



HAL
open science

Étude pharmacocinétique d'une molécule d'intérêt thérapeutique potentiel, la L-carnitine, chez la souris gestante

Loïs Gay

► **To cite this version:**

Loïs Gay. Étude pharmacocinétique d'une molécule d'intérêt thérapeutique potentiel, la L-carnitine, chez la souris gestante. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. dumas-04554566

HAL Id: dumas-04554566

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04554566>

Submitted on 22 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.

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 070

**ETUDE PHARMACOCINETIQUE D'UNE MOLECULE
D'INTERET THERAPEUTIQUE POTENTIEL, LA L-
CARNITINE, CHEZ LA SOURIS GESTANTE**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 19 octobre 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

GAY Loïs

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 070

**ETUDE PHARMACOCINETIQUE D'UNE MOLECULE
D'INTERET THERAPEUTIQUE POTENTIEL, LA L-
CARNITINE, CHEZ LA SOURIS GESTANTE**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 19 octobre 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

GAY Loïs

LISTE DES ENSEIGNANTS

Pr	ABITBOL	Marie	Professeur
Dr	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Pr	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Dr	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Pr	BECKER	Claire	Professeur
Dr	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Dr	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
Pr	BENOIT	Etienne	Professeur
Pr	BERNY	Philippe	Professeur
Pr	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
Dr	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
Dr	BRUTO	Maxime	Maître de conférences
Dr	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
Pr	BUFF	Samuel	Professeur
Pr	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
Dr	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
Pr	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Pr	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
Pr	CHABANNE	Luc	Professeur
Pr	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
Dr	CHANOIT	Guillaume	Professeur
Dr	CHETOT	Thomas	Maître de conférences
	DE BOYER DES		
Pr	ROCHES	Alice	Professeur
	DELIGNETTE-		
Pr	MULLER	Marie-Laure	Professeur
Pr	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Dr	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
		Mohamed-	
Dr	FRIKHA	Ridha	Maître de conférences
Dr	GALIA	Wessam	Maître de conférences
Pr	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
Dr	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Dr	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Dr	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
	JOSSON-		
Dr	SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	JUNOT	Stéphane	Professeur
Pr	KODJO	Angeli	Professeur
Dr	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Dr	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Dr	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Pr	LE GRAND	Dominique	Professeur
Pr	LEBLOND	Agnès	Professeur
Dr	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences

Dr	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Dr	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
Dr	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
Pr	LEPAGE	Olivier	Professeur
Pr	LOUZIER	Vanessa	Professeur
Dr	LURIER	Thibaut	Maître de conférences
Dr	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
Pr	MARCHAL	Thierry	Professeur
Dr	MOSCA	Marion	Maître de conférences
Pr	MOUNIER	Luc	Professeur
Dr	PEROZ	Carole	Maître de conférences
Pr	PIN	Didier	Professeur
Pr	PONCE	Frédérique	Professeur
Pr	PORTIER	Karine	Professeur
Pr	POUZOT-NEVORET	Céline	Professeur
Pr	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Pr	REMY	Denise	Professeur
Dr	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
Pr	ROGER	Thierry	Professeur
Dr	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
Pr	SCHRAMME	Michael	Professeur
Pr	SERGEANTET	Delphine	Professeur
Dr	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Dr	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
Dr	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	ZENNER	Lionel	Professeur

REMERCIEMENTS AU JURY

À Monsieur le Professeur Laurent SCHAEFFER
PUPH HCL UCBL1

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.
Hommages respectueux.

À Monsieur Julien COURCHET
CR INSERM – HDR, Institut NeuroMyoGène
Métabolisme énergétique et développement neuronal

Qui m'a encadrée et guidée tout au long de ce travail, que ce soit pour les recherches bibliographiques, les expériences menées ou la rédaction du manuscrit.
Sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Philippe BERNY
DVM, PhD, Maître de conférences en Pharmacie Toxicologie à VetAgro Sup

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'en être le 1^{er} assesseur.
Sincères remerciements.

À Monsieur Thomas CHETOT
Maître de conférences en Biologie Clinique à VetAgro Sup

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'en être le 2nd assesseur.
Sincères remerciements.

Table des matières

Liste des annexes	11
Liste des figures	13
Liste des abréviations.....	17
Introduction	21
Partie 1.....	23
ETUDES PRELIMINAIRES ET MISE EN CONTEXTE	23
I. Développement cérébral et troubles du neurodéveloppement	23
1. Bases de la structure cérébrale chez l'Homme et la souris.....	23
2. Troubles du neurodéveloppement et étiologie	26
II. Influence du métabolisme énergétique sur le développement axonal	27
1. Les mitochondries, acteurs majeurs de la production d'énergie nécessaire à la croissance et ramification axonales	28
a. Mécanismes de production énergétique au sein de la mitochondrie	28
b. Rôle particulier des mitochondries lors du développement axonal	32
2. Régulation des dynamiques mitochondriales pour une régulation de la bioénergétique axonale localement	34
a. Motilité et distribution des mitochondries dans l'axone.....	34
b. Supports moléculaires et régulation de la mobilité des mitochondries axonales..	36
III. Mise en évidence du rôle des gènes <i>NUAK1</i> et <i>LKB1</i> dans le développement neuronal.....	36
1. <i>LKB1</i>	36
a. Structure et fonction du gène <i>LKB1</i> et de la protéine qu'il code	36
b. Rôle spécifique dans le cadre du développement neuronal	38
2. <i>NUAK1</i>	42
a. Structure et fonction du gène <i>NUAK1</i> et de la protéine qu'il code	42
b. Rôle spécifique dans le cadre du développement neuronal en association avec <i>LKB1</i>	43
c. Mutations de <i>NUAK1</i> et développement de troubles du spectre autistique	45
IV. Identification et mise en évidence d'un effet thérapeutique de la L-carnitine dans le contexte des troubles neuropsychiatriques	47
1. Structure et fonction de la L-carnitine	47
a. Transport et élimination de la L-carnitine	48
b. Fonctions connues au sein de l'organisme	50
c. Indications actuelles d'utilisation chez l'Homme, contre-indications et effets secondaires potentiels	52
2. Intérêt et rôle de la L-carnitine dans le contexte des troubles neuropsychiatriques	53
a. Définition et catégorisation des troubles neuropsychiatriques étudiés.....	53

b.	Mise en contexte de l'utilisation de la L-carnitine dans le cadre des TSA.....	54
c.	Mise en évidence de son rôle de restauration de ramification des axones.....	54
V.	Cadre expérimental de l'étude et réglementations en vigueur.....	57
1.	Pertinence du choix d'un modèle murin pour l'expérimentation.....	57
2.	Réglementations en vigueur concernant l'expérimentation animale.....	58
Partie 2.....		61
MATÉRIELS ET MÉTHODES		61
I.	Choix des animaux et de la L-carnitine	61
1.	Animaux utilisés pour l'étude.....	61
2.	L-carnitine	62
3.	Mesures de sécurité au cours des manipulations.....	63
II.	Manipulations et paramètres étudiés	63
1.	Procédures effectuées	63
a.	Méthodes d'administration de la L-carnitine.....	67
b.	Récupération des organes.....	67
2.	Mesure des différents paramètres.....	68
a.	Biodistribution quantitative	68
b.	Suivi longitudinal qualitatif.....	69
Partie 3.....		71
RESULTATS		71
I.	Objectifs expérimentaux	71
II.	Etude de la biodistribution de la L-carnitine chez la souris adulte	72
1.	Cinétique de biodistribution par injection intra-veineuse	72
a.	Biodistribution quantitative	72
b.	Suivi longitudinal qualitatif.....	81
2.	Cinétique de biodistribution par administration per os	82
a.	Biodistribution quantitative	82
b.	Suivi longitudinal qualitatif.....	88
III.	Etude de la biodistribution chez la souris gestante	89
1.	Cinétique de biodistribution par injection intra-veineuse	89
a.	Biodistribution quantitative	89
b.	Suivi longitudinal qualitatif.....	98
Partie 4.....		99
DISCUSSION		99
I.	Objectifs de l'étude et résultats.....	99
1.	Chez les souris adultes non gestantes	99
2.	Chez les souris gestantes	101

II. Hypothèses et perspectives	102
1. Biais liés aux modalités des différentes expériences	102
2. Hypothèses sur les modalités d'action possibles de la L-carnitine.....	103
3. Passage au souriceau chez les souris allaitantes.....	105
Conclusion	107
Bibliographie	109
Annexes	119

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par organe, aux différents temps de l'étude suite à l'injection par voie intra-veineuse chez les souris non gestantes.....	119
Annexe 2. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe, aux différents temps de l'étude suite à l'injection par voie intra-veineuse chez les souris non gestantes.....	119
Annexe 3. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par organe de la mère et du fœtus, aux différents temps de l'étude, suite à l'administration IV de L-carnitine aux femelles gestantes.	120
Annexe 4. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe, aux différents temps de l'étude suite à l'administration PO de L-carnitine.	120
Annexe 5. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par organe, aux différents temps de l'étude, suite à l'administration PO de L-carnitine..	120
Annexe 6. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe de la mère et du fœtus, aux différents temps de l'étude, suite à l'administration IV de L-carnitine aux femelles gestantes..	121
Annexe 7. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe de la mère et du fœtus, aux différents temps de l'étude, suite à l'administration IV de L-carnitine aux femelles gestantes (échelle modifiée)..	121

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Comparaison de coupes sagittales d'encéphale chez l'Homme (A) et la souris (B) (Sjostedt et al. 2020)	23
Figure 2. Schéma de la structure d'un neurone (Zerimech et al. 2019).	25
Figure 3. Schéma présentant l'enchaînement des différentes réactions constituant la glycolyse (Shah and Wondisford, 2020).....	30
Figure 4. Schéma représentant le fonctionnement et les différentes réactions constituant la chaîne respiratoire mitochondriale (Villedieu, 2018).....	31
Figure 5. Organisation schématique de la β-oxydation mitochondriale des acides gras (Bastin and Djouadi, 2019)..	32
Figure 6. Evolution de la longueur et du nombre de ramifications d'un axone en fonction du métabolisme mitochondrial (Lanfranchi et al., 2020).....	33
Figure 7. Illustration des différents mécanismes impliqués dans la motilité des mitochondries: mouvement antérograde, rétrograde et protéines "ancres" permettant aux mitochondries d'être stationnaires (Hollenbeck and Saxton, 2005).....	35
Figure 8. Structure de la protéine LKB1 chez la souris (Alessi et al., 2006).....	37
Figure 9. Excision d'un fragment d'ADN (représenté par la lettre Y) par la protéine recombinase Cre (Kim et al., 2018)..	39
Figure 10. Expression de la protéine recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique (Kim et al., 2018).....	40
Figure 11. Marquage des neurones du corps calleux du côté ipsilatéral et controlatéral à l'électroporation (Courchet et al., 2013).	41
Figure 12. Représentation schématique de la protéine NUA1 et de ses différents domaines (Molina and Hong, 2021).....	42
Figure 13. Marquage fluorescent des projections axonales controlatérales chez des souris contrôle ou déficientes en NUA1 (Courchet et al. 2013).	43
Figure 14. Schéma représentant la cascade de contrôle de la différenciation et de la ramification axonales (Sato and Arber, 2013).	45
Figure 15. Comparaison de coupe histologique d'encéphale et de taille de différentes parties de celui-ci chez des souris wt ou HET (Courchet et al., 2013).....	46
Figure 16. Graphes présentant le temps passé par les souris dans les différentes chambres, selon la présence de nouveautés ou non (Courchet et al., 2018).	47
Figure 17. Forme semi-développée de la molécule de L-carnitine (Martens, 2009)	48

Figure 18. Evolution de la concentration (en nM/mL) de carnitine libre après injection IV lente ou prise orale chez le sujet sain (Martens, 2009).....	49
Figure 19. Mécanismes de transport des acides gras à chaîne longue au sein de la mitochondrie et rôle de la carnitine (Zhao, 2020).	50
Figure 20. Images de neurones corticaux de génotype NUAK1 F/F et ayant subi une électroporation avec un plasmide contrôle ou exprimant la protéine Cre (Lanfranchi et al. 2020).	55
Figure 21. Mesure du potentiel membranaire interne des mitochondries, au sein de neurones contrôles ou déficients en NUAK1, traités ou non avec de la L-carnitine (Lanfranchi et al., 2020).....	56
Figure 22. Images de projections axonales controlatérales chez des souris contrôle, déficientes en NUAK1 et traitées ou non à la L-carnitine (Lanfranchi et al. 2020).....	57
Figure 23. Modèle de souris C57/Bl6. Source : fiche technique de Janvier labs.....	61
Figure 24. Schéma représentant le principe de la première expérience, à savoir l'injection de L-carnitine en IV chez les femelles non gestantes.	64
Figure 25. Schéma reprenant le principe de la deuxième expérience, à savoir l'administration de L-carnitine par voie orale chez les femelles non gestantes.....	65
Figure 26. Schéma reprenant le principe de la troisième expérience, à savoir l'administration de L-carnitine par voie intraveineuse chez les femelles gestantes.	66
Figure 27. Excrétion urinaire et fécale de la L-carnitine chez la souris adulte après injection IV de L-carnitine	73
Figure 28. Evolution de la quantité de L-carnitine dans le rein chez les souris adultes après injection par voie intra-veineuse.....	74
Figure 29. Evolution de la quantité de L-carnitine dans le tube digestif chez les souris adultes après injection par voie intraveineuse.	75
Figure 30. Graphe présentant le taux de L-carnitine présente dans la circulation sanguine en fonction du temps, chez les souris adultes après injection par voie intraveineuse	75
Figure 31. Graphes montrant l'évolution de la quantité de L-carnitine dans différents organes d'intérêt en fonction du temps, chez des souris adultes après injection par voie intraveineuse. A= Foie, B= Reins, C= Os, D= Tube digestif	76
Figure 32. Graphe présentant la quantité de L-carnitine dans les muscles après injection par voie intra-veineuse sur des souris adultes.....	78
Figure 33. Graphique présentant la quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale au cours de la manipulation.	79

Figure 34. Graphique présentant la quantité de L-carnitine présente dans l'utérus et les glandes mammaires au cours du temps, après injection IV chez les souris adultes.	80
Figure 35. Images obtenues au scanner de la souris 16 à 10 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures.	81
Figure 36. Images obtenues au scanner de la souris 17.	82
Figure 37. Graphique représentant la quantité de L-carnitine absorbée par l'organisme en fonction du temps, après une administration per os.	83
Figure 38. Graphique présentant l'excrétion de la L-carnitine (urinaire et fécale), suite à l'administration per os de L-carnitine.	84
Figure 40. Graphiques représentant l'évolution de la quantité de L-carnitine présente dans certains organes d'intérêt après administration par voie orale chez des souris adultes. A= Foie, B= Reins, C= Os, D= Muscles.	86
Figure 41. Graphique représentant la quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale, aux différents temps après administration par voie orale chez des souris adultes.	87
Figure 42. Images obtenues au scanner après administration per os, aux temps 1 heure et 2 heures.	88
Figure 43. Images obtenues au scanner chez les souris après administration per os, aux temps 4 heures et 24 heures.	89
Figure 44. Graphique présentant l'excrétion de la L-carnitine (urinaire et fécale), suite à l'administration intra-veineuse de L-carnitine chez les femelles gestantes.	91
Figure 45. Graphique présentant le taux de L-carnitine circulante en fonction du temps, chez les souris gestantes après injection IV.	92
Figure 46. Graphiques présentant le pourcentage de L-carnitine en fonction du temps dans différents organes chez la femelle gestante après injection par voie intraveineuse. A= Reins ; B= Foie ; C= Utérus.	94
Figure 47. Graphique représentant la quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale, aux différents temps après administration par injection intraveineuse chez des souris gestantes.	95
Figure 48. Graphiques représentant l'évolution de la quantité de L-carnitine chez le fœtus au cours du temps, après injection par voie intraveineuse chez les femelles gestantes. A= placentas ; B= Cadavre fœtal ; C= Foie fœtal ; D= Encéphale fœtal.	96

LISTE DES ABREVIATIONS

ACS= Acetyl-coenzyme A synthétase

ADN= Acide Désoxyribo Nucléique

AG-CL= Acide gras à chaîne longue

Akt= PKB= Protéine Kinase B

ALAT= Alanine Aminotransférase

AMPK= AMP-activated protein kinase

ARN= Acide Ribonucléique

ATM= Ataxia telangectasia mutated

ATP = Adénosine Triphosphate

BDNF= Brain-Derived Neurotrophic Factor

CACT= Carnitine Acyl-Carnitine Translocase

cAMP= Adénosine monophosphate cyclique

CPM= Coups Par Minute

CPT= Carnitine Palmitoyltransférase

CRD= C-terminal regulatory domain

CRNEEA= Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale

CUX1= Cut Like Homeobox 1

DSM-5= Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux

ERK= Extracellular regulated kinase

FADH/FAD+= Flavine adénine dinucléotide

GFP= Green Fluorescent Protein

HET= Hétérozygote

ID= Initial Dose

IMM= Membrane Mitochondriale Interne
INR= Rapport Normalisé International
IV = Intra-Veineuse
KI= Knock-In
KO= Knock-Out
LKB1= Liver Kinase B1
MBq= Mega Becquerel
Mg= milligramme
mL= Millilitre
mTOR= mammalian Target Of Rapamycin
MTP= Protéine Trifonctionnelle Mitochondriale
NADH/NAD+= Nicotinamide adénine dinucléotide
nM= nanomole
NRD= N-terminal regulatory domain
NUAK1= NUAK family SNF1-like kinase 1
OCTN2= Carnitine Organic Cation Transporter
PBS= Phosphate-Buffer Saline
PKA= protéine kinase A
PO = Per Os
RSK= Ribosomal s6 kinase
SAD-A/B= Synapses of amphids defective kinases
SCAR= Service Commun des Animaleries de Rockefeller
SFARI= Simons Foundation Autism Research Initiative
shRNA= short hairpin ARN
STK= Sérine/Thréonine Kinase
Tc= Technétium

TDAH : Trouble Déficit de l'Attention/Hyperactivité

TGF- β = Transforming Growth Factor bêta

TND= Troubles du Neurodéveloppement

TSA= Troubles du Spectre Autistique

VLCAD= Very Long Chain Acyl-coenzyme A déshydrogénase

WT= Wild Type

INTRODUCTION

Les Troubles du Spectre Autistique (TSA) sont l'un des nombreux troubles du neurodéveloppement que l'on peut retrouver chez l'Homme. Ceux-ci incluent des troubles affectant le développement et les fonctions assurées par l'encéphale (Parenti et al., 2020), tels que le Trouble Déficit de l'Attention/Hyperactivité (TDAH), certains troubles moteurs (coordination, tics, mouvements stéréotypés) ou encore des troubles de l'apprentissage. Ces différents troubles affectent considérablement et durablement la vie des individus qui en sont atteints, ce qui justifie la recherche active de solutions thérapeutiques. Nous savons actuellement que les TSA sont d'origine multifactorielle (à la fois environnementale et génétique) (Chaste and Leboyer, 2012). Récemment, de nombreuses études ont démontré le rôle de certains gènes dans cette pathologie et dans quelle mesure leur mutation pouvait induire des symptômes des TSA chez certains individus. D'autres études ont ensuite permis d'objectiver l'efficacité de certaines molécules, dont la L-carnitine, dans la restauration des lésions entraînées par ces mutations chez des souris.

Dans ce contexte, il est essentiel de déterminer une fenêtre thérapeutique pour cette molécule, afin de pouvoir par la suite affiner les modalités d'administration ainsi que la posologie proposée aux patients. Une étape indispensable dans ce processus de recherche de solution thérapeutique est donc la caractérisation de la pharmacocinétique de la L-carnitine. Dans un premier temps, il est essentiel d'avoir recours à l'animal avant de pouvoir envisager des essais cliniques. Les résultats des différentes études ayant été obtenus chez des souris, il était cohérent de poursuivre les expériences au sein de cette espèce, la biodistribution variant entre les différentes espèces.

Ce travail présente donc dans un premier temps le contexte dans lequel s'inscrit cette thèse et les études préliminaires ayant abouti à la réalisation de ce projet. Ensuite, nous présenterons les résultats de la caractérisation de la L-carnitine chez la souris adulte non gestante et chez la souris gestante.

PARTIE 1

ETUDES PRELIMINAIRES ET MISE EN CONTEXTE

I. Développement cérébral et troubles du neurodéveloppement

1. Bases de la structure cérébrale chez l'Homme et la souris

Le cerveau, organe permettant l'acquisition et le traitement d'informations par l'organisme, est composé chez l'Homme d'approximativement 100 milliards de neurones, qui sont les principales unités fonctionnelles du cerveau (Williams and Herrup, 1988). Il constitue, avec la moelle épinière, le système nerveux central. Il contient également d'autres types cellulaires que sont les cellules gliales (oligodendrocytes, astrocytes et cellules de la microglie), assurant le support trophique des neurones (Fan and Agid, 2018).

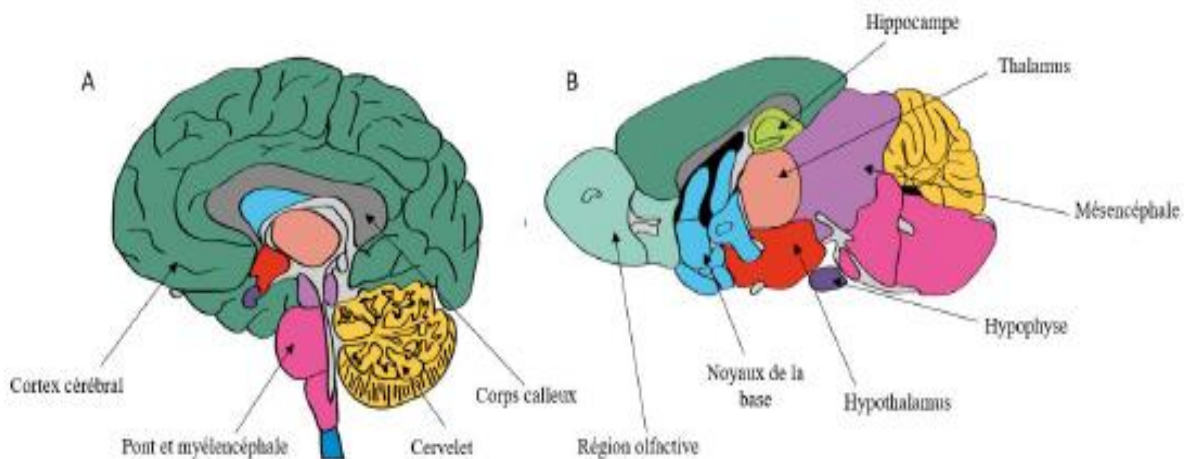


Figure 1. Comparaison de coupes sagittales d'encéphale chez l'Homme (A) et la souris (B). Les couleurs sont utilisées pour désigner chaque structure chez les deux espèces (exemple : jaune=cervelet) (Sjostedt et al. 2020)

La souris est régulièrement utilisée comme modèle pour l'étude de pathologies cérébrales chez l'Homme, en raison des similitudes que leur encéphale présente avec le nôtre. En effet, les deux espèces possèdent un encéphale remplissant entièrement la boîte crânienne, un corps calleux bien développé ainsi qu'un cervelet gyrencéphale (c'est-à-dire avec des circonvolutions, voir figure 1 ci-dessus). Le plan d'organisation général reste également similaire. La différence principale réside au niveau du cortex : celui de la souris ne présente pas de circonvolutions (il est donc lissencéphale), contrairement à celui de l'Homme.

Les six différentes couches composant le cortex sont les mêmes, mais leur épaisseur s'en trouve modifiée. Au sein du cortex, certaines différences sont également notables. En effet, les différentes aires corticales ne sont pas développées dans les mêmes proportions au sein des deux espèces (Paxinos et al., 2020). Par exemple, les fonctions associatives et cognitives sont beaucoup plus développées chez l'Homme, du fait que son néocortex soit plus étendu que son paléocortex (impliqué dans les fonctions émotionnelles et involontaires), contrairement à la souris. La topographie des aires corticales (visuelle, auditive, motrice, sensorielle) est cependant globalement conservée (Treuting et al., 2012).

Au sein de l'encéphale, les neurones forment des réseaux permettant le transfert de signaux électriques véhiculant les différentes informations, ce qui participe à la complexité de la structure cérébrale. Ces réseaux sont responsables de la transmission des informations. Les neurones qui les composent sont des cellules polarisées excitables possédant la capacité de transmettre un signal bioélectrique appelé l'influx nerveux (ou potentiel d'action), au sein d'un réseau complexe de communication (Südhof, 2021). Ils sont constitués de plusieurs éléments (voir figure 2 ci-dessous) : le corps cellulaire, contenant noyau, cytoplasme et différents organites (appareil de golgi, réticulum, mitochondries), de dendrites, des prolongements fins et courts permettant la réception de l'information ainsi que d'axones, longs prolongements assurant la conduction de l'information et formant à leur extrémité des terminaisons synaptiques (Zerimech, 2019). Celles-ci, lorsqu'elles sont connectées aux épines dendritiques appartenant à d'autres neurones, forment des synapses. Au sein de ces synapses se trouve une fente synaptique, où les neurotransmetteurs contenus dans des vésicules au sein des terminaisons axonales pré-synaptiques

seront libérés et agiront sur le neurone post-synaptique par fixation sur des récepteurs membranaires.

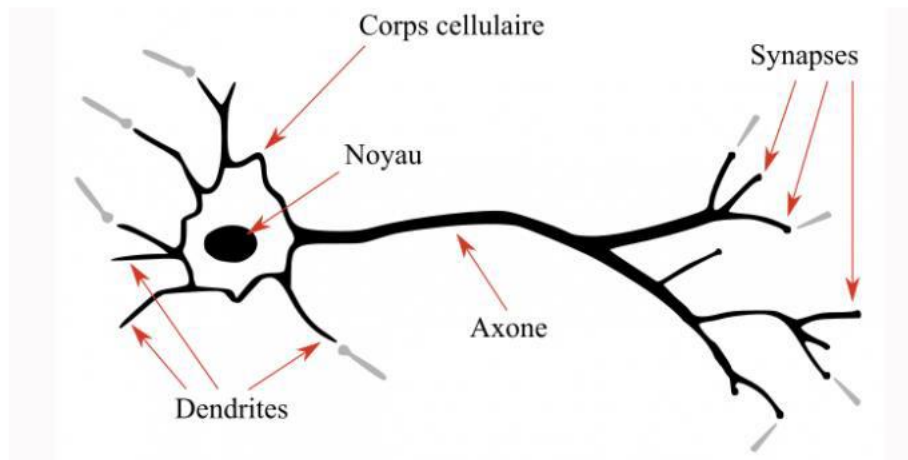


Figure 2. Schéma de la structure d'un neurone (Zerimech et al. 2019).

Au sein des neurones, les axones et dendrites possèdent de nombreuses ramifications. Ceci explique que chez l'Homme, on puisse retrouver jusqu'à 10 000 synapses pour un axone, ce qui représente autant de contacts avec des neurones post-synaptiques (Åstrand and Rodahl, 1994). Au fur et à mesure des expériences vécues par l'individu, des synapses sont ajoutées, renforcées ou éliminées par modification de l'arborisation axonale et dendritique. Ces processus, qui sont à la base de l'apprentissage et de la mémoire, constituent ce que l'on appelle la « plasticité synaptique » (Ronzano, 2017).

Au cours du développement embryonnaire de l'encéphale, les cellules neuroépithéliales forment une monocouche de cellules appelée la plaque neurale, de E9 à E12 (c'est-à-dire du 9^{ème} au 12^{ème} jour de gestation) (Smolders, 2017). Elles se divisent ensuite de manière symétrique, d'abord dans la zone ventriculaire, puis sous-ventriculaire. Autour du dixième jour du stade embryonnaire, ces cellules commencent à acquérir un phénotype plus caractéristique, notamment avec l'apparition de transporteurs et de protéines aux fonctions spécifiques. Jusqu'à E12, elles sont converties en cellules de la glie qui seront les précurseurs des astrocytes, oligodendrocytes et des neurones. A partir du 11^{ème} jour de gestation, les cellules gliales radiales se divisent asymétriquement, permettant d'obtenir des neurones ainsi que des précurseurs intermédiaires. Ces nouveaux neurones migrent ensuite des zones ventriculaires et sous-ventriculaires vers la surface piale, formant ainsi les six couches neuronales du néocortex (la couche VI comportant les neurones les plus

anciens). La neurogénèse se poursuit ensuite au cours des trois premières semaines de vie du souriceau. La migration et le développement des neurones s'accompagnent également du développement et de la ramification des axones, que nous développons dans les parties suivantes.

2. Troubles du neurodéveloppement et étiologie

Cette organisation cérébrale globale est essentielle au fonctionnement correct de l'organe. Ainsi, l'un des enjeux majeurs au sein de l'étude des neurosciences ces dernières années a été de comprendre en quoi des altérations de cette organisation pouvaient être responsables de troubles neuropsychiatriques observés dans différentes maladies. Les troubles du neurodéveloppement (TND) constituent une catégorie d'atteinte du système nerveux. Ils regroupent des pathologies variées, parmi lesquelles nous pouvons citer l'épilepsie, les troubles de l'attention et de l'activité, le retard mental, la schizophrénie et les troubles du spectre de l'autisme (Morris-Rosendahl and Crocq, 2020). Etant donné l'importance de la transmission d'informations via les synapses au sein du système nerveux, il n'est pas étonnant que la plupart de ces TND présentent des anomalies de la connectivité cérébrale ou de l'organisation et de la fonction synaptiques (Lukens and Eyo, 2022). Leur prévalence élevée au sein de la population ainsi que le faible nombre de possibilités thérapeutiques en ont fait l'objet de nombreux sujets d'étude. Ces pathologies, dont certains symptômes sont proches, partagent le fait de survenir tôt (plutôt chez l'enfant) et d'être une conséquence pour partie d'atteintes biologiques survenues au cours du développement embryonnaire ou de la petite enfance (McPartland and Volkmar, 2012).

L'étiologie de ces différents troubles est complexe, et relève en grande partie d'une forte héritabilité. En effet, la génétique joue un rôle clé dans le développement des TND. Ainsi, si l'on considère un enfant atteint d'autisme, le risque que son jumeau monozygote soit également atteint d'autisme est estimé entre 70% et 90% selon les études (Sandin et al., 2014).

La génétique n'est cependant pas la seule explication à l'apparition de TND chez un individu : il a en effet été montré que les facteurs environnementaux jouaient également un rôle prépondérant dans l'apparition et l'évolution des symptômes

caractérisant ces troubles (Chaste and Leboyer, 2012). De plus, il s'avère que des atteintes polygéniques sont fréquemment à l'origine des TND. Il existe des cas où des atteintes monogéniques sont à l'origine de ces troubles. Nous pouvons citer dans ce cas la mutation au sein du gène FMR1, responsable du syndrome de l'X fragile (Salcedo-Arellano et al., 2020). Cette mutation unique dans un gène présent sur le chromosome X est suffisante pour causer l'apparition de troubles du spectre de l'autisme ou de retard mental. Il s'agit de la cause la plus fréquente d'autisme liée à une atteinte monogénique (cette mutation est alors dite « syndromique »).

Malgré cela, ces atteintes monogéniques ne représentent que 5 à 10% des cas d'autisme. La grande majorité résulte ainsi de polymorphismes dans des centaines de gènes dont l'effet, à titre individuel, serait minime sur le développement cérébral mais pour lesquels une atteinte multiple entraîne des déficits neurodéveloppementaux (Minshew and Williams, 2007).

Aujourd'hui, il existe donc tout un pan de la recherche dédié à étudier comment ces gènes, pourtant distincts, convergent vers la régulation de fonctions biologiques essentielles pour le développement cérébral.

II. Influence du métabolisme énergétique sur le développement axonal

Le cerveau possède une activité métabolique très élevée. En effet, il utilise au quotidien plus de 20% du glucose et 20% de l'oxygène consommés par l'organisme alors qu'il ne représente en moyenne qu'environ 2% du poids corporel chez l'homme (Bélanger et al., 2011). Par ailleurs, il a été démontré au cours des années précédentes que cette activité métabolique était encore plus élevée au cours des premières années de vie de l'individu, lorsque se forment les réseaux de neurones. A l'échelle cellulaire, la consommation intense des ressources de l'organisme au sein du cerveau s'explique par le coût énergétique élevé de la transmission synaptique, qui nécessite en permanence le fonctionnement de canaux ioniques et de pompes membranaires pour assurer la genèse et la conduction du potentiel d'action, le relargage des neurotransmetteurs et l'ouverture des canaux synaptiques en réponse à la stimulation par les neurotransmetteurs (Faria-Pereira and Morais, 2022).

Au cours des premières années de la vie, l'activité métabolique est très importante : il s'agit d'une période critique. Ainsi, il n'est pas étonnant de retrouver un lien entre des altérations du métabolisme énergétique et des perturbations du neurodéveloppement. En particulier, il est à présent démontré par des études ayant été menées au cours des années précédentes, que les mitochondries, les principaux organelles cellulaires assurant la production d'énergie, sont nécessaires pour la formation des réseaux neuronaux en conditions normales, et que des mutations de gènes altérant le fonctionnement des mitochondries corrèle avec des troubles du neurodéveloppement (Lanfranchi et al., 2020).

1. Les mitochondries, acteurs majeurs de la production d'énergie nécessaire à la croissance et ramification axonales

a. Mécanismes de production énergétique au sein de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organelles cytoplasmiques présentes au sein des cellules animales et végétales. Elles sont apparues au cours de l'évolution suite à l'assimilation d'une alphaprotéobactérie par un organisme eucaryote (Nunnari and Suomalainen, 2012).

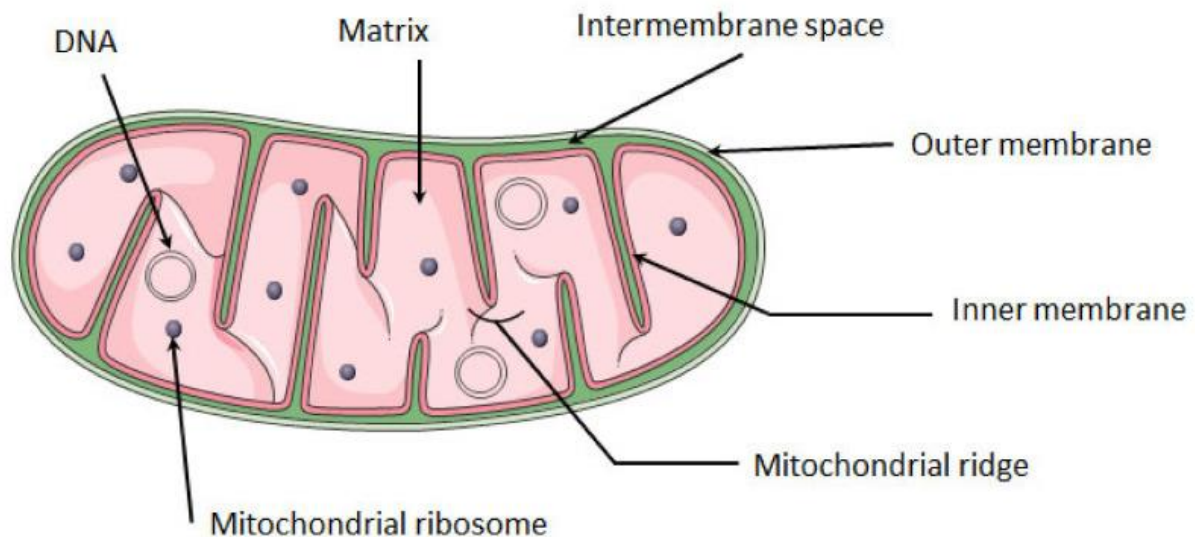


Figure 3. Structure globale d'une mitochondrie. (Andrieux et al., 2021). DNA= ADN= Acide Désoxyribo Nucléique

Elles sont constituées de deux membranes distinctes, externe et interne, qui délimitent un espace intermembranaire, ainsi que d'une matrice mitochondriale (voir figure 3 ci-dessus). La membrane externe est plutôt perméable, tandis que la membrane interne est imperméable à la grande majorité des molécules (Turcotte, 2003). Ainsi, de nombreux systèmes de transport spécifiques sont présents afin de permettre l'entrée ou la sortie de diverses molécules. Le génome de cet organite est composé d'ADN mitochondrial (mtDNA), particulier puisque circulaire et dont la taille est réduite du fait d'un transfert de gènes vers le noyau au cours de l'évolution. Ce génome est composé de 16 569 paires de bases, constituant un total de 37 gènes (Anderson et al., 1981).

Lors de la fécondation, l'ADN mitochondrial paternel est détruit chez de nombreuses espèces, ce qui implique que la transmission soit presque exclusivement maternelle.

Les mitochondries possèdent plusieurs rôles essentiels au sein des organismes vivants, dont principalement la production d'énergie. Celle-ci, existant sous forme d'ATP, résulte de plusieurs voies d'actions distinctes, utilisant comme substrat premier le glucose (BOUCHEZ Cyrielle, 2020). Premièrement, la glycolyse permet, dans le cytosol, l'oxydation du glucose en pyruvate (voir figure 4 ci-dessous). Lors de cette succession de réactions, de l'ATP est formé au cours de la transformation de 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate, ainsi que lors de la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate, réaction catalysée par la pyruvate kinase (Shah and Wondisford, 2020).

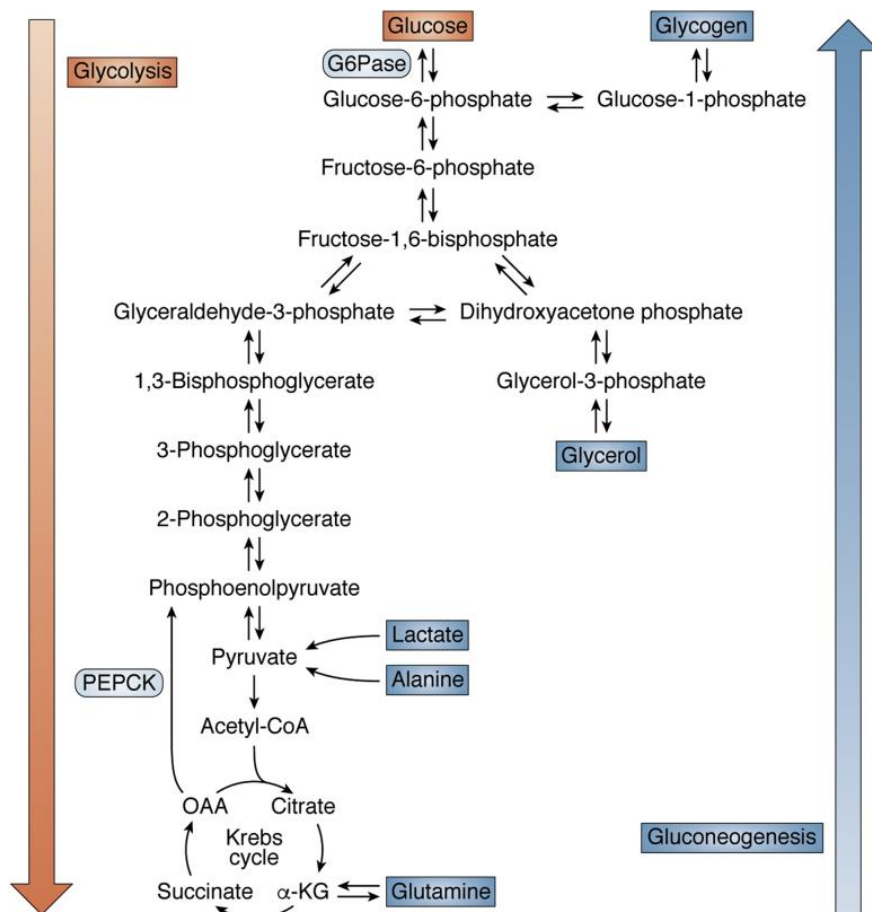


Figure 4. Schéma présentant l'enchaînement des différentes réactions constituant la glycolyse (Shah and Wondisford, 2020). PEPCCK= phosphoenolpyruvate carboxykinase ; OAA= acide oxaloacétique ; α -KG= acide alpha-cétoglutarique.

Le pyruvate entre ensuite dans la mitochondrie et est utilisé comme substrat par le cycle de Krebs, dont la dernière réaction, consistant en la transformation du succinyl-CoA en succinate, permet la production d'ATP.

L'essentiel de la production d'ATP est réalisé au niveau de la chaîne respiratoire, située dans la membrane interne des mitochondries. Cette chaîne est composée de quatre complexes enzymatiques (I : NADH déshydrogénase, II : succinate ubiquinone oxydoréductase, III : ubiquinone cytochrome oxydoréductase et IV : cytochrome c oxydase), ainsi que de deux transporteurs mobiles d'électrons (ubiquinone Co Q et cytochrome c) (Guan et al., 2022). La réduction de $\text{NADH} + \text{H}^+$ en NAD^+ au sein du complexe I permet, tout d'abord, la libération de 2 électrons transférés ensuite à la coenzyme Q puis au complexe III (Villedieu, 2018). Ils sont ensuite transférés au cytochrome C, puis au complexe IV au niveau duquel une réaction d'oxydation du

dioxygène et des protons permet la production d'une molécule d'H₂O. Les protons, quant à eux, sont transférés en parallèle de la matrice vers l'espace intermembranaire, au travers des complexes I, II et IV. La réaction finale permettant la production d'ATP consiste en un couplage entre le transfert de protons via le complexe V de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale et la réaction de phosphorylation d'ADP et Pi en ATP (voir figure 5 ci-dessous).

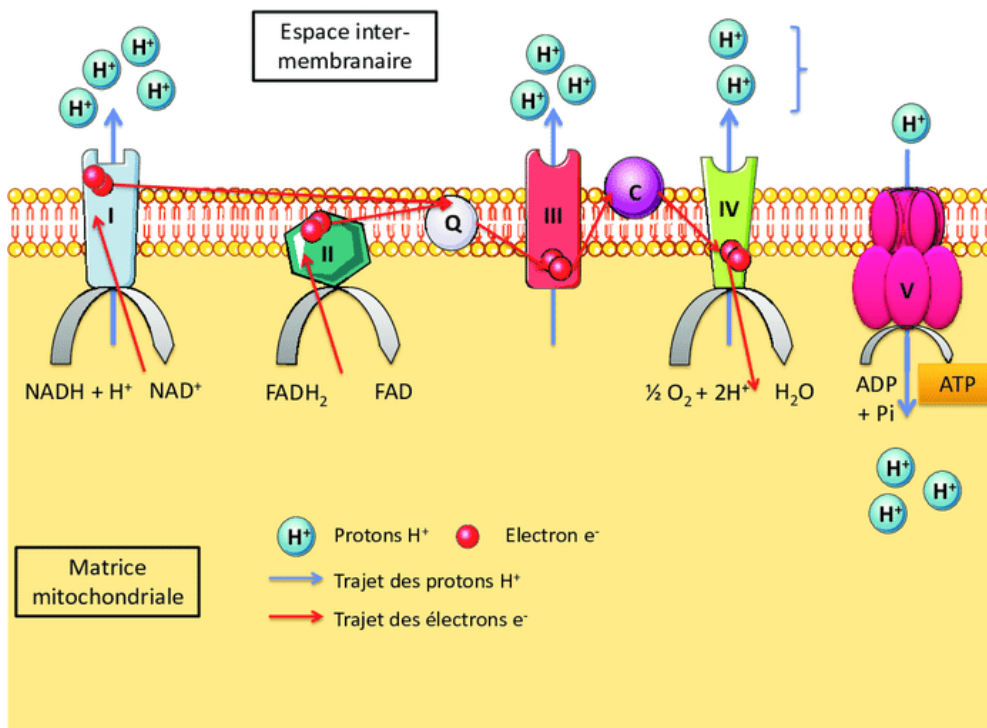


Figure 5. Schéma représentant le fonctionnement et les différentes réactions constituant la chaîne respiratoire mitochondriale. (Villedieu, 2018). Les chiffres (I, II, III et IV) correspondent aux différents complexes évoqués plus haut. L'élément Q correspond à l'ubiquinone et le C au cytochrome C. NADH/NAD= Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée ou réduite ; ATP= Adénosine Triphosphate ; ADP= Adénosine Diphosphate.

Au sein de la matrice mitochondriale ont également lieu des réactions de β -oxydation (voir figure 6 ci-dessous), permettant l'utilisation des acides gras comme source d'énergie (Lemarie Fanny, 2016). Cette chaîne de réactions, aussi appelée hélice de Lynen, permet l'obtention d'acétyl-CoA qui sera ensuite oxydé dans le cycle de Krebs, permettant donc in fine une production d'ATP. Cette voie métabolique revêt une importance particulière pour l'utilisation de la L-carnitine dans le cadre de notre étude (voir IV.).

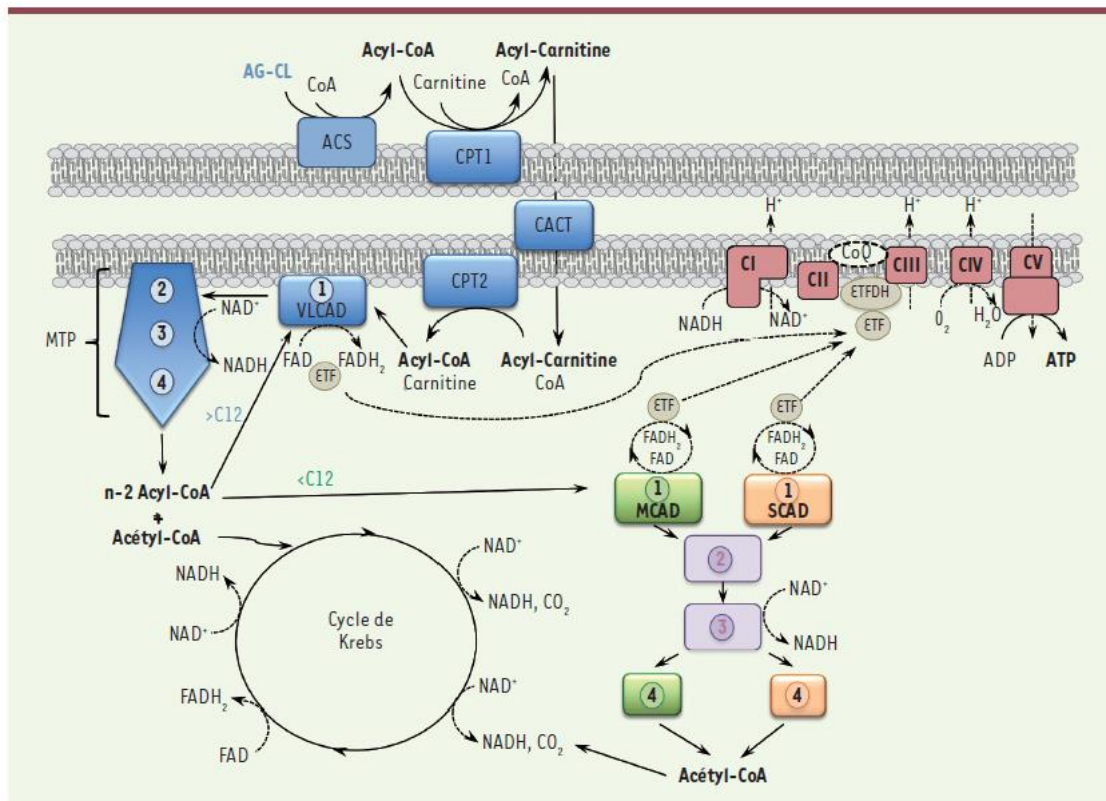


Figure 6. Organisation schématique de la β -oxydation mitochondriale des acides gras. (Bastin and Djouadi, 2019). Les numéros 1 à 4 correspondent aux différentes étapes de l'hélice de Lynen. NADH/NAD= Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée ou réduite ; FAD/FADH₂= Flavine adénine dinucléotide oxydée ou réduite ; VLCAD= Very long chain acyl-CoA déshydrogénase ; MCAD= Medium chain acyl-CoA déshydrogénase ; SCAD= Short chain acyl-CoA déshydrogénase ; CPT1 et 2= Carnitine palmitoyltransférase I et II ; MTP= protéine trifonctionnelle mitochondriale ; Les complexes CI à CV correspondent aux complexes protéiques impliqués dans la chaîne respiratoire.

b. Rôle particulier des mitochondries lors du développement axonal

Les mécanismes cellulaires permettant la formation des ramifications axonales sont critiques, car ils permettent la connectivité et in fine la fonction cérébrale. Des études récentes ont montré que la formation ainsi que le raffinement (c'est-à-dire la sélection) des ramifications des axones (appelées branches axonales) reposent sur un équilibre entre l'activité synaptique et l'action de neurotrophines extracellulaires

(Lewis et al., 2013) . Les signaux issus de ces deux voies permettent l'activation de voies de signalisation intracellulaires, médiatrices d'une cascade d'évènements tels que l'addition de membrane, une translation protéique locale ou un remodelage du cytosquelette. Ces différents évènements sont très énergivores, or la diffusion dans l'espace des molécules telles que l'ATP est fortement limitée, ce qui implique que la production d'énergie cellulaire doit être suffisante localement. Pour l'essentiel, l'ATP est consommé au niveau des synapses (Rangaraju et al., 2014) et ce afin de pouvoir assurer une homéostasie électrolytique et le recyclage des vésicules synaptiques. Les mitochondries sont activement transportées et capturées au niveau présynaptique afin de permettre un approvisionnement suffisant en ATP localement (Lewis et al., 2013). Par conséquent, la longueur ainsi que le nombre de branches d'un axone reposent sur le métabolisme mitochondrial (voir figure 7 ci-dessous). En effet, ces deux paramètres varient en fonction de l'apport en glucose effectué dans le milieu de culture, montrant le rôle tenu par le métabolisme énergétique. De plus, la quantité de roténone, qui est un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, influe également ces deux critères, confirmant l'hypothèse du rôle du métabolisme mitochondrial dans l'élongation et la ramification axonales.

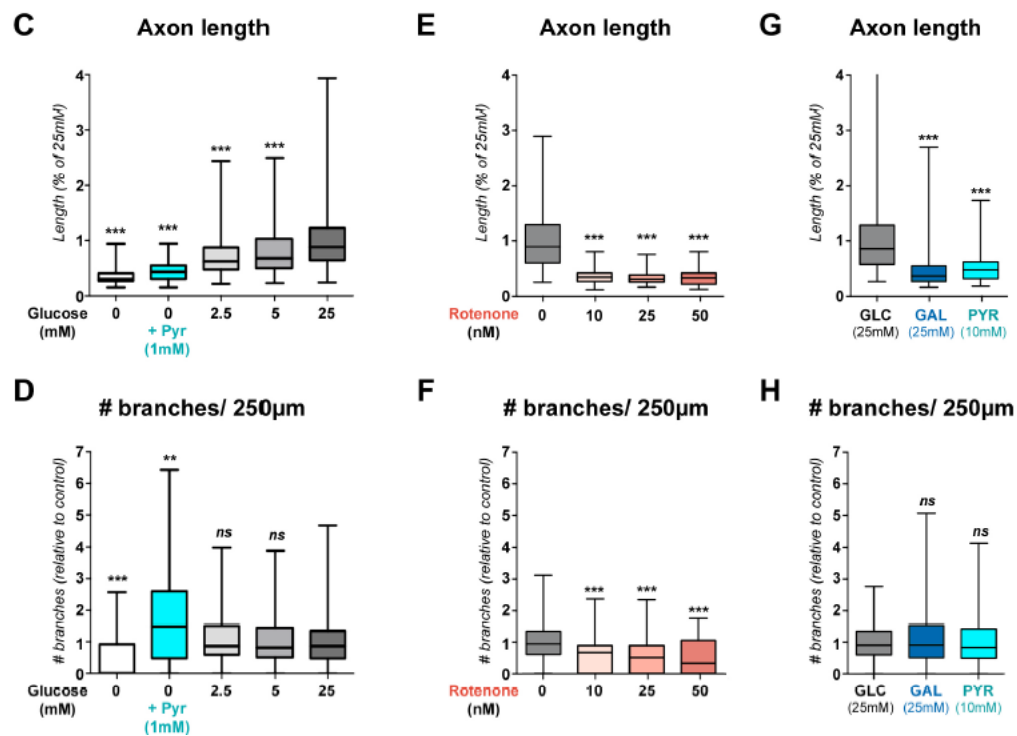


Figure 7. Evolution de la longueur et du nombre de ramifications d'un axone en fonction du métabolisme mitochondrial. (Lanfranchi et al., 2020). GLC= glucose, GAL= galactose, PYR= pyruvate.

2. Régulation des dynamiques mitochondriales pour une régulation de la bioénergétique axonale localement

Puisque les synapses sont le principal site consommateur d'énergie dans le système nerveux, il n'est pas surprenant que les mitochondries soient fortement associées avec les régions pré- et post-synaptiques (Rangaraju et al., 2019). Grossièrement, près de la moitié des boutons pré-synaptiques des neurones corticaux ont au moins une mitochondrie résidente, ce qui suggère que le métabolisme énergétique est régulé localement à la synapse. La localisation synaptique des mitochondries est critique pour le développement axonal (Spillane et al., 2013) (Courchet et al., 2013) et le fonctionnement synaptique (Su et al., 2020). Par conséquent, les neurones ont des mécanismes biologiques fortement régulés permettant la distribution des mitochondries le long de l'axone et leur association avec les synapses (Misgeld and Schwarz, 2017). Pour comprendre ces mécanismes, il convient de préciser en amont les modalités de déplacement des mitochondries le long de l'axone, ainsi que les modalités de stationnarité de celles-ci.

a. Motilité et distribution des mitochondries dans l'axone

Au cours du développement neuronal, les mitochondries axonales et dendritiques présentent une motilité décroissante à mesure de la maturation des neurones (Faits et al., 2016). Cette motilité est permise par différentes protéines présentes au sein de l'axone ainsi que par le cytosquelette (Ellouze, 2023). Le mouvement est soit antérograde (permis par des moteurs moléculaires de la famille des kinésines) soit rétrograde (permis par des moteurs moléculaires de la famille des dynéines) (Misgeld and Schwarz, 2017) (voir figure 8 ci-dessous).

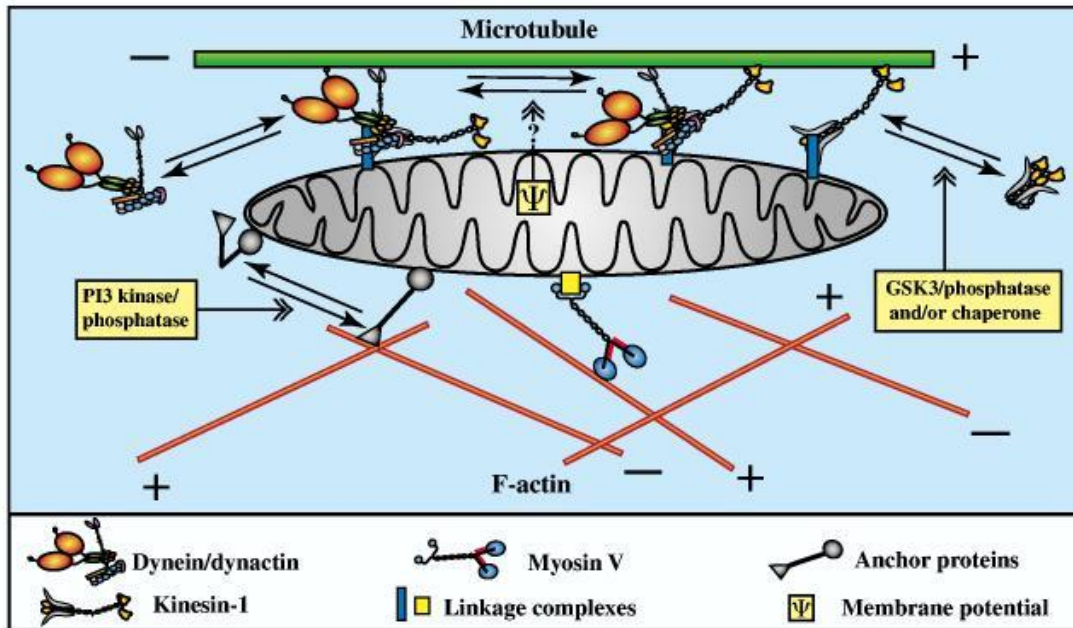


Figure 8. Illustration des différents mécanismes impliqués dans la motilité des mitochondries : mouvement antérograde, rétrograde et protéines "ancres" permettant aux mitochondries d'être stationnaires. (Hollenbeck and Saxton, 2005). GSK3= glycogène synthase kinase 3; PI3= phosphatidylinositol 3-kinase.

Les mitochondries axonales sont divisées en deux groupes selon leur activité : celles qui, qu'elles soient mobiles ou immobiles, ont la capacité de s'associer avec les moteurs moléculaires (dynéines et kinésines), et donc de se déplacer le long des microtubules lorsque les conditions cellulaires le demandent, et celles qui sont stationnaires, c'est-à-dire que même en présence de moteurs moléculaires, ces mitochondries ne peuvent pas se déplacer. Les mitochondries stationnaires restent immobiles à leur position au sein de l'axone, et ce grâce à des protéines jouant le rôle d'ancre, telles que la syntrophine, ou encore grâce au cytosquelette d'actine (Pathak et al., 2010) (voir figure 8 ci-dessus).

Il a été démontré un lien entre la distribution des mitochondries au sein de l'axone et la formation et la stabilisation des ramifications axonales. Les mitochondries forment des « clusters » le long de l'axone, dont la densité est plus importante à l'origine d'une branche qu'ailleurs le long de celle-ci (Lanfranchi et al., 2020). En effet, lors de marquages, on remarque que les mitochondries ne sont pas distribuées de manière égale, mais présentent des zones de basse et de haute densité. De même, les embranchements axonaux se retrouvent plus proches des clusters que d'autres zones de l'axone.

Ainsi, la motilité des mitochondries, qu'il s'agisse des mitochondries stationnaires ou mobiles au moyen des moteurs moléculaires, est étroitement liée au développement axonal.

b. Supports moléculaires et régulation de la mobilité des mitochondries axonales

La mobilité des mitochondries et leur position au sein de l'axone telles que décrites précédemment (moteurs moléculaires, protéines d'ancrage ou encore cytosquelette) sont contrôlées par un certain nombre de protéines. Celles-ci forment alors ce qu'on appelle une voie de signalisation intracellulaire, qui correspond à un ensemble de molécules relayant un signal au sein d'une cellule (Alberts et al., 2002). Ces voies permettent de réguler la localisation des mitochondries en fonction du contexte cellulaire environnant, et ainsi d'exercer un contrôle sur la position des mitochondries synaptiques.

Plusieurs protéines différentes sont impliquées dans ces processus, parmi lesquelles deux exemples que nous étudions ici : les protéines LKB1 et NUAK1.

III. Mise en évidence du rôle des gènes *NUAK1* et *LKB1* dans le développement neuronal

1. LKB1

a. Structure et fonction du gène LKB1 et de la protéine qu'il code

Le gène LKB1, également appelé STK11, a historiquement été découvert comme un gène suppresseur de tumeurs, dont les mutations sont associées à un syndrome de prédisposition au cancer dit syndrome de Peutz-Jeghers. LKB1 est localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 19, en position 19p13.3, et il comporte 12 exons. Chez la souris, le gène *Lkb1* est porté par le chromosome 10.

Le produit de l'expression du gène LKB1 est une protéine kinase, la « Liver Kinase B1 ». Sur un plan moléculaire, une kinase est une protéine enzymatique impliquée dans des réactions de phosphorylation, c'est-à-dire un transfert de groupement phosphate depuis une molécule d'Adénosine Tri Phosphate (ATP) vers une protéine

(Alessi et al., 2006). La phosphorylation a pour effet général de changer la fonction du substrat, classiquement en altérant la fonction, la structure ou la localisation subcellulaire de la protéine phosphorylée. Par conséquent, la protéine LKB1 entre dans les voies de signalisation cellulaires, c'est-à-dire que son activité, et l'activité en cascade des protéines en aval, transduit un signal cellulaire aboutissant à la modulation de fonctions biologiques. C'est ce rôle que LKB1 remplit notamment dans les neurones. La figure suivante présente la structure de la protéine ainsi que les différents sites de phosphorylation qu'elle comporte et qui régulent sa fonction (voir figure 9 ci-dessous).

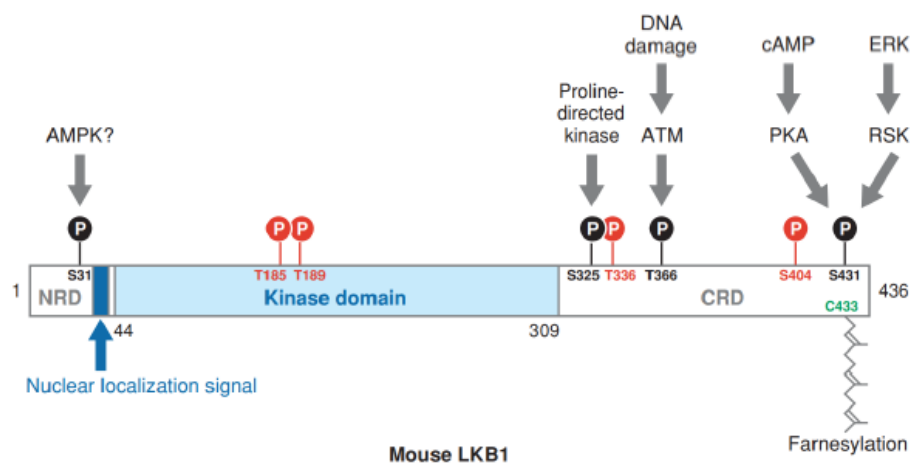


Figure 9. Structure de la protéine LKB1 chez la souris. (Alessi et al., 2006) Les sites rouges sont les sites d'autophosphorylation et les sites noirs sont ceux phosphorylés par d'autres kinases. NRD= N-terminal regulatory domain ; AMPK = AMPK= AMP-activated protein kinase ; CRD= C-terminal regulatory domain ; DNA= Desoxyribo Nucleic Acid ; ATM= Ataxia telangectasia mutated ; cAMP= Adénosine monophosphate cyclique ; PKA= protéine kinase A ; ERK= Extracellular regulated kinase ; RSK= Ribosomal s6 kinase.

La protéine LKB1 assure plusieurs rôles au sein de l'organisme. Sa fonction primordiale, au moment de l'identification de LKB1, est le contrôle de la prolifération cellulaire, expliquant pour partie son activité antitumorale. En parallèle, LKB1 a été identifiée comme un composant essentiel dans les mécanismes de polarisation cellulaire de nombreux types de cellules, c'est-à-dire qu'elle permet aux différentes cellules d'acquérir une asymétrie morphologique et fonctionnelle (Alessi et al., 2006). La démonstration primordiale de ce rôle de LKB1 a été la démonstration que l'expression du gène LKB1 dans des cellules intestinales cancéreuses est suffisante

pour entraîner la formation d'une structure ressemblant à une bordure en brosse des cellules intestinales (Baas et al., 2004).

La protéine kinase LKB1 remplit également un rôle particulier au cours du développement embryonnaire, notamment dans la différenciation des cellules nerveuses, mais également dans la croissance et la ramification des axones.

En effet, une étude publiée en 2019 montre qu'en invalidant le gène LKB1 dans une sous-population de cellules souches de la crête neurale issues de la région thoracique du tube neural, on obtient un blocage de la différenciation des cellules nerveuses et gliales du système nerveux entérique (responsables de la motricité du tractus digestif) (Radu et al., 2019). Cette inactivation entraîne également un arrêt de la différenciation des cellules de Schwann myélinisantes et non-myélinisantes (nécessaires à la survie et à l'isolation des axones des nerfs périphériques) ainsi que des mélanocytes, qui sont des cellules pigmentaires.

Cette même étude démontre que la cause de la genèse de ce phénotype est l'inhibition de la transformation du pyruvate en alanine par l'alanine aminotransférase (ALAT), relayée par l'AMPK et impliquant mTOR, qui est un intégrateur métabolique.

b. Rôle spécifique dans le cadre du développement neuronal

Bien qu'exprimé dans le système nerveux pendant le développement embryonnaire et chez l'adulte, le gène *LKB1* n'est pas associé à des manifestations cliniques neurologiques. Ainsi, les patients atteints de syndrome de Peutz Jeghers n'ont pas de troubles neuropsychiatriques qui pourraient être retrouvés avec des mutations affectant d'autres gènes suppresseurs de tumeurs.

Néanmoins, des études chez la souris ont démontré que la protéine LKB1 joue un rôle essentiel dans la formation du système nerveux central. De fait, le gène *Lkb1* est essentiel pour le développement embryonnaire et certaines des mutations de ce gène sont incompatibles avec la vie, expliquant qu'elles ne soient pas retrouvées chez les patients. La mutation des deux allèles de *Lkb1* entraîne des défauts de développement qui ne sont pas viables (chez la souris, létalité autour de la première semaine de développement embryonnaire) dont un défaut de développement cardiovasculaire.

Afin de pouvoir identifier les rôles de LKB1 dans le système nerveux central, une inactivation sélective du gène *Lkb1* a été menée (Barnes et al., 2007) (Shelly et al., 2007). Ceci a été possible grâce à l'utilisation du système Cre-LoxP. Celui-ci fait

intervenir une protéine recombinase du bactériophage P1, la Cre, qui a la capacité de reconnaître de manière spécifique une séquence, appelée LoxP, présente sur un autre gène (Kim et al., 2018). Celle-ci est constituée de deux séquences palindromiques (lisibles dans les deux sens), n'entraînant aucune modification de l'expression du gène sur lequel elle se trouve (l'allèle ainsi modifié est dit « floxé »). Lorsque la Cre reconnaît ces deux séquences, une excision de l'ADN présent entre elles est alors réalisée (voir figure 10 ci-dessous).

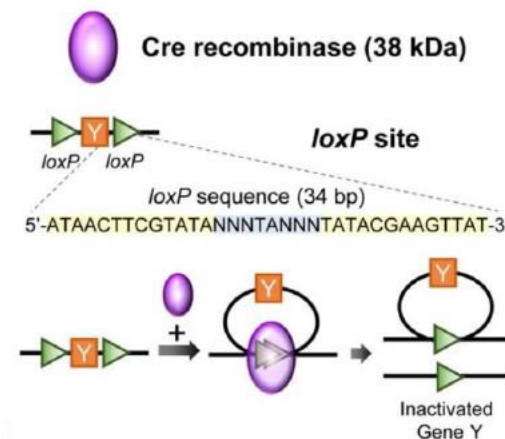


Figure 10. Excision d'un fragment d'ADN (représenté par la lettre Y) par la protéine recombinase Cre. Ce fragment sera par la suite rapidement dégradé (Kim et al., 2018). KDa= kilo Dalton ; loxP = locus of X-over P1.

Ce système permet donc d'intégrer deux séquences LoxP chez un animal, entourant l'exon d'un gène d'intérêt dont on souhaite l'inactivation spécifique. À la suite de la suppression de cet exon, le gène concerné ne sera pas exprimé, puisque la trame de lecture sera décalée ou que le codon START sera supprimé. Cette inactivation permet donc ensuite une perte de fonction de la protéine dont on souhaite étudier l'effet au sein de l'organisme.

Afin d'obtenir une inactivation à un moment précis du développement, il est possible de placer le gène exprimant Cre sous le contrôle d'un promoteur de gène spécifique, dont on connaît le moment d'activation (voir figure 11 ci-dessous). Ainsi, seules les cellules exprimant la Cre présenteront une suppression du gène d'intérêt, tandis que les autres l'exprimeront de manière normale.

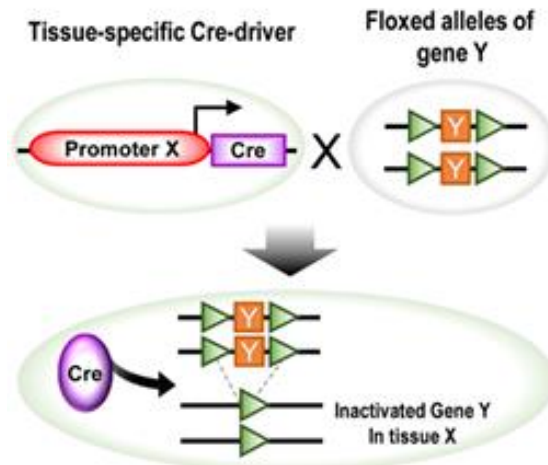


Figure 11. Expression de la protéine recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique (Kim et al., 2018).

Deux lignées de souris sont ensuite obtenues par transgénèse, la première possédant un fragment d'ADN entouré des deux sites LoxP (donc possédant des allèles floxés comme dit précédemment). La seconde, par insertion (KI) d'une séquence codant pour le gène de la Cre, est constituée de souris exprimant la protéine recombinase Cre dans un tissu en particulier.

Dans une étude publiée en 2013, Julien Courchet et son équipe ont montré, par le biais de ce système, que la protéine LKB1 était nécessaire à la formation de ramifications par les axones in vivo. Pour ce faire, ils ont réalisé une électroporation corticale in utero, permettant l'insertion de plasmides exprimant la protéine Cre, au stade E15 (15^{ème} jour de développement embryonnaire). Cette approche a permis de cibler les neurones dont les projections se situent dans les couches 2 et 3 du corps calleux de l'encéphale (Courchet et al., 2013).

Le plasmide injecté a permis de marquer les axones via l'expression d'une protéine fluorescente (voir figure 12 ci-dessous).

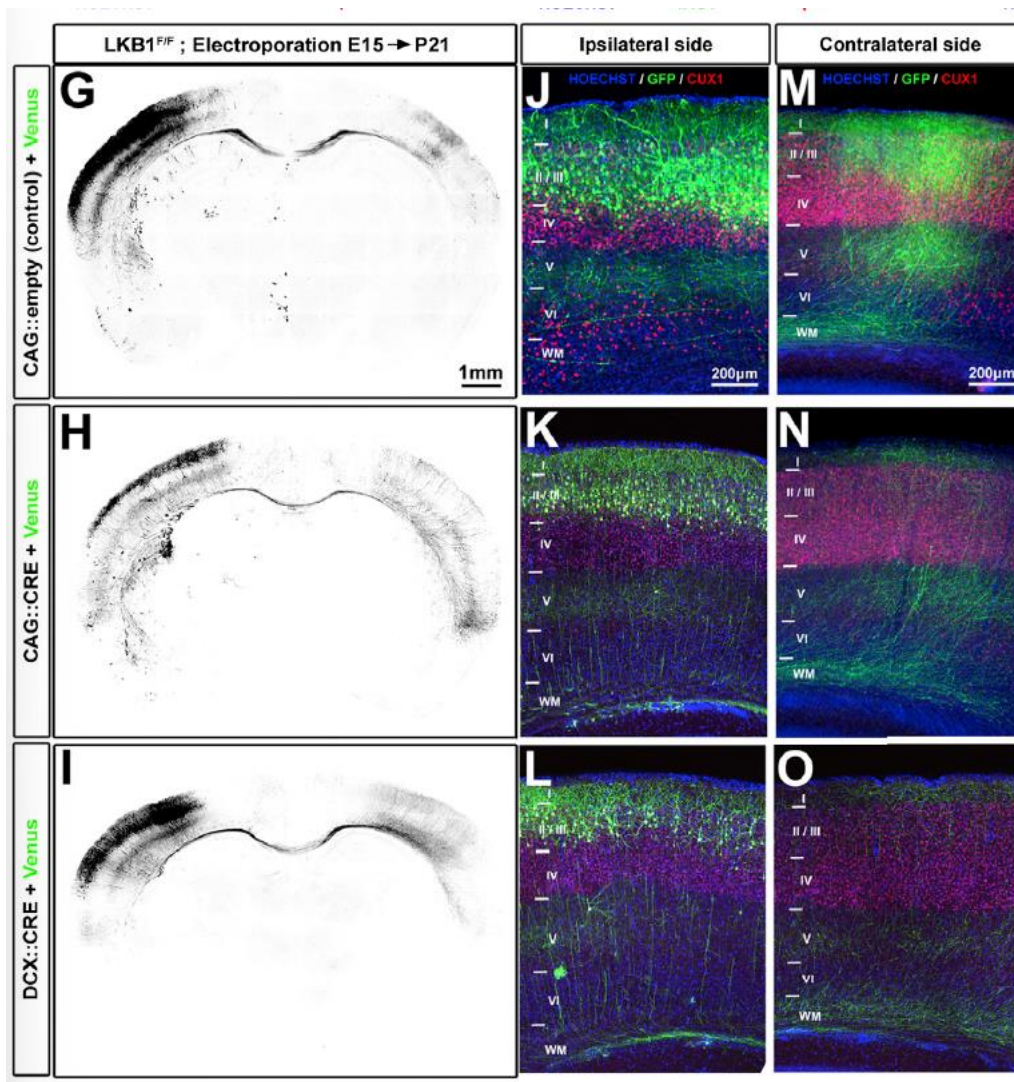


Figure 12. Marquage des neurones du corps calleux du côté ipsilatéral et controlatéral à l'électroporation. Les images G, J et M correspondent au contrôle. H, K, N et I, L, O correspondent au $KO_{NEX-CRE}$ sous le contrôle de deux différents promoteurs. On constate que les neurones déficients en LKB1 ont quand même développé des axones traversant la ligne médiane corticale, mais qu'ils montrent une ramification moins importante ipsilatéralement dans la couche V, ainsi que controlatéralement dans les couches II/III et V. (Courchet et al., 2013). CAG et DCX correspondent aux deux promoteurs de gène utilisés. LKB1= Liver Kinase B1

Ceci nous montre donc que la protéine LKB1 est nécessaire afin d'obtenir une ramification axonale terminale correcte in vivo, ce qui nécessite qu'elle soit exprimée et fonctionnelle. Cette protéine nécessite un effecteur en aval de la voie, qui est également une kinase : la protéine NUAK 1, dont nous allons détailler le fonctionnement dans la partie suivante.

2. NUAK1

a. Structure et fonction du gène *NUAK1* et de la protéine qu'il code

LKB1 est classiquement décrite comme une « master kinase » (Alessi et al., 2006), c'est-à-dire que sa fonction biologique est d'activer sélectivement d'autres kinases, par phosphorylation, ces kinases en aval jouant le rôle de relai vers des voies de signalisations spécifiques et des fonctions biologiques particulières. Parmi ces relais de LKB1, c'est la protéine NUAK1 qui sert de relai pour le développement axonal (Courchet et al., 2013).

NUAK1 est un gène comportant 7 exons (8 chez la souris), et localisé en position 12q23.3 (chromosome 10 chez la souris). Il code une protéine sérine/thréonine kinase qui est proche, structurellement et fonctionnellement, d'une autre kinase impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique et appelée AMPK. NUAK1 se trouve dans le cytoplasme, les microtubules ainsi que dans le noyau des cellules. Elle est constituée de deux domaines principaux (voir figure 13 ci-dessous) : le domaine STK (sérine/thréonine kinase), qui caractérise cette famille de protéines, et le site activable par la protéine Akt au niveau de sa partie C-terminale (Molina and Hong, 2021).

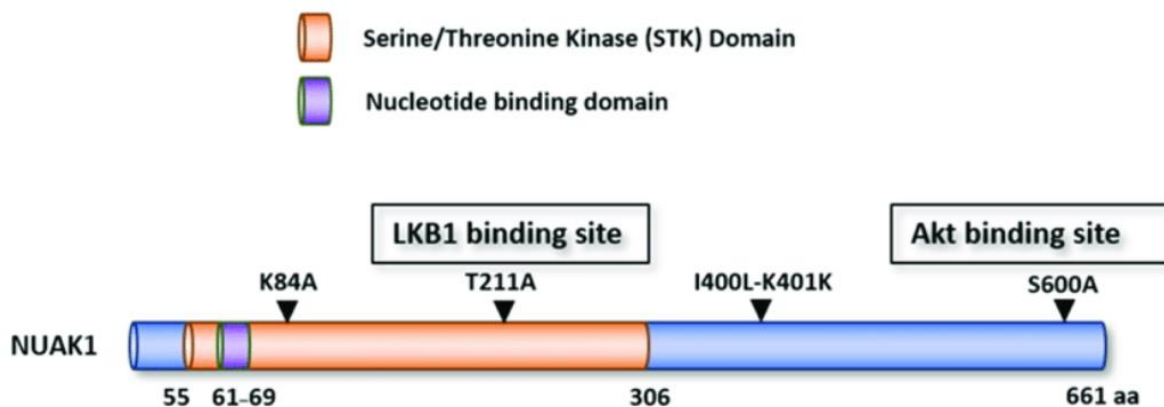


Figure 13. Représentation schématique de la protéine NUAK1 et de ses différents domaines. (Molina and Hong, 2021). NUAK1= NUAK family SNF1-like kinase 1 ; LKB1= Liver Kinase B1 ; Akt= protéine kinase B

On peut voir sur la figure ci-dessus (figure 13) qu'au sein de son domaine STK, la protéine NUAK1 possède un site de phosphorylation par la protéine LKB1. Ce site est celui qui sera directement impliqué dans la cascade métabolique que nous évoquerons ultérieurement, puisqu'il correspond à un site obligatoire d'activation de NUAK1. En

effet, en l'absence de phosphorylation, NUAK1 n'a pas d'activité catalytique (Banerjee et al., 2014) et est donc inactive.

Le rôle qui a été le plus étudié concernant cette kinase est son rôle dans le développement des cancers chez l'Homme. En effet, de nombreux cancers sont associés à une surexpression de NUAK1, comme par exemple les cancers du sein, les gliomes, les cancers du côlon ou les hépatocarcinomes (Escalona et al., 2020). Son expression dépend du stade du cancer concerné, et elle intervient dans la migration cellulaire, l'invasion des tissus, l'apparition de métastases, mais également dans la survie des cellules cancéreuses en les protégeant du stress oxydatif et métabolique. Ceci s'explique en partie par le fait que NUAK1 influe sur le métabolisme énergétique des cellules, notamment en agissant sur la chaîne respiratoire des mitochondries (Escalona et al., 2020).

b. Rôle spécifique dans le cadre du développement neuronal en association avec LKB1

Le rôle de NUAK1 dans le développement du cortex cérébral a été identifié dans une étude de 2013, grâce à des modèles de souris chez lesquels le gène *NUAK1* a été inactivé spécifiquement dans les neurones corticaux (Courchet et al., 2013).

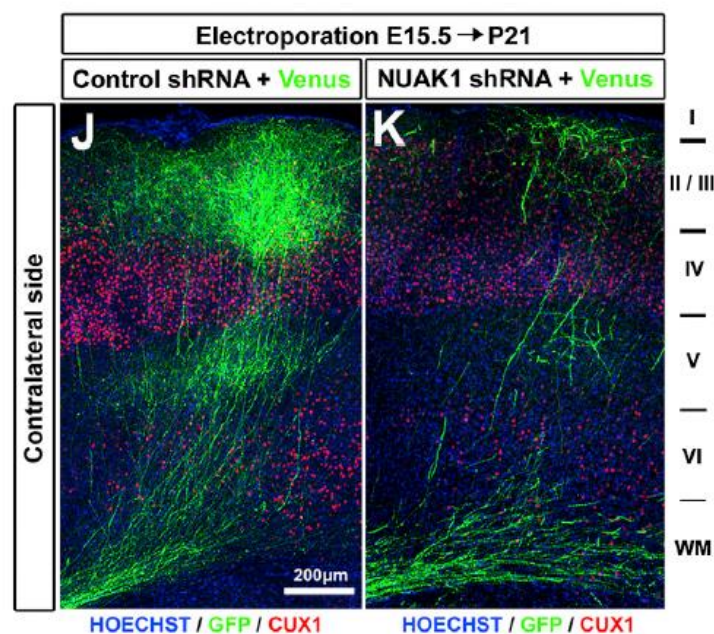


Figure 14. Marquage fluorescent des projections axonales controlatérales chez des souris contrôle ou déficientes en NUAK1. On constate que, à l'instar de LKB1, la perte de NUAK1 entraîne une diminution significative de la ramification axonale controlatérale (Courchet et al. 2013). NUAK1= NUAK family SNF1-like kinase 1 ; shRNA= Acide Ribonucléique short hairpin ; HOECHST, GFP et CUX1 correspondent à différents colorants

Le choix de se focaliser sur NUAK1 est lié à l'hypothèse que NUAK1 pourrait être l'effecteur de LKB1 dans le développement axonal. En effet, le gène *NUAK1* est très fortement exprimé dans le cortex cérébral, et la protéine NUAK1 étant activée par LKB1, il s'agissait d'une bonne candidate pour porter cette fonction. Ainsi, l'inhibition de *NUAK1* par différentes méthodes reproduit les mêmes anomalies de développement axonal que dans les souris mutées pour *LKB1*, comme reporté dans la figure 14 ci-dessus.

Sur un plan fonctionnel, NUAK1 agit en régulant le transport axonal des mitochondries, ce que l'étude de 2013 a montré par des méthodes de microscopie permettant de visualiser le déplacement des mitochondries dans des axones de neurones mis en culture. En inhibant NUAK1, ou en inhibant LKB1 (ce qui a pour effet d'empêcher l'activité de NUAK1), on observe que les mitochondries perdent leur capacité à s'arrêter aux boutons synaptiques (Courchet et al., 2013). Plusieurs études ont permis de corroborer que les mitochondries sont associées aux boutons synaptiques, et ce vraisemblablement pour permettre une maturation des synapses (Rossi and Pekkurnaz, 2019).

Les mitochondries remplissent plusieurs rôles, le plus connu étant la synthèse d'ATP. Les travaux énoncés ci-dessous suggèrent un modèle selon lequel NUAK1, en contrôlant le recrutement de mitochondries aux boutons synaptiques, permet de consolider l'activité des synapses en apportant de l'énergie localement, ce qui secondairement permettrait de stabiliser les branches axonales. Ce modèle est par ailleurs renforcé par l'observation que NUAK1 régule le métabolisme énergétique mitochondrial (Lanfranchi et al., 2020). Par conséquent, NUAK1 n'agit pas que sur la localisation des mitochondries, mais également sur leur activité, et l'action de NUAK1 est nécessaire pour le développement normal des connections corticales. La figure 15 ci-dessous montre le mécanisme d'action de cette protéine au cours de la spécialisation et de la ramification axonales.

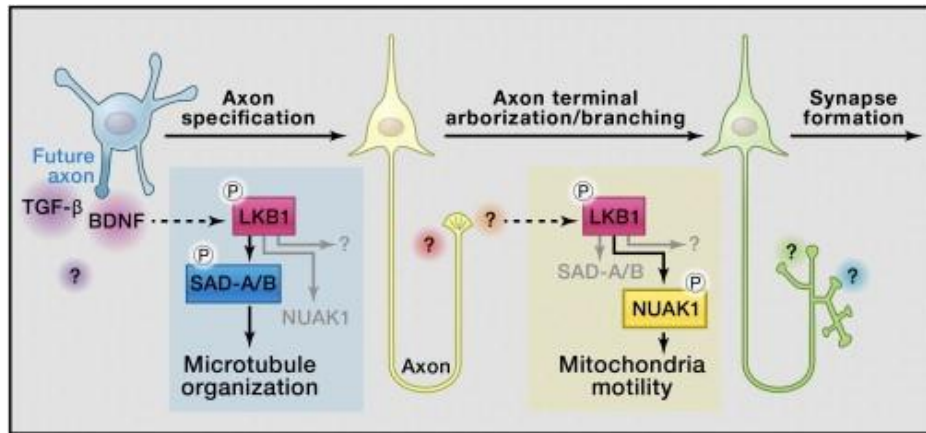


Figure 15. Schéma représentant la cascade de contrôle de la différenciation et de la ramification axonales (Sato and Arber, 2013). NUAK1= NUA family SNF1-like kinase 1 ; LKB1= Liver Kinase B1 ; TGF- β = Transforming Growth Factor β ; BDNF= Brain-Derived Neurotrophic Factor ; SAD-A/B= Stradalpha kinase

c. Mutations de NUAK1 et développement de troubles du spectre autistique

Si les résultats précédents démontrent que la protéine NUAK1 est nécessaire pour le développement normal du cortex, il n'y a en revanche pas de maladie associée à NUAK1 pour l'heure. Néanmoins, des mutations de NUAK1 ont été rapportées dans la littérature dans des maladies du neurodéveloppement telles que les troubles de l'attention et de l'hyperactivité (Alemany et al., 2015), l'hydrocéphalie (Vojinovic et al., 2018) ou la déficience cognitive (Johnson et al., 2016), et enfin les troubles du spectre de l'autisme (Iossifov et al., 2012).

Afin d'étudier le lien entre la protéine NUAK1 et les troubles du neurodéveloppement, Julien Courchet et son équipe ont étudié en 2018 les conséquences de la mutation d'un allèle de NUAK1 sur le développement cérébral et le comportement chez la souris. Le choix de n'inactiver qu'un seul des deux allèles mimait ce qui était présumé chez les patients, à savoir que les mutations rapportées sont des mutations dominantes (donc d'un seul allèle) et qui aboutissent vraisemblablement à une inactivation de la protéine. L'étude de 2018 a permis de démontrer, dans un premier temps, l'haploinsuffisance de NUAK1, c'est-à-dire que la perte d'un des deux allèles n'est pas compensée par l'allèle restant (Courchet et al., 2018). Les souris hétérozygotes (HET) pour Nuak1 présentaient un retard de croissance, ainsi qu'un élargissement important des ventricules latéraux, accompagné d'un amincissement du cortex le long de son axe radial, tout en conservant des volumes de l'hippocampe et

du striatum similaires (Courchet et al., 2018). Ceci suggère que, même si les souris sont viables, Nuak1 est haploinsuffisant au regard de ses fonctions dans le développement de l'encéphale (voir figure 16 ci-dessous).

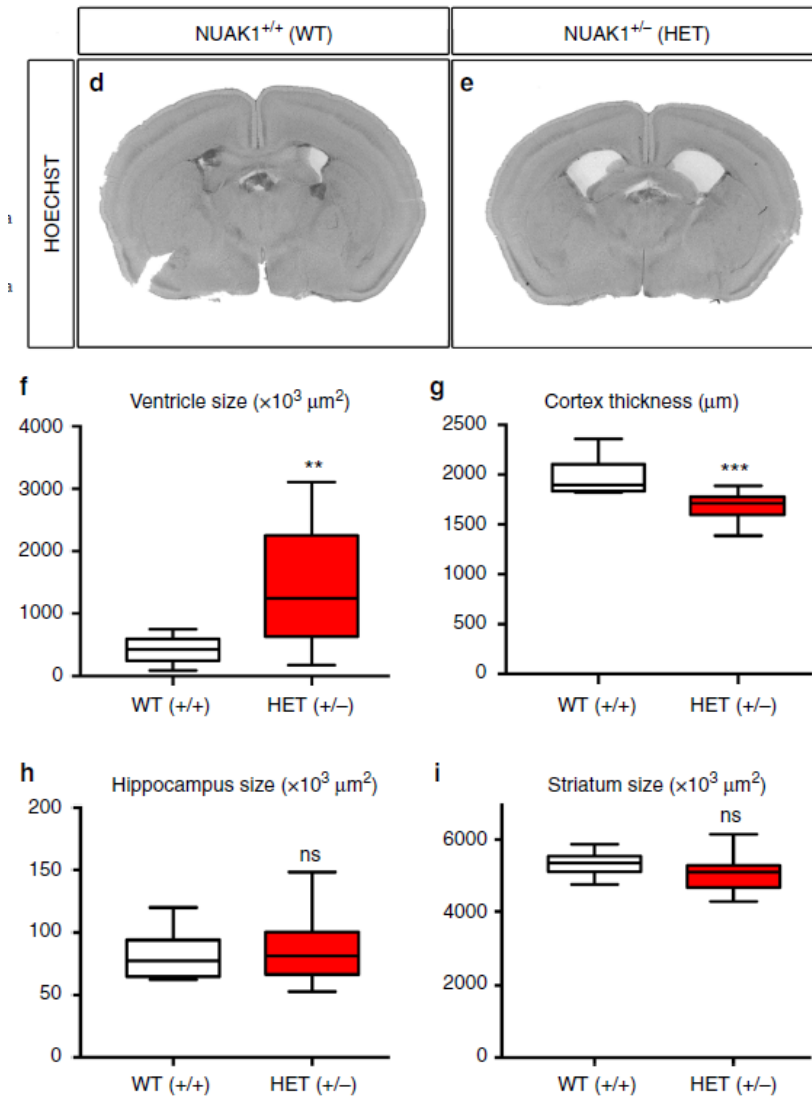


Figure 16. Comparaison de coupe histologique d'encéphale et de taille de différentes parties de celui-ci chez des souris wt ou HET. On constate une différence de proportion des différents organes, suggérant que chez ces individus, NUA1 est haploinsuffisant en NUA1 (Courchet et al., 2013). WT= Wild Type ; HET= hétérozygote ; NUA1= NUA1 family SNF1-like kinase ; HOECHST est un colorant utilisé au cours de l'expérience.

Des tests comportementaux ont ensuite été mis en œuvre, afin de déterminer si les souris hétérozygotes présentaient des altérations de certains de leurs comportements. Alors que les fonctions sensorielles n'étaient pas altérées (aucune atteinte de la vision et de l'olfaction), les résultats ont montré une altération de la mémoire à court et à long terme. De plus, les souris HET ont également montré un déficit pour la préférence

sociale (voir figure 17 ci-dessous), qui teste la capacité d'une souris à discriminer le familier et la nouveauté dans un contexte social. Ces résultats montrent que les souris portant une mutation d'un allèle de Nuak1 ont des anomalies anatomiques et comportementales compatibles avec un rôle de Nuak1 dans les TSA.

Or, ces types de déficits sont ceux que l'on retrouve chez les individus atteints de troubles du spectre autistique, renforçant l'hypothèse d'un lien entre une mutation de NUA1 et le développement de TSA chez une personne. Une analyse fonctionnelle a ensuite été menée afin d'étudier une mutation de NUA1 associée aux TSA.

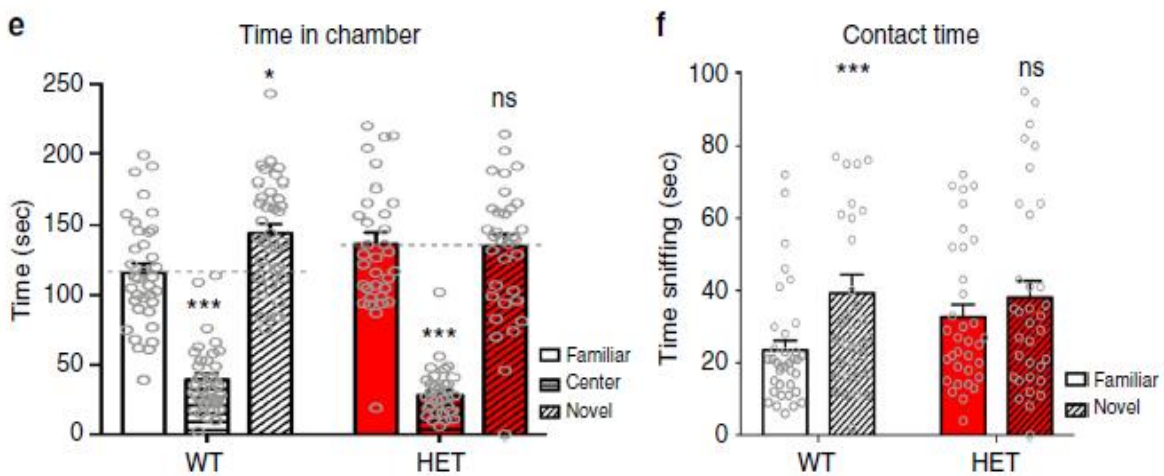


Figure 17. Graphes présentant le temps passé par les souris dans les différentes chambres, selon la présence de nouveautés ou non. On constate, dans le premier graphe, que les souris hétérozygotes pour le gène NUA1 passe plus de temps dans la pièce familière que les souris WT. Dans le deuxième graphe, on constate que ces mêmes souris ont également moins tendance à préférer le contact avec les nouveaux individus. (Courchet et al., 2018). HET= hétérozygote ; WT= Wild Type.

A présent, le gène NUA1 est considéré comme un facteur de risque aux troubles de l'autisme dans la base de données SFARI gene (la plus grande base de données répertoriant les gènes associés aux TSA).

IV. Identification et mise en évidence d'un effet thérapeutique de la L-carnitine dans le contexte des troubles neuropsychiatriques

1. Structure et fonction de la L-carnitine

Structure de la molécule

La L-carnitine (acide 3-hydroxy-4-triméthyl-amino-butérique, voir figure 18 ci-dessous) est la forme lévogyre de la carnitine, qui est le seul stéréoisomère des deux

à être naturel et biologiquement actif (Martens, 2009). Il s'agit d'un ammonium quaternaire. C'est une molécule que l'on retrouve en majeure partie (95%) dans le myocarde et le muscle squelettique.

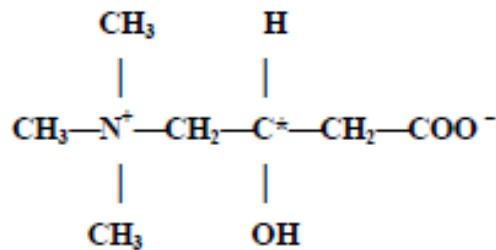


Figure 18. Forme semi-développée de la molécule de L-carnitine (Martens, 2009)

a. Transport et élimination de la L-carnitine

Chez l'Homme, la L-carnitine possède une origine exogène (apport alimentaire, représentant 75% de la carnitine de l'organisme) et endogène, où la synthèse est réalisée au niveau du foie et du rein (Bremer, 1983). Celle-ci débute par la méthylation de la lysine en triméthyllisine, elle-même convertie en butyrobétaine. Enfin, cette dernière est hydroxylée en L-carnitine.

La L-carnitine est ensuite distribuée aux autres organes via la circulation sanguine. Elle n'est pas liée aux protéines plasmatiques lors de son transport.

Etant donné que la plupart des organes et tissus possèdent une concentration en L-carnitine plus importante que la concentration sanguine, l'acheminement de cette molécule nécessite la présence de transporteurs pour la déplacer contre son gradient de concentration (Martens, 2009). Celui qui est principalement impliqué dans ce transport ainsi que dans la réabsorption tubulaire de carnitine est le OCTN2 (carnitine Organic Cation Transporter) (Longo et al., 2016).

Une précédente étude réalisée en 2009 fait état de la pharmacocinétique de la L-carnitine chez le sujet sain et hémodialysé (Martens, 2009). Chez un sujet sain, l'étude rapporte un taux sanguin de carnitine maximum environ 4 heures après ingestion, avec une demi-vie moyenne de distribution se situant autour de 3 heures. Elle rapporte également que le taux de carnitine à 24 heures post-ingestion est significativement supérieur à celui évalué à T_0 , montrant que la molécule n'est pas totalement éliminée par l'organisme après 24 heures, la demi-vie moyenne apparente d'élimination étant

de 17 heures. L'auteur rapporte également qu'un taux sérique stable de carnitine est obtenu après 3 jours de traitement à base de deux prises orales par jour.

L'étude évalue également la distribution de la L-carnitine après injection intraveineuse lente (sur 5 minutes) à une dose de 30 mg/kg (voir figure 19 ci-dessous). On constate que la concentration est bien plus élevée dans les 4 premières heures après une injection IV, mais qu'elle atteint les mêmes valeurs que pour la prise orale à partir de 6 heures. Ces résultats sont similaires, que ce soit pour la carnitine libre ou totale (ce qui est cohérent avec le fait que celle-ci soit peu liée aux protéines plasmatiques, comme nous l'avons vu précédemment).

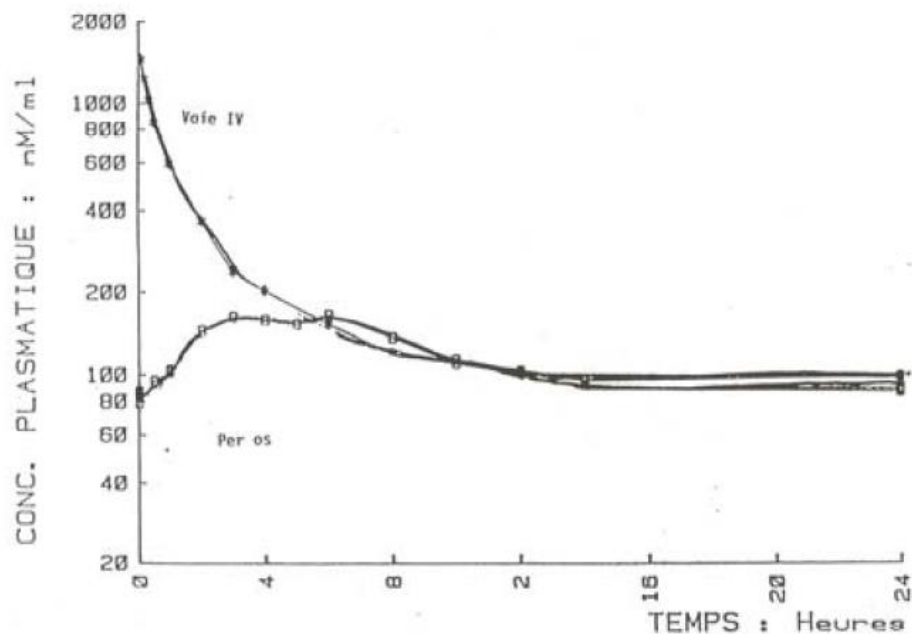


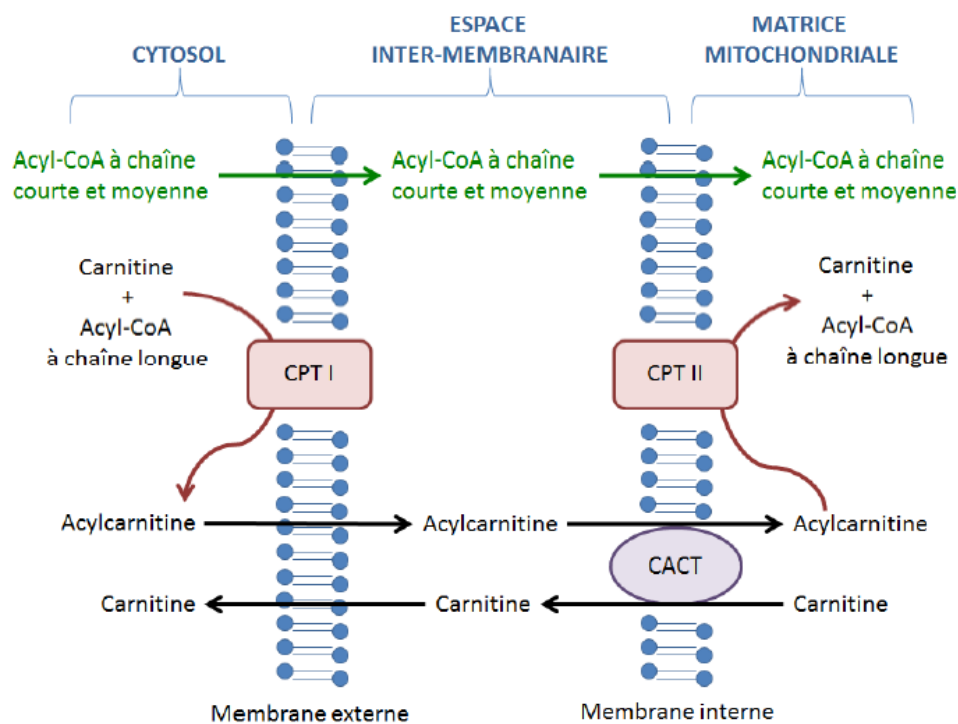
Figure 19. Evolution de la concentration (en nM/mL) de carnitine libre après injection IV lente ou prise orale chez le sujet sain (Martens, 2009). IV= intra-veineuse

Cette étude a également permis d'évaluer la biodisponibilité systémique de la L-carnitine à la suite d'une administration orale : celle-ci évolue entre 5 et 16% selon les individus. Une autre étude situe cette biodisponibilité entre 14 et 18% (Rebouche, 2004), et entre 54 et 87% pour la L-carnitine contenue dans l'alimentation. L'administration par injection intraveineuse reste cependant deux fois plus efficace, puisque 3 injections à la dose de 20 mg/kg en une semaine permettent d'apporter deux fois plus de L-carnitine chez un patient que la prise PO de 1g de L-carnitine deux fois par jour sur la même période. Cependant, il est possible d'augmenter les doses de la prise orale puisque l'index thérapeutique de cette molécule est grand.

Afin d'obtenir des concentrations sériques plus importantes, il semble que la durée de traitement soit décisive. En effet, une concentration de 90 $\mu\text{mol/L}$ peut être obtenue après 60 jours de traitement à 990 mg/j par voie orale, contre 70 $\mu\text{mol/L}$ pour un traitement de 30 jours à la même dose et moins de 60 $\mu\text{mol/L}$ pour un traitement de 2 jours (Martens, 2009).

L'excrétion de cette molécule est principalement rénale, le reste de la quantité de carnitine exogène étant assimilée par les tissus où elle permet le métabolisme des acides gras au sein des mitochondries (Al-Dhuayan, 2023). Sa clairance rénale est très élevée (1 à 3 mL/min) du fait de son absence de liaison à des protéines plasmatiques (Rebouche, 2004). (Zhao, 2020)

b. Fonctions connues au sein de l'organisme



CPT : Carnitine palmitoyl transférase ; CACT : carnitine acylcarnitine translocase

Figure 20. Mécanismes de transport des acides gras à chaîne longue au sein de la mitochondrie et rôle de la carnitine (Zhao, 2020).

De nombreuses études ont permis de caractériser les différentes fonctions de la L-carnitine au sein de l'organisme. L'un des rôles fondamentaux de cette molécule est le transport des acides gras à chaîne longue à travers la membrane interne des

mitochondries (Martens, 2009). Ces acides gras sont tout d'abord transformés en acyl-coA par l'acyl-coA synthase.

Une réaction d'estérification de la carnitine avec cet acyl-coA permet la formation d'acylcarnitine au moyen de l'enzyme CPT1 (Carnitine Palmitoyl transférase), qui est située sur la membrane externe des mitochondries (Zhao, 2020) (Houten and Wanders, 2010) (voir figure 20 ci-dessus).

Ensuite, une fois dans l'espace intermembranaire, l'acylcarnitine est transportée dans la matrice mitochondriale grâce à la CACT (Carnitine Acylcarnitine translocase), en échange d'une carnitine libre présente dans la mitochondrie. Elle est enfin de nouveau dissociée en acyl-coA + carnitine grâce à la CPT2 (Carnitine Palmitoyl transférase). L'acyl-coA à chaîne longue ainsi obtenu peut entrer dans le processus de β -oxydation, menant in fine à la formation d'ATP (voir figure 1).

La L-carnitine permet également de transporter les fragments acylés issus de la β -oxydation hors des mitochondries et des peroxysomes, autrement dit sert à la détoxification de métabolites potentiellement toxiques (notamment des dérivés d'acyl-coA à courte et moyenne chaîne issus d'une β -oxydation incomplète).

De plus, cette molécule permet de moduler les rapports de concentration acyl-coA/coA et acétyl-coA/coA libre au sein des cellules, étant le seul moyen de transport permettant de traverser les membranes mitochondriales.

Au sein des muscles squelettiques, elle permet de réguler la part des différentes sources oxydatives dans le débit énergétique, notamment en augmentant la β -oxydation des acides gras pour réduire l'utilisation des réserves glycolytiques.

La L-carnitine possède également d'autres rôles dans l'organisme, que nous ne détaillerons pas ici, tels que le contrôle de la cétogenèse et du pool de glucides, ou encore la protection des membranes phospholipidiques, mais possède aussi un rôle au sein du métabolisme cardiaque, hépatique et cérébral.

c. Indications actuelles d'utilisation chez l'Homme, contre-indications et effets secondaires potentiels

Actuellement, la L-carnitine est commercialisée sous forme buvable (ampoules contenant 1g de L-carnitine) ainsi que sous forme injectable (Dictionnaire Vidal, 2001). Elle est indiquée en cas de « déficits primaires systémiques ou musculaires en L-carnitine, déficits secondaires aux aciduries organiques et déficits de la bêta-oxydation des acides gras ». La voie orale est privilégiée, sauf en cas de troubles digestifs tels qu'une intolérance alimentaire ou une diarrhée sévère, de mise à jeun avant ou après une intervention chirurgicale, ou en cas de réanimation ou décompensation aiguë.

Il a été démontré que cette molécule pouvait causer une hypoglycémie chez des patients diabétiques sous insuline ou médicaments hypoglycémisants, dans ce cas un suivi rapproché de la glycémie est indiqué (Adeva-Andany et al., 2017). En parallèle, une administration concomitante de ce médicament et d'antivitamines K provoque une augmentation du rapport normalisé international (INR, mesure réalisée pour surveiller la coagulation sanguine d'un patient), ce qui nécessite également une surveillance rapprochée (Vidal 2001).

Concernant l'administration chez une femme enceinte (méthode d'administration que nous évaluons au cours de ce projet), les études effectuées sur des espèces telles que le rat et le lapin n'ont montré aucun effet tératogène. Cependant, l'administration de cette molécule à la dose la plus élevée décrite (c'est-à-dire 600 mg/kg/j) entraînerait une augmentation significative du risque de pertes post-implantatoires de l'embryon, mais aucune étude clinique n'existe chez l'Homme à l'heure actuelle. Ainsi, la prescription de L-carnitine chez une femme enceinte n'est envisagée que si le risque encouru par le fœtus est inférieur au bénéfice obtenu pour la mère. Le même principe est appliqué pour l'administration de L-carnitine chez une femme allaitante. Aucun effet sur la fertilité n'a pour l'instant été rapporté.

2. Intérêt et rôle de la L-carnitine dans le contexte des troubles neuropsychiatriques

a. Définition et catégorisation des troubles neuropsychiatriques étudiés

Les troubles que nous avons étudiés au sein de ce projet sont les Troubles du Spectre Autistique (TSA). D'après la synthèse de recommandation de bonne pratique de la Haute Autorité de Santé, il s'agit de l'un des troubles neurodéveloppementaux (TND). Les critères diagnostiques ont été actualisés par le DSM-5, qui est la dernière édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux.

Ces critères sont définis dans deux dimensions symptomatiques qui sont :

- les déficits persistants de la communication et des interactions sociales observés dans différents contextes ;
- le caractère restreint et répétitif des comportements, des activités ou des intérêts.

Cette définition peut être complétée par un niveau de sévérité selon le niveau de l'aide requise.

Les TSA ne constituent pas une maladie, mais plutôt un ensemble de maladies dont l'hérédité est importante. En effet, même si les facteurs environnementaux jouent un rôle dans le développement des TSA, les facteurs génétiques sont majoritaires (Thapar and Rutter, 2021). Les gènes impliqués sont nombreux, et on en compte plus de 140 qui sont identifiés à ce jour, qui entraînent une vulnérabilité à l'autisme lorsqu'ils sont seuls ou combinés ("Autisme, la piste génétique," 2019). Dans seulement 20 à 30% des cas, l'autisme est associé à la mutation d'un gène connu. Ainsi, de nombreux gènes impliqués dans les TSA continuent d'être découverts encore aujourd'hui. Ils peuvent à la fois être en lien direct avec la maladie ou avoir un effet indirect sur l'un des symptômes associés à l'autisme, comme la déficience intellectuelle. Il faut cependant garder en tête que les TSA sont fortement multigéniques, et qu'un grand nombre de polymorphismes dans des gènes non répertoriés comme étant associés à l'autisme peuvent donner des troubles de type autistique lorsqu'ils sont combinés.

Les premiers signes apparaissent le plus souvent avant les 3 ans de l'enfant, et sont présents ensuite tout au long de sa vie. Aux Etats-Unis, une étude a permis de montrer qu'un enfant sur 36 était atteint de la maladie (Maenner, 2023). Cependant, il est

difficile d'interpréter de tels chiffres devant la diversité de symptômes qui peuvent être observés dans de tels troubles.

b. Mise en contexte de l'utilisation de la L-carnitine dans le cadre des TSA

De précédentes études ont pu montrer l'intérêt de l'utilisation de la L-carnitine dans le traitement de différentes affections. Il a notamment été montré que cette molécule possédait un effet thérapeutique prometteur dans le cadre de certaines maladies neurodégénératives, en réduisant la neurotoxicité présente dans certaines lignées cellulaires (Gyawali et al., 2021). Une autre étude a permis également de démontrer son intérêt dans la protection des cellules face à des lésions ischémiques (Zanelli et al., 2005). Enfin, une étude a permis également de démontrer l'intérêt de l'utilisation de cette molécule dans le cadre de divers troubles du neurodéveloppement, tels que l'hypoxie-ischémie, des lésions traumatiques de l'encéphale et la maladie d'Alzheimer. Ceci est permis par la capacité de la L-carnitine à améliorer le métabolisme énergétique, réduire le stress oxydatif et prévenir la mort cellulaire au sein de différents modèles (lésions cérébrales néonatales, pédiatriques ou chez des adultes) (Ferreira and McKenna, 2017).

Les avantages inhérents à l'utilisation de cette molécule sont :

Premièrement, elle ne présente pas de toxicité dans les doses utilisées et est déjà utilisé en médecine humaine chez les nourrissons afin de traiter des désordres métaboliques ou des carences en carnitine.

Elle est adaptée à une administration orale.

Son utilisation a été approuvée dans le cadre de la médecine vétérinaire.

Ces éléments en font une molécule adaptée à notre étude.

c. Mise en évidence de son rôle de restauration de ramification des axones

Dans une étude réalisée en 2020, Julien Courchet et son équipe ont mis en évidence le rôle spécifique de la L-carnitine dans le cadre d'une mutation du gène NUAK1, liée au développement de TSA (voir III.).

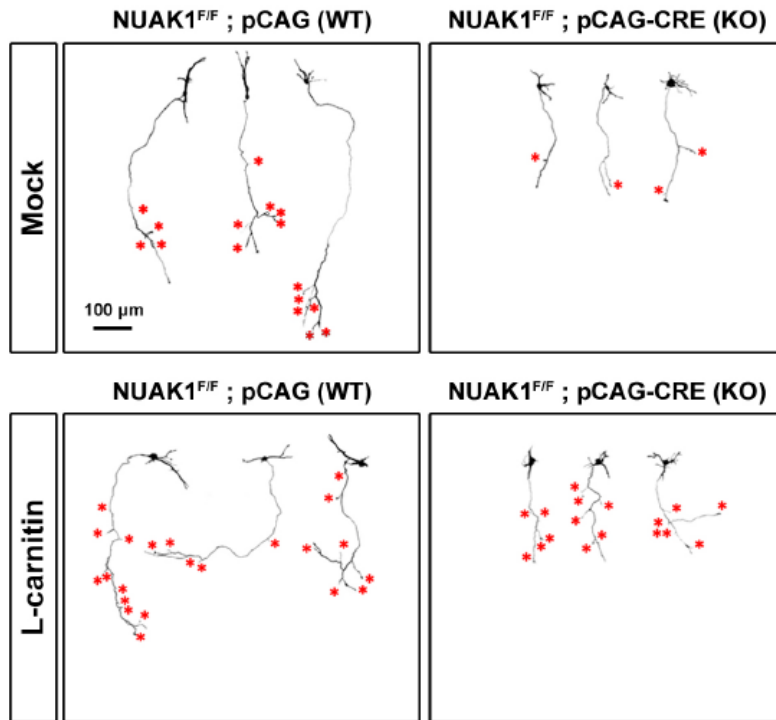


Figure 21. Images de neurones corticaux de génotype *NUAK1 F/F* et ayant subi une électroporation avec un plasmide contrôle ou exprimant la protéine *Cre*. Les étoiles rouges indiquent les emplacements de branches collatérales (Lanfranchi et al. 2020). *NUAK1*= *NUAK family SNF1-like kinase* ; *pCAG* correspond au plasmide contrôle utiliser ; *KO*= *Knock-Out*.

Pour ce faire, ils ont procédé à un *KO (Knock-Out)* de *NUAK1* sur des neurones pyramidaux *in vitro*, qui possédaient ainsi des axones plus courts et présentaient un nombre réduit de ramifications. En ajoutant de la *L-carnitine* au milieu de culture, cela a permis de normaliser le nombre de ramifications sans affecter la longueur des axones (voir figure 21 ci-dessus).

Parallèlement, l'addition de *L-carnitine* au contrôle n'a eu aucun effet sur la ramification axonale. Ensuite, afin de confirmer que cette molécule avait un effet bénéfique sur la fonction mitochondriale, des mesures du potentiel de la membrane interne des mitochondries ont été menées, permettant de mettre en évidence une normalisation de ce potentiel dans les neurones *NUAK1 KO* traités avec de la *L-carnitine* (voir figure 22 ci-dessous).

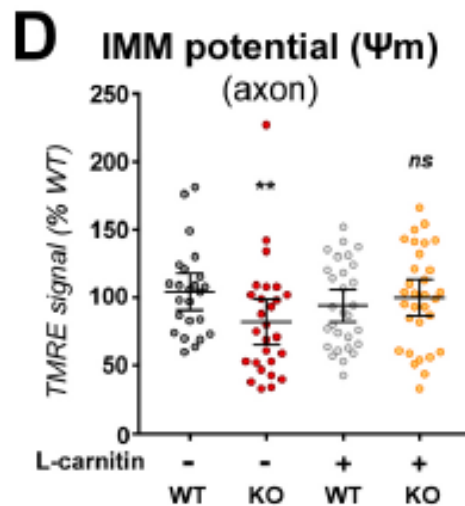


Figure 22. Mesure du potentiel membranaire interne des mitochondries, au sein de neurones contrôles ou déficients en NUA1, traités ou non avec de la L-carnitine. On constate une normalisation de ce potentiel avec le traitement (Lanfranchi et al., 2020). WT= Wild Type ; KO= Knock-Out ; IMM : Internal Mitochondrial Membrane ; TMRE= Tetramethylrhodamine (colorant utilisé pour la quantification des potentiels de membrane).

Des manipulations expérimentales ont également été réalisées in vivo afin de confirmer les résultats obtenus in vitro. Des croisements avec des souris de lignée Nex^{CRE} ont permis d'obtenir une inactivation sélective de NUA1 dans le télencéphale dorsal, afin d'induire une délétion spécifique du cortex, post-mitotique dans tous les neurones corticaux pyramidaux. Cette inactivation sélective entraînait une diminution des ramifications dans l'hémisphère controlatéral, au sein des couches 2/3 (Courchet et al., 2018). Les souris de l'étude ont été traitées avec de la L-carnitine via l'eau de boisson à partir de la détection de leur gestation. Ce traitement a été poursuivi chez les souriceaux jusqu'à P21. Pour observer les résultats, les neurones étaient marqués avec une protéine fluorescente (m-Scarlet-I). Ces manipulations ont mis en évidence une diminution de la ramification axonale chez les souris KO, comparées au contrôle (voir figure 23 ci-dessous). Cependant, les souris traitées présentaient des ramifications axonales similaires au contrôle, ce qui, couplé à une quantification des projections axonales, montre bien que la régulation à la hausse du métabolisme mitochondrial par la L-carnitine suffit à restaurer une ramification axonale normale chez des souris déficientes en NUA1.

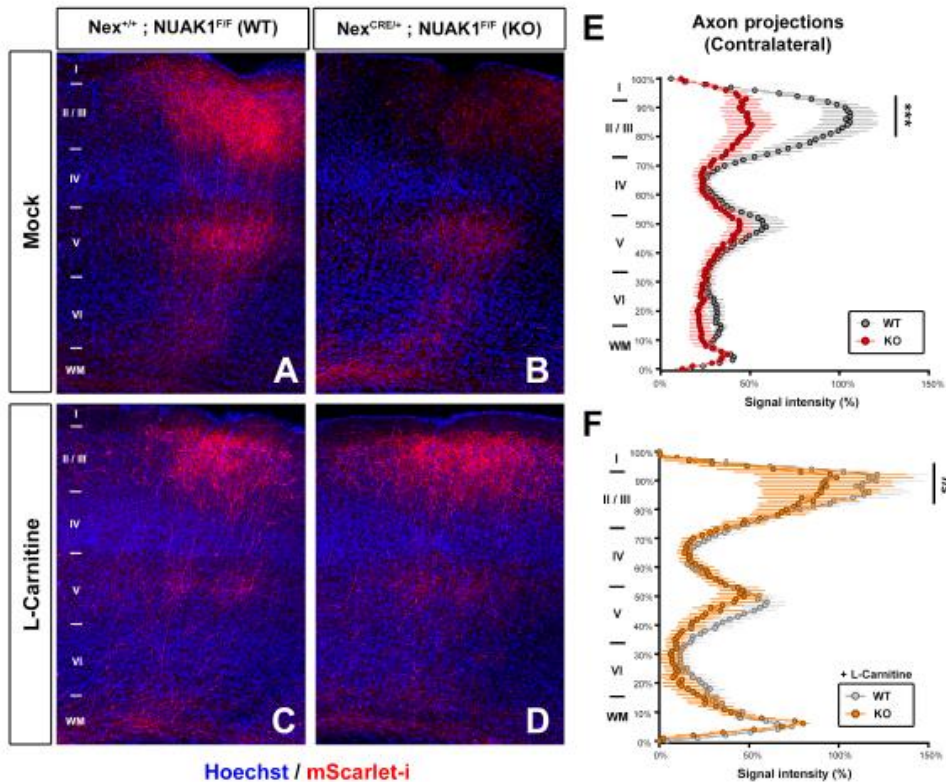


Figure 23. Images de projections axonales controlatérales chez des souris contrôle, déficientes en NUAK1 et traitées ou non à la L-carnitine. Les deux graphes de droite présentent une mesure quantitative du signal émis par ces axones, permettant de mettre en évidence la restauration permise par la L-carnitine (Lanfranchi et al. 2020). WT= Wild Type ; KO= Knock-Out ; NUAK 1= NUAK family SNF1-like kinase.

Pour donner suite à la démonstration des effets bénéfiques de la L-carnitine dans le cadre des troubles du neurodéveloppement, il nous a fallu déterminer un cadre expérimental pour l'étude de la pharmacocinétique de cette molécule, afin de pouvoir affiner la proposition thérapeutique chez l'Homme.

V. Cadre expérimental de l'étude et réglementations en vigueur

1. Pertinence du choix d'un modèle murin pour l'expérimentation

Le choix d'une procédure *in vivo* s'explique par le fait que l'analyse d'une distribution de molécule implique la totalité de l'organisme (absorption intestinale, distribution par voie sanguine, stockage dans les différents organes). Nous avons choisi de réaliser l'étude chez la souris, car c'est un modèle animal adapté aux objectifs de l'étude : d'une part, car l'architecture cérébrale de cet animal est proche de celle de l'Homme,

malgré le fait que celui-ci soit bien plus gros que celui de la souris (1 kilogramme en moyenne contre 1 gramme) d'autre part car des modèles d'étude des troubles du spectre autistique ont été caractérisés dans cette espèce. De plus, les résultats des études précédentes sur l'effet de la L-carnitine présentés dans la Partie 1 ont également été obtenus chez la souris. Il convient donc de mener la suite des expérimentations sur la même espèce, étant donné que les données de biodistribution peuvent être variables d'une espèce à l'autre et qu'il serait impossible d'interpréter des données issues d'une autre espèce.

La souris est régulièrement utilisée comme modèle pour l'étude de pathologies cérébrales chez l'Homme, en raison des similitudes que leur encéphale présente avec le nôtre. Afin d'obtenir des mesures exploitables et extensibles à l'espèce humaine, il faut également que le fonctionnement neuronal et cérébral soit similaire. Il s'avère qu'en effet, l'organisation cellulaire cérébrale est conservée entre l'Homme et la souris, et que des altérations génétiques affectant l'encéphale entraînent généralement des conséquences fonctionnelles que l'on peut transposer à l'espèce humaine. De manière plus précise en ce qui concerne notre sujet d'étude, les unités neuronales affectées lors de TSA sont similaires, et ne présentent que des différences quantitatives et non qualitatives (taille des structures, nombre de neurones etc.).

Il est essentiel à l'heure actuelle d'obtenir des résultats concernant les TSA et les options thérapeutiques disponibles chez l'animal avant de pouvoir passer à des études cliniques chez l'Homme. Tout d'abord, étudier les mutations génétiques et les autres facteurs responsables du développement de ces troubles nous permettrait d'améliorer le diagnostic chez l'Homme, notamment de le rendre plus précoce, ainsi que d'améliorer le conseil apporté aux familles touchées. Cela nous permettrait de comprendre également plus précisément les mécanismes d'action des molécules considérées efficaces d'un point de vue thérapeutique, d'établir des modalités d'administration et des posologies, ce afin de pouvoir améliorer les solutions thérapeutiques, peu nombreuses et insuffisantes jusqu'alors.

2. Réglementations en vigueur concernant l'expérimentation animale

En France, l'expérimentation animale est soumise à des réglementations spécifiées dans la directive européenne n°2010/63/UE révisant la directive

n°86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986. Cette directive est applicable en France depuis le 1^{er} janvier 2013. Les principes constituant cette réglementation sont les suivants : tout d'abord, une expérience qui entraîne une souffrance de n'importe quelle sorte chez un vertébré n'est autorisée que si elle est nécessaire, et qu'aucune autre alternative n'est disponible. Les animaux utilisés pour les expérimentations ne doivent pas faire partie d'une espèce protégée et doivent être acquis au sein d'établissements d'élevage agréés. Ensuite, la ou les personnes amenées à conduire les expérimentations doit posséder une autorisation spécifique d'une espèce et d'une procédure expérimentale précise, obtenue auprès du ministère de l'Agriculture. Pour ce faire, ces personnes doivent avoir suivi une formation initiale en biologie complétée d'une formation spécifique en expérimentation animale. Lors des manipulations, les animaux doivent être placés sous surveillance régulière dans des lieux agréés par le ministère et respecter les conditions de vie spécifiques de chaque espèce.

Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique car satisfaisait aux exigences citées plus haut.

PARTIE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Choix des animaux et de la L-carnitine

1. Animaux utilisés pour l'étude

Les animaux utilisés pour l'étude étaient des souris (*Mus musculus*) femelles adultes C57BL/6Rj, âgées de 90 à 120 jours (voir figure 24 ci-dessous). Ces souris sont d'un fond génétique consanguin, qui a été choisi car il s'agit du même fond génétique que les souris knockout pour Nuak1 utilisées dans l'étude précédente, ce qui permet d'étudier la biodistribution de la L-carnitine dans un modèle pertinent. Il s'agit par ailleurs d'un modèle de souris polyvalent utilisé dans de nombreux domaines d'application dans la recherche, ce qui augmente la portée de notre étude. Ces animaux proviennent d'un établissement d'élevage agréé pour fournir des animaux destinés à la recherche médicale en France, Janvier labs.

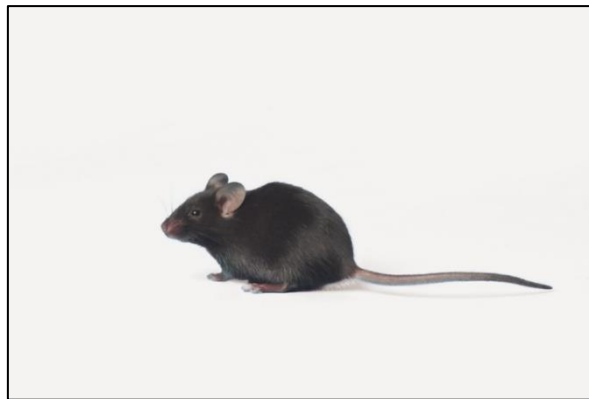


Figure 24. Modèle de souris C57/Bl6. Source : fiche technique de Janvier labs. Ce modèle permet l'expression d'un grand nombre de mutations, ce qui explique son utilisation dans de nombreux domaines, notamment comme ici dans les domaines des maladies métaboliques et des neurosciences.

Les animaux ont été livrés à l'animalerie (module 'Imthemat' rattaché à l'EU SCAR) et ont eu une période d'acclimatation de 7 jours avant le début des manipulations, ce afin de réduire le stress associé. Les souris étaient réparties en trois cohortes : une cohorte de souris adultes non gestantes destinées à recevoir la L-carnitine par voie intraveineuse, une cohorte de souris également non gestantes destinées à recevoir la

L-carnitine par voie orale et enfin, une cohorte de souris gestantes pour laquelle des mesures ont également été effectuées sur les fœtus. Concernant l'expérience consistant à injecter la L-carnitine par voie intraveineuse sur souris adultes non gestantes, 3 souris ont été utilisées par temps de dissection (c'est-à-dire mises à mort et disséquées), et 2 souris au total pour le suivi longitudinal par imagerie (voir schémas décrivant les différentes expériences dans la partie II. ci-dessous, figures 25, 26 et 27). Ensuite, lors de l'expérience consistant à administrer la L-carnitine par voie orale aux souris adultes non gestantes, 4 souris ont été utilisées aux temps T+1h, T+2h et T+4h et 3 souris au temps T+24h, et 2 souris au total ont servi à l'acquisition d'images au scanner. Enfin, lors de l'expérience consistant à injecter la L-carnitine par voie intraveineuse aux souris gestantes, 3 souris et leur portée (comportant entre 6 et 10 fœtus) ont été utilisés par temps, et 2 fœtus par temps ont été utilisés pour l'acquisition d'images puis mis à mort et disséqués. Ceci représentait un total de 102 adultes pour la totalité des manipulations. Le choix de trois animaux par temps d'étude pour l'analyse quantitative correspondait au nombre minimum d'individus permettant de faire une étude statistique des différences entre organes. Ce nombre a été réduit pour l'imagerie en raison du temps accordé à l'acquisition d'images pour chaque souris. Concernant la procédure visant à l'étude du passage de la L-carnitine à travers la barrière placentaire, 96 fœtus de 15 jours ont été utilisés. Cet âge correspondait à une étape critique du développement cérébral et à laquelle nous suspectons un effet thérapeutique de la L-carnitine. La radioactivité a été mesurée sur chaque fœtus afin d'obtenir un total de radioactivité transmise sur la portée entière.

2. L-carnitine

La L-carnitine utilisée pour les différentes manipulations provenait de chez Sigma-Aldrich. Afin de pouvoir suivre sa distribution dans l'organisme et de pouvoir effectuer les dosages, nous avons utilisé un isotope radioactif utilisé régulièrement en médecine nucléaire dans le cadre de scintigraphies ou d'imagerie médicale : le Technétium 99 métastable. Celui-ci a été obtenu sous forme de pertechnétate de sodium injectable (ELUMATIC III 2-20 GBq générateur radiopharmaceutique). La L-carnitine marquée a été préparée immédiatement avant chaque série de manipulations car la demi-vie radioactive de cet isotope est de 6 heures. Chaque seringue contenait entre 80 et 120 MBq, correspondant à 100 ng de L-carnitine par souris. La dose choisie a été calculée

de sorte à optimiser la visualisation des résultats à l'imagerie et maximiser les chances d'obtenir des valeurs détectables au comptage.

Le marquage de la L-carnitine a été effectué selon le protocole suivant :

- Dissolution d'1 mg de L-carnitine dans de l'eau distillée désoxygénée
- Dissolution de 10 mg de SnCl₂ dans de l'eau distillée désoxygénée
- Prendre 6µL de la solution de L-carnitine, ajouter 10µL de solution de SnCl₂ et 2mL de PBS 1X
- Transférer cette préparation dans une fiole à vide au moyen d'une seringue
- Ajouter 200 à 300 MBq de ^{99m}Tc
- Laisser reposer la préparation 30 minutes à température ambiante

Ensuite, les différentes seringues destinées à l'administration PO ou IV ont été préparées et conservées dans un récipient plombé.

3. Mesures de sécurité au cours des manipulations

Les différentes manipulations impliquant un contact avec des émissions radioactives, des précautions spécifiques ont été mises en œuvre au cours des différentes procédures. Chaque opérateur devait être muni de l'équipement suivant : blouse intégrale, gants en nitrile, masque, charlotte, surchaussures, manchons et lunettes. Un tablier en plomb était également obligatoire lors des manipulations d'animaux radioactifs. Un dosimètre permettait d'attester d'une exposition sans risque à la radioactivité.

II. Manipulations et paramètres étudiés

1. Procédures effectuées

Comme nous l'avons spécifié dans la partie I., notre étude était subdivisée en 3 expériences distinctes : injection de la L-carnitine par voie intraveineuse (voir figure 25 ci-dessous), administration de la L-carnitine par voie orale (voir figure 26 ci-dessous), et enfin injection de la L-carnitine par voie intraveineuse chez les souris gestantes (voir figure 27 ci-dessous). Les deux premières nous ont permis d'obtenir des valeurs de base, nécessaires à l'interprétation des résultats de la troisième procédure (dans

laquelle la détection et le suivi de la L-carnitine étaient plus difficiles). Concernant l'expérience avec gavage, le temps 10 minutes a été supprimé car il n'était pas pertinent, au vu de la durée du transit de la souris.

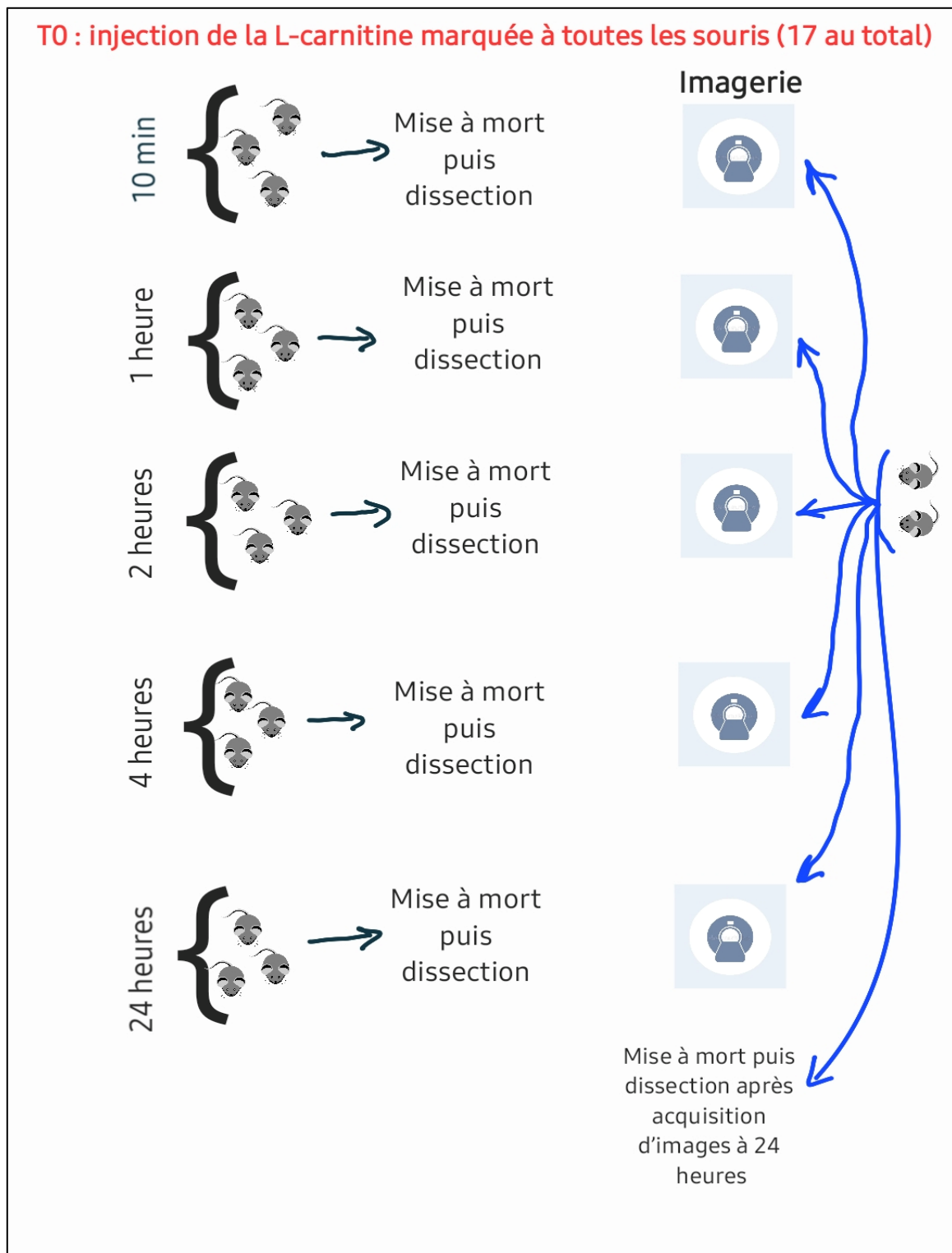


Figure 25. Schéma représentant le principe de la première expérience, à savoir l'injection de L-carnitine en IV chez les femelles non gestantes. Concernant l'imagerie, les 2 mêmes souris ont servi à l'acquisition des images pour tous les temps, puis mises à mort et disséquées après l'acquisition d'images au temps 24 heures.

T0 : administration PO de L-carnitine marquée à toutes les souris (21 au total)

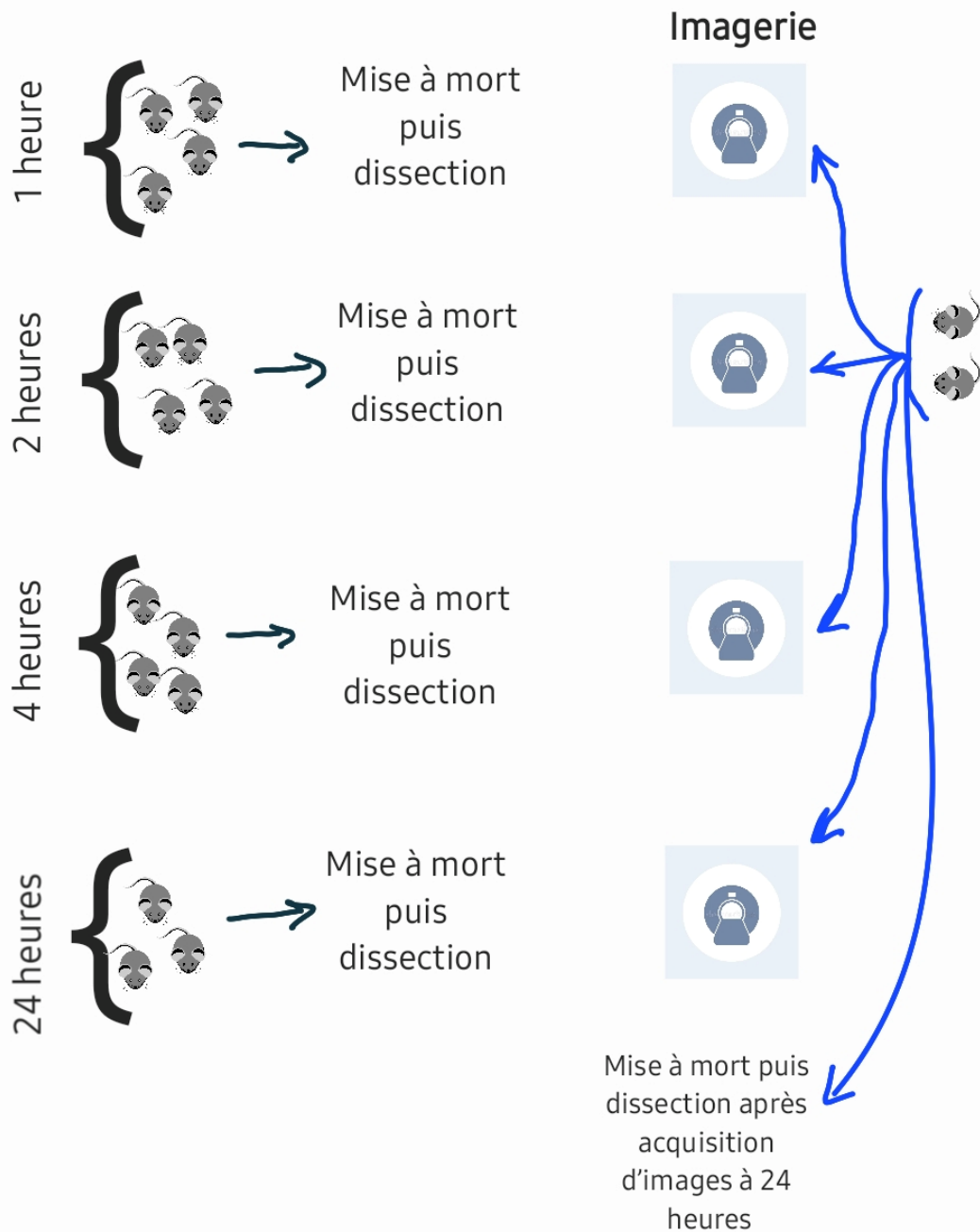


Figure 26. Schéma reprenant le principe de la deuxième expérience, à savoir l'administration de L-carnitine par voie orale chez les femelles non gestantes. Cette expérience était similaire à la première, si ce n'est le nombre de souris qui différait et le temps 10 minutes auquel nous n'avons pas affecté de souris.

T0 : injection de la L-carnitine marquée à toutes les souris (17 au total)

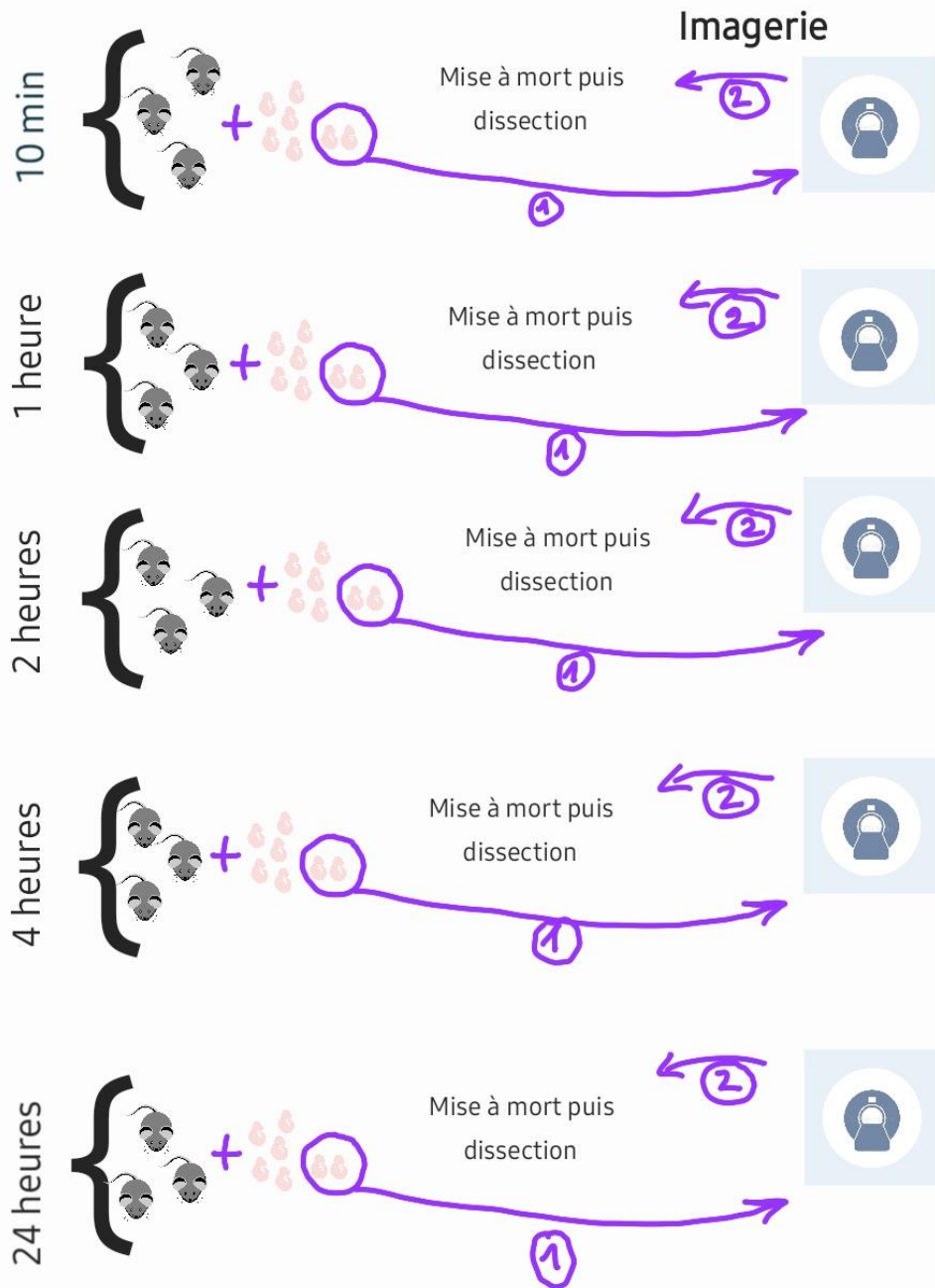


Figure 27. Schéma reprenant le principe de la troisième expérience, à savoir l'administration de L-carnitine par voie intraveineuse chez les femelles gestantes. Pour chaque portée de chaque souris, deux fœtus ont été aléatoirement choisis pour l'acquisition d'images puis ont été mis à mort et disséqués de la même manière que les autres, qui eux ont été mis à mort et disséqués en même temps que les mères aux différents temps.

a. Méthodes d'administration de la L-carnitine

La L-carnitine marquée a été administrée aux souris adultes selon deux voies : IV et PO, et aux souris gestantes par voie IV. Avant l'injection, les souris étaient placées dans une zone d'hébergement en groupe, dans leur cage d'origine, en présence d'un enrichissement environnemental adapté et varié. L'injection par voie IV a été réalisée sous anesthésie gazeuse dans une boîte d'induction (isoflurane à 3%, O₂ à 1L/min, durée 1 minute), au niveau de la veine caudale. Pour ce faire, une aiguille de 30G a été utilisée, pour l'injection de 150 µL de produit. Le réveil s'est ensuite effectué dans une cage individuelle, pour une durée de manipulation d'environ 2 minutes. L'administration par voie *orale* a été réalisée par gavage dans une sonde œsophagienne sur animal vigile au moyen d'une aiguille de gavage Drencher courbée 20G, reliée à une seringue de 1 mL. Cette manipulation a été réalisée par un expérimentateur formé au geste et qui le pratique en routine, et a été suivie d'un temps de surveillance de 15 minutes pour chaque individu.

b. Récupération des organes

Une fois les injections réalisées, les souris ont d'abord été pesées, puis mises à mort à des temps donnés (T+10 minutes pour l'injection IV uniquement, T+1h, T+2h, T+4h et T+24h), calculés à partir de la fin de l'injection IV ou de l'administration PO. Cette mise à mort a été faite par dislocation cervicale sous anesthésie dans une boîte d'induction (isoflurane à 5%, O₂ à 1L/min, durée 1 minute) pour les individus adultes et par décapitation pour les embryons et les souriceaux. Entre l'injection et la mise à mort, les souris ont été isolées dans une cage individuelle, contenant de l'eau et de la nourriture sous forme de croquettes. Le choix d'un hébergement individuel a été fait afin de pouvoir récolter les urines et les fèces de chaque souris individuellement, ce qui était nécessaire pour le comptage. Les cages étaient transparentes pour pallier l'isolement et permettre un contact visuel entre les individus. Le temps d'isolation maximum a été de 24 heures, correspondant au temps maximum de cinétique étudiée au cours de ce projet. Pour chaque souris adulte, les organes suivants ont systématiquement été disséqués et individualisés : cœur, poumons, foie, rate, reins, encéphale, os, muscle, glandes mammaires, sang, tube digestif, peau, utérus, gonades, queue et reste du cadavre. Le sang a été récolté en pratiquant une incision dans le ventricule cardiaque gauche, puis en récupérant le sang présent au fond de la cage thoracique. Les urines et les fèces ont également été récoltés pour tous les

temps. Pour les femelles gestantes, les organes suivants ont également été collectés pour chaque embryon : placenta, foie, cerveau et reste de l'embryon. Les différents organes ainsi récoltés ont ensuite été disposés sur une planche et pesés individuellement à l'aide d'une balance de précision (mesure à 10-4g près), puis placés dans des tubes destinés à la mesure de la radioactivité.

2. Mesure des différents paramètres

a. Biodistribution quantitative

Les différents organes ont été placés dans un compteur radioactif (Wizard® gamma counter, Perkin Elmer, USA) permettