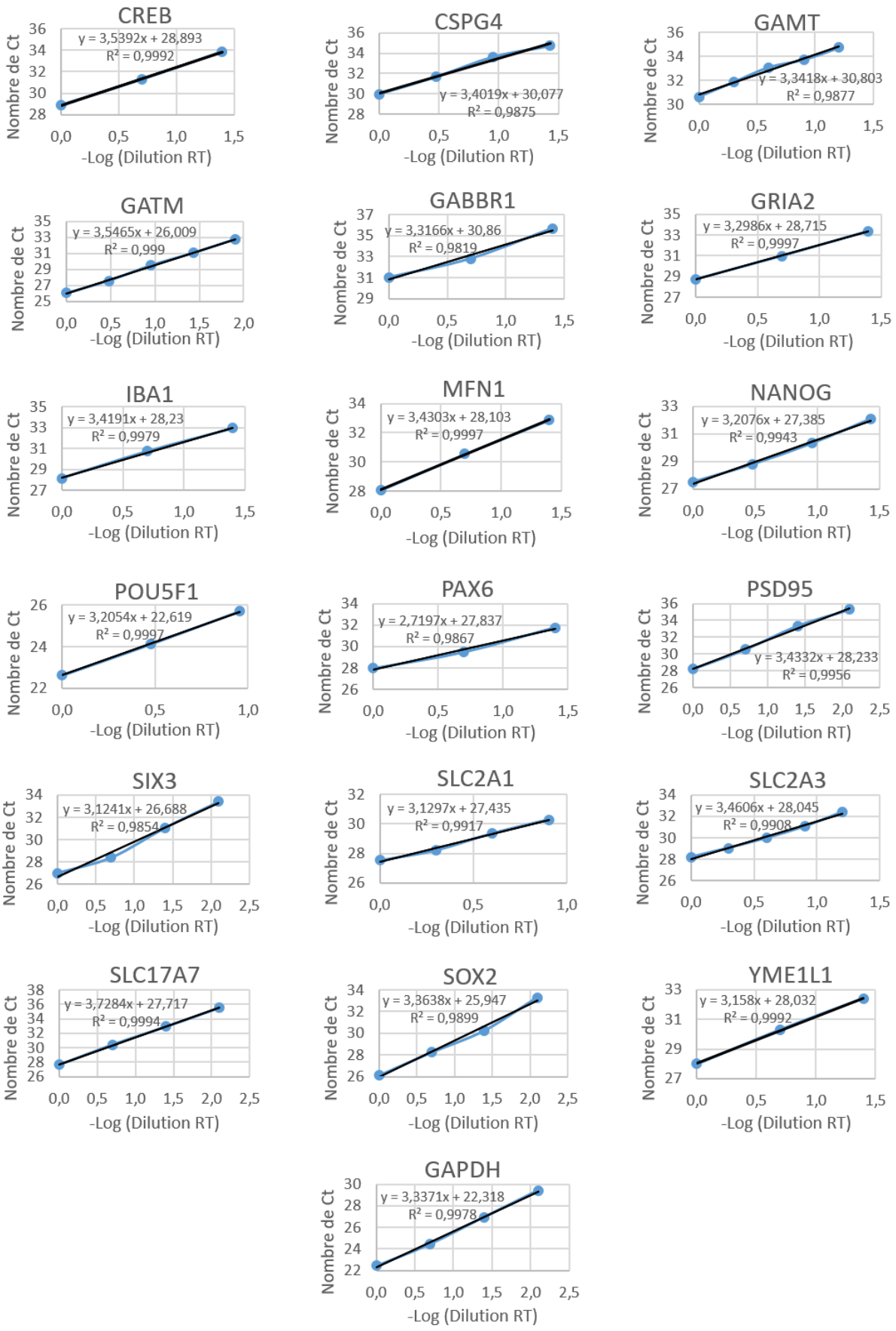


Figure 49 : Graphiques des efficacités des amorces de PCR

Les tests d'efficacité sont effectués avec l'iQ SYBR Green Supermix de Biorad #172-5124 lot 64129030, selon le mix d'ADNc et le programme PCR résumés dans le Tableau 6.

Mix	**(µl)**		**Programme PCR**		
iQ SYBR Green Supermix	6,25		Dénaturation initiale	95°C	10 min
qPCR Primer Assay (10 µM)	0,375		40 cycles	95°C (dénaturation)	15 sec
ddH2O	3,375			60°C (hybridation)	60 sec
Volume total de mix	10			72°C (élongation)	30 sec
Produit de RT (cDNA dilués)	2		Melting curve	55°C à 95°C	10 sec/0,5°C
Volume final	12				

Tableau 6 : Mix d'ADNc et programme PCR des tests d'efficacité des amorces

Annexe 2 – Liste de protéines altérées en fonction de la mutation du patient

Protein	BJa	BJb	BJc	BJd	CTD1_4a	CTD1_4b	CTD1_4c	CTD1_4d	logfc	pvalue	FDR
SEP3	1,538	1,808	1,151	1,567	3,785	3,992	3,780	3,738	-2,308	0,002	0,000
MAP6	0,951	1,131	1,151	0,950	3,043	2,755	3,486	2,396	-1,874	0,005	0,006
MYO1B	1,954	1,131	1,151	1,567	3,879	2,347	4,167	2,623	-1,803	0,008	0,040
CNTN2	0,951	1,131	1,151	0,950	2,677	3,074	2,151	3,286	-1,751	0,007	0,035
CA2D2	0,951	1,131	1,151	0,950	2,452	2,923	2,802	2,396	-1,597	0,008	0,040
LIPA1	0,951	1,131	1,151	0,950	2,677	2,347	2,802	2,127	-1,442	0,011	0,045
ZC21A	0,951	1,131	1,151	0,950	3,043	2,089	2,967	1,795	-1,428	0,014	0,055
NFL	3,863	4,055	4,683	4,204	6,055	5,354	5,912	5,087	-1,401	0,014	0,059
AGAP1	0,951	1,131	1,151	0,950	2,677	2,089	2,802	2,127	-1,378	0,013	0,055
NFH	1,954	2,615	2,616	2,329	4,128	3,653	3,947	3,286	-1,375	0,014	0,059
TP53B	2,540	2,895	2,894	2,329	3,785	4,136	3,372	4,227	-1,216	0,021	0,095
MA7D1	1,538	1,808	1,151	0,950	2,452	2,347	2,802	2,623	-1,194	0,022	0,097
PACS1	1,538	1,131	1,151	1,567	2,872	2,755	2,402	2,127	-1,192	0,022	0,097
UBQL1	0,951	1,131	1,151	1,998	2,452	2,565	2,151	2,820	-1,189	0,024	0,099
ARP10	1,538	1,131	1,151	1,998	2,872	2,089	2,967	2,623	-1,183	0,024	0,099
AT1A2	4,348	3,937	3,661	4,357	5,053	5,520	4,855	5,455	-1,145	0,025	0,103
CN37	2,276	1,808	1,817	2,598	3,335	3,210	3,115	3,413	-1,143	0,024	0,101
GDS1	2,276	1,131	2,894	3,193	3,785	3,334	3,486	3,413	-1,131	0,033	0,121
KPCB	1,538	1,131	1,151	0,950	1,857	3,555	1,460	2,396	-1,124	0,034	0,124
PI42B	1,954	2,268	1,817	0,950	3,043	3,074	2,967	2,396	-1,123	0,030	0,116
MRCKB	0,951	1,131	1,151	0,950	2,452	1,372	2,402	2,396	-1,110	0,029	0,112
AMPH	1,538	2,268	2,271	1,998	3,043	3,653	3,115	2,623	-1,090	0,030	0,116
NSF	3,125	3,508	3,128	3,730	4,405	4,785	4,357	4,295	-1,088	0,028	0,110
KAPCB	2,762	2,615	2,271	2,825	3,967	3,555	3,866	3,413	-1,082	0,028	0,110
CELF2	0,951	2,268	1,151	1,567	2,452	2,347	2,802	2,623	-1,072	0,033	0,121
GIT1	0,951	1,131	1,817	1,567	2,452	2,755	2,151	2,396	-1,072	0,031	0,116
GBG2	0,951	1,131	1,151	0,950	2,185	2,089	2,402	1,795	-1,072	0,028	0,108
KBTBB	0,951	1,131	1,151	0,950	1,432	2,089	2,802	2,127	-1,066	0,033	0,121
SV2A	0,951	1,131	1,151	0,950	2,185	2,565	1,846	1,795	-1,052	0,031	0,116
PI42A	1,538	1,808	1,151	0,950	2,677	2,565	2,616	1,795	-1,051	0,034	0,128
ANFY1	1,954	2,268	1,817	1,998	2,677	3,210	2,802	3,530	-1,046	0,032	0,121
TBB4B	8,412	8,735	8,694	8,338	9,727	9,478	9,690	9,463	-1,045	0,030	0,116
VANG2	0,951	1,131	1,151	0,950	1,857	2,089	2,616	1,795	-1,043	0,032	0,121
NFM	4,863	4,957	5,175	5,361	6,345	6,024	6,221	5,908	-1,035	0,031	0,120

TBB5	8,460	8,804	8,808	8,392	9,772	9,549	9,739	9,538	-1,033	0,031	0,116
DYHC1	7,075	7,433	7,120	7,109	8,350	8,103	8,324	8,073	-1,028	0,031	0,116
KI21B	1,954	1,808	2,271	1,567	3,461	2,347	3,250	2,623	-1,020	0,038	0,140
FARP1	0,951	1,808	1,151	1,567	3,196	2,347	2,616	1,363	-1,011	0,044	0,164
DC1L2	1,538	1,808	2,271	1,567	3,196	2,089	3,115	2,820	-1,009	0,039	0,142
ATP4A	2,540	2,268	2,271	2,329	3,335	3,449	3,372	3,286	-1,009	0,031	0,116
UBQL2	0,951	1,808	1,817	1,567	2,452	2,755	2,151	2,820	-1,008	0,038	0,138
UGGG1	3,125	3,331	2,894	3,348	3,879	4,136	4,357	4,360	-1,008	0,034	0,127
LASP1	3,125	1,808	2,616	3,193	3,685	3,746	3,780	3,530	-0,999	0,041	0,155
RAB10	3,277	2,615	2,894	3,193	4,050	3,992	4,097	3,832	-0,998	0,035	0,128
NEDD4	0,951	1,131	1,151	0,950	2,452	1,774	2,151	1,795	-0,997	0,035	0,130
RAC3	2,540	2,615	2,616	2,598	3,578	3,555	3,688	3,530	-0,995	0,031	0,119
CNTFR	0,951	1,131	1,151	0,950	2,185	1,774	2,402	1,795	-0,993	0,036	0,130
BRSK1	0,951	1,131	1,151	0,950	1,857	2,347	2,151	1,795	-0,991	0,035	0,128
RAB37	0,951	1,131	1,151	1,567	2,452	2,089	2,402	1,795	-0,984	0,038	0,140
AT12A	2,955	2,268	1,817	2,598	3,578	3,334	3,250	3,413	-0,984	0,040	0,144
VATE1	1,954	1,808	1,151	0,950	2,452	2,755	2,151	2,396	-0,973	0,042	0,156
TBA1C	7,383	7,747	7,711	7,374	8,661	8,380	8,600	8,462	-0,972	0,036	0,131
SH3G1	2,276	1,808	1,817	2,598	3,196	3,074	2,967	3,147	-0,971	0,040	0,142
AP2A2	3,763	3,508	3,504	3,348	4,526	4,600	4,676	4,157	-0,959	0,039	0,141
NCALD	0,951	1,131	1,817	0,950	2,185	2,089	2,616	1,795	-0,958	0,044	0,163
1433F	4,126	3,937	4,356	4,121	5,469	5,132	4,855	4,883	-0,950	0,041	0,146
RAB14	3,125	2,268	2,894	3,730	3,967	4,136	3,866	3,832	-0,946	0,047	0,175
SHPK	0,951	1,131	1,151	0,950	2,185	1,372	2,616	1,795	-0,946	0,045	0,167
NEUA	1,954	1,808	1,151	1,567	2,677	2,565	2,616	2,396	-0,944	0,042	0,156
NXN	0,951	1,131	1,151	0,950	2,185	1,774	1,846	2,127	-0,937	0,040	0,144
RAC1	3,541	2,615	3,504	3,730	4,340	4,266	4,233	4,295	-0,936	0,046	0,171
PIPNA	0,951	1,131	1,151	0,950	2,185	2,089	1,846	1,795	-0,933	0,040	0,144
SODM	1,954	1,808	1,151	1,998	2,872	2,565	2,802	2,396	-0,931	0,045	0,167
TBB4A	8,200	8,473	8,442	8,104	9,378	9,133	9,305	9,123	-0,930	0,041	0,148
ARL8A	1,538	1,808	1,151	1,998	2,677	2,755	2,151	2,623	-0,928	0,046	0,171
PTN11	1,954	1,808	1,151	1,567	2,452	2,755	2,151	2,820	-0,924	0,047	0,175
RAB8B	3,125	2,615	2,616	3,193	4,050	3,746	4,024	3,413	-0,921	0,047	0,174
RAB12	0,951	1,131	1,151	1,567	2,185	2,347	2,151	1,795	-0,919	0,045	0,166
RCN2	1,954	1,808	1,817	1,567	2,872	2,923	2,402	2,623	-0,919	0,043	0,163
CAPS1	0,951	1,131	1,151	0,950	1,857	2,347	1,846	1,795	-0,915	0,044	0,163
LETM1	2,540	1,808	1,817	2,598	2,677	3,334	3,115	3,286	-0,912	0,049	0,177
NCBP1	1,538	1,131	1,817	0,950	2,452	2,347	2,151	2,127	-0,910	0,048	0,177

TBB1	6,204	6,473	6,606	6,211	7,425	7,213	7,321	7,165	-0,908	0,044	0,163
HPCA	0,951	1,131	1,817	0,950	1,857	2,089	2,402	2,127	-0,906	0,049	0,177
CRIP2	2,540	2,268	2,894	2,825	3,578	3,449	3,486	3,638	-0,906	0,045	0,167
PROF2	2,955	3,331	3,128	3,193	4,128	3,992	4,024	4,082	-0,905	0,043	0,158
SYNJ1	0,951	1,131	1,151	0,950	1,432	2,089	2,151	2,127	-0,904	0,047	0,175
AP3B2	1,538	1,131	1,151	0,950	1,857	2,565	2,151	1,795	-0,899	0,049	0,177
GNA13	1,954	1,808	2,271	1,998	2,872	3,074	2,802	2,820	-0,884	0,047	0,175
GBB1	3,956	3,937	3,803	4,032	4,927	4,648	4,897	4,696	-0,860	0,049	0,177
SC65	1,538	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,854	0,050	0,177
RPE	1,538	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,854	0,050	0,177
PKCB1	1,538	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,854	0,050	0,177
GMPPA	1,538	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,854	0,050	0,177
ABHEB	1,538	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,854	0,050	0,177
RPR1A	1,538	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,854	0,050	0,177
XIRP1	1,954	2,268	2,616	2,329	1,432	1,372	1,460	1,363	0,885	0,048	0,177
MACD1	1,954	1,808	2,271	1,998	0,827	0,812	1,460	1,363	0,892	0,049	0,177
HCD2	4,043	4,055	4,356	3,939	3,196	3,334	2,616	3,638	0,902	0,049	0,177
CALU	3,415	3,331	3,328	3,487	2,452	2,755	2,616	2,127	0,903	0,045	0,167
RBM8A	1,954	1,808	2,271	1,567	0,827	0,812	0,931	1,363	0,917	0,046	0,171
RGPD3	1,538	1,808	2,271	1,998	0,827	0,812	0,931	1,363	0,921	0,046	0,171
ARL1	1,954	1,808	1,817	1,998	0,827	1,372	0,931	0,743	0,926	0,043	0,158
DP13A	2,276	2,615	2,271	1,998	0,827	1,372	1,460	1,795	0,927	0,047	0,174
PSME1	2,762	2,615	2,271	1,567	0,827	1,372	1,460	1,795	0,941	0,049	0,177
CTNA1	5,001	4,690	4,683	4,792	3,578	3,915	3,486	4,360	0,957	0,042	0,155
NDUA8	1,954	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,958	0,036	0,132
UXS1	1,954	1,808	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,958	0,036	0,132
MRE11	1,538	1,808	1,817	1,998	0,827	0,812	0,931	0,743	0,962	0,037	0,133
MTAP	1,538	1,808	1,817	1,998	0,827	0,812	0,931	0,743	0,962	0,037	0,133
PTBP1	4,863	5,074	4,755	4,845	4,128	3,746	3,372	4,421	0,967	0,042	0,155
PBIP1	1,538	2,268	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,969	0,039	0,141
MYL9	1,538	2,268	1,817	1,567	0,827	0,812	0,931	0,743	0,969	0,039	0,141
ETFA	3,863	2,895	3,128	3,838	2,452	2,565	2,151	2,623	0,983	0,041	0,149
RS20	2,762	3,130	3,328	2,598	2,452	2,347	0,931	2,127	0,991	0,045	0,166
RS10	3,541	3,331	3,504	3,614	2,677	2,347	2,151	2,820	0,999	0,035	0,128
STK24	1,954	1,808	2,616	1,567	1,432	0,812	0,931	0,743	1,007	0,038	0,141
STML2	2,762	2,615	3,128	3,348	1,857	2,089	1,460	2,396	1,013	0,037	0,137
SPEE	2,762	2,895	3,504	3,021	2,185	2,089	1,460	2,396	1,013	0,037	0,137
RL21	1,954	2,268	2,894	3,021	1,432	1,372	1,846	1,363	1,031	0,036	0,131

GLGB	1,954	2,615	1,151	2,329	1,432	0,812	0,931	0,743	1,033	0,039	0,141
COX5A	1,954	2,615	2,616	2,329	1,857	0,812	1,846	0,743	1,064	0,035	0,128
GAMT	1,954	1,808	1,817	1,998	0,827	0,812	0,931	0,743	1,066	0,026	0,103
APT	3,415	3,331	3,328	3,193	2,185	2,565	1,846	2,396	1,069	0,029	0,112
NIBA2	1,954	1,808	2,271	2,329	1,432	0,812	0,931	0,743	1,111	0,027	0,106
APOE	3,415	3,130	2,616	3,348	1,857	1,372	1,460	2,127	1,423	0,013	0,048

Tableau 7 : Liste de protéines spécifiquement altérées entre les organoïdes CTD1-4 vs BJ

(bleu : protéines plus adondantes dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes BJ ; rouge protéines moins abondantes dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes BJ)

Protein	BJa	BJb	BJc	BJd	CTD2_3a	CTD2_3b	CTD2_3c	CTD2_3d	logfc	pvalue	FDR
SYNE2	1,520	1,094	1,109	0,900	4,740	4,627	1,336	2,482	-2,141	0,007	0,062
CAMKV	0,898	1,094	1,109	0,900	3,474	3,928	1,336	2,219	-1,739	0,012	0,080
LIN7A	0,898	1,094	1,109	0,900	2,030	2,302	2,368	2,896	-1,399	0,019	0,100
SHOT1	1,520	1,094	1,109	0,900	2,497	3,388	1,336	2,704	-1,326	0,026	0,127
KDIS	0,898	1,094	1,109	0,900	2,998	2,517	1,336	2,219	-1,267	0,028	0,135
MYO6	0,898	1,807	1,109	1,552	4,356	3,770	0,718	1,484	-1,240	0,039	0,177
DCTN4	0,898	1,807	1,811	1,552	2,849	2,704	2,368	3,066	-1,230	0,029	0,136
CUL2	0,898	1,094	1,109	1,552	2,283	2,704	2,964	1,484	-1,195	0,032	0,155
KPCA	1,520	1,807	1,109	1,552	2,849	3,152	2,791	1,898	-1,175	0,033	0,157
THIC	2,557	2,925	3,360	2,848	4,561	4,001	3,891	3,802	-1,141	0,034	0,166
DLGP4	0,898	1,094	1,109	0,900	1,724	2,517	1,767	2,482	-1,122	0,036	0,170
TNPO3	1,954	1,094	1,811	1,552	2,849	2,517	2,595	2,896	-1,112	0,036	0,171
HIP1R	0,898	1,094	1,811	0,900	2,497	2,050	2,099	2,482	-1,106	0,038	0,175
COMT	0,898	1,094	1,109	0,900	2,030	2,050	2,099	2,219	-1,099	0,035	0,166
PP1R7	1,520	1,807	2,281	1,552	2,998	2,869	2,964	2,704	-1,093	0,037	0,174
NIPS1	3,308	2,925	2,635	3,223	4,051	4,261	4,198	3,895	-1,079	0,038	0,177
EAA2	0,898	1,094	1,109	0,900	2,030	2,704	1,336	2,219	-1,072	0,042	0,186
MTA2	0,898	1,094	1,109	0,900	2,684	2,704	1,336	1,484	-1,052	0,045	0,194
2A5G	0,898	1,094	1,109	0,900	1,335	2,050	2,099	2,704	-1,047	0,044	0,190
MCM7	1,520	2,282	2,920	2,000	4,117	3,770	2,791	2,219	-1,044	0,049	0,197
SFXN1	2,980	2,639	3,157	3,223	3,981	4,261	4,053	3,802	-1,025	0,043	0,188
ACYP1	0,898	1,094	1,109	0,900	1,724	2,050	2,368	1,898	-1,010	0,044	0,193
NFASC	0,898	1,094	1,109	0,900	1,335	2,704	1,767	2,219	-1,006	0,048	0,196
OCAD2	1,520	1,094	1,109	0,900	2,283	2,517	1,336	2,482	-0,999	0,050	0,197
FN3K	1,520	1,807	1,109	0,900	2,283	2,517	2,595	1,898	-0,989	0,049	0,197
DTD1	1,954	1,807	1,811	1,552	2,497	2,704	2,791	3,066	-0,983	0,047	0,196
CO2A1	1,954	1,807	1,811	1,552	0,801	0,821	0,718	0,901	0,971	0,048	0,196

ENPL	6,924	7,185	6,921	6,961	5,797	5,817	6,222	6,252	0,975	0,048	0,196
TRFL	1,520	2,282	1,811	1,552	0,801	0,821	0,718	0,901	0,981	0,048	0,196
LPPRC	5,557	5,641	5,548	5,641	4,356	4,532	4,666	4,895	0,984	0,046	0,196
TMED2	2,557	2,282	2,281	2,341	1,335	1,355	1,336	1,484	0,988	0,045	0,194
ACLY	4,807	4,945	5,056	4,664	3,981	3,494	3,501	4,539	0,989	0,050	0,197
PTGR1	2,784	3,163	2,635	2,617	2,030	1,355	2,368	1,484	0,991	0,050	0,197
ACSL1	2,286	1,807	2,281	2,000	1,335	0,821	0,718	1,484	1,004	0,047	0,196
CTL2	2,286	2,925	2,635	2,341	0,801	1,355	2,099	1,898	1,009	0,049	0,196
TXNL1	2,784	2,282	2,635	2,341	1,335	1,355	1,767	1,484	1,025	0,043	0,188
MLEC	3,308	2,925	3,157	3,048	2,030	2,302	2,099	1,898	1,027	0,042	0,187
K2C1B	3,691	3,547	3,841	3,520	2,497	2,302	2,791	2,896	1,028	0,043	0,188
RS4Y2	4,082	3,981	4,200	4,398	3,474	2,704	3,257	3,066	1,040	0,042	0,188
AGM1	3,308	3,368	2,635	3,520	2,030	2,050	2,595	1,898	1,065	0,041	0,186
NPC2	1,520	1,807	2,635	1,552	0,801	0,821	0,718	0,901	1,068	0,041	0,186
AMRP	2,557	1,807	1,811	2,000	0,801	1,355	0,718	0,901	1,100	0,038	0,175
AGRIN	5,249	5,680	5,462	5,610	3,572	4,001	5,566	4,419	1,111	0,041	0,184
CATD	4,165	4,409	3,841	3,875	2,684	2,704	3,501	2,896	1,126	0,035	0,170
ENOB	5,647	5,755	6,232	5,842	4,356	4,482	5,096	4,982	1,140	0,034	0,164
ANM1	3,574	3,163	3,360	3,379	2,849	2,050	2,099	1,898	1,145	0,034	0,164
USO1	4,583	4,945	4,488	4,939	3,750	3,388	3,384	3,802	1,158	0,032	0,152
S61A1	3,153	2,925	2,920	2,617	1,335	2,050	1,336	2,219	1,169	0,033	0,157
TMM43	2,557	3,368	2,920	3,223	1,724	1,355	1,767	2,482	1,185	0,032	0,154
GBF1	2,557	2,925	2,635	2,848	2,030	1,744	1,336	0,901	1,239	0,028	0,135
PERI	5,494	5,285	5,056	5,478	3,132	3,494	5,455	4,065	1,292	0,029	0,136
PSMD5	3,153	2,639	3,157	2,617	1,335	1,355	1,767	1,484	1,406	0,018	0,100

Tableau 8 : Liste de protéines spécifiquement altérées entre les organoïdes CTD2-3 vs BJ

(bleu : protéines plus adondantes dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes BJ ; rouge protéines moins abondantes dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes BJ)

Protein	BJa	BJb	BJc	BJd	CTD3_7a	CTD3_7b	CTD3_7c	CTD3_7d	logfc	pvalue	FDR
THS7A	0,994	1,186	1,200	0,997	1,894	2,436	3,403	3,568	-1,731	0,013	0,163
CBX1	2,011	1,866	1,873	2,054	3,052	3,150	3,507	3,132	-1,259	0,030	0,211
UBA6	2,011	2,327	2,330	2,054	3,203	3,002	3,507	3,366	-1,089	0,042	0,233
MCM5	1,590	1,186	1,873	1,620	1,894	3,002	2,329	3,254	-1,052	0,045	0,245
NRCAM	0,994	1,186	1,200	0,997	2,883	2,184	2,081	1,369	-1,035	0,047	0,250
RL19	0,994	1,186	1,873	0,997	1,486	2,650	2,540	2,505	-1,033	0,047	0,250
TWF2	0,994	1,186	1,200	0,997	2,211	1,879	2,329	2,046	-1,022	0,048	0,250
DYL1	2,011	1,866	1,200	2,387	3,203	2,436	2,888	2,999	-1,015	0,049	0,250
PYRG1	2,011	2,327	1,873	1,620	2,883	3,150	3,168	2,689	-1,015	0,049	0,250
DYL2	1,590	1,186	1,873	1,620	2,472	2,436	2,888	2,505	-1,008	0,049	0,250
ZN428	0,994	1,186	1,200	0,997	1,894	1,879	2,329	2,293	-1,005	0,050	0,253
ACTA	8,663	9,193	9,671	9,131	8,225	8,207	8,198	8,022	1,001	0,050	0,255
ODO1	3,722	3,570	2,956	4,002	1,894	2,436	2,888	2,999	1,008	0,049	0,250
MYADM	1,590	1,866	2,330	2,054	0,915	0,960	0,890	0,856	1,055	0,045	0,244
GSTM1	2,336	2,327	2,330	1,620	0,915	0,960	0,890	1,369	1,120	0,039	0,225
CO4A1	3,829	4,598	4,115	4,002	2,472	2,836	3,168	3,568	1,125	0,039	0,225
ZCHC3	1,590	2,327	1,873	2,387	0,915	0,960	0,890	0,856	1,139	0,038	0,216
CD276	2,011	2,327	1,873	2,054	0,915	0,960	0,890	0,856	1,161	0,036	0,213
CO4A2	3,189	3,570	3,190	3,255	2,211	1,491	2,329	2,505	1,167	0,035	0,213
TM9S4	2,336	2,956	1,200	2,658	1,486	0,960	0,890	0,856	1,240	0,031	0,211
SCFD1	3,342	3,191	3,190	3,082	1,894	1,491	2,081	1,747	1,398	0,023	0,186

Tableau 9 : Liste de protéines spécifiquement altérées entre les organoïdes CTD3-7 vs BJ

(bleu : protéines plus adondantes dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes BJ ; rouge protéines moins abondantes dans les organoïdes CTD par rapport aux organoïdes BJ)

Annexe 3 – Communications orales et écrites

Publications internationales dans des journaux à comités de lecture :

Mabondzo A, Harati R, **Broca-Brisson L**, Guyot A-C, Costa N, Cacciante F, Putignano E, Baroncelli L, Skelton MR, Saab C, Martini E, Benech H, Joudinaud T, Gaillard JC, Armengaud J and Hamoudi R (2023). *Dodecyl creatine ester improves cognitive function and identifies key protein drivers including KIF1A and PLCB1 in a mouse model of creatine transporter deficiency*. Front Mol Neurosci 10.3389/fnmol.2023.1118707

Broca-Brisson L, Harati R, Disdier C, Mozner O, Gaston-Breton R, Maïza A, Costa N, Guyot AC, Sarkadi B, Apati A, Skelton MR, Madrange L, Yates F, Armengaud J, Hamoudi RA and Mabondzo A (2023) *Deciphering Neuronal Deficit and Protein Profile Changes in Human Brain Organoids from Patients with Creatine Transporter Deficiency*. eLife (preprint révisé publié le 22 juin 2023)

Disdier C, Soyer A, **Broca-Brisson L**, Goutal S, Guyot AC, Ziani N, Breuil L, Winkeler A, Hugon G, Joudinaud T, Benech H, Armengaud J, Skelton MR, Harati R, Hamoudi RA, Tournier N and Mabondzo A. *Impaired brain glucose metabolism as a biomarker for therapeutic monitoring in Creatine Transporter Deficiency: insights from patient-brain derived organoids and in vivo [^{18}F]FDG PET imaging in a mouse model*. Soumis à Neuropharmacology le 7 avril 2023.

Broca-Brisson L, Disdier C and Mabondzo A. *Epigenetic alterations in Creatine Transporter Deficiency: a new marker for therapeutic efficacy monitoring*. Prévu pour soumission fin 2023 à eLife.

Brevet européen

Mabondzo A, Broca-Brisson L, Costa N, Guyot AC, Armengaud J, Hamoudi R. PR91039 *Biomarkers for cerebral metabolic disorders, and diagnostic methods using thereof*.

Communications orales

Modeling CTD using Brain Organoids Reveals Molecular Targets Associated with Inherited Intellectual Deficiency and Acquired Neurodegenerative Diseases.

CCDS Scientific and Patient Symposium organisé par l'Association for Creatine Deficiencies (ACD), Park City (Utah), 26 juin 2022.

Development of human brain organoids from patients with creatine transporter deficiency as a tool for evaluating the efficacy of therapeutic agents.

Journée des doctorants du DMTS 2023, Gif-sur-Yvette, 24 janvier 2023

Développement d'organoïdes cérébraux de patients atteints du déficit en transporteur de la créatine comme outil d'évaluation de l'efficacité d'agents thérapeutiques.

Journée des doctorants du DMTS 2022, Gif-sur-Yvette, 5 janvier 2022

Développement d'un système microfluidique pour le criblage et la prédiction de la pénétration cérébrale d'agents thérapeutiques et de la toxicité.

Journée des doctorants du DMTS 2021, Gif-sur-Yvette, 12 janvier 2021

Prix de thèse

ACD Fellowship Awards 2022-2023, for study on "Development of human brain organoids from CTD patients as a tool for evaluating the efficacy of therapeutic agents".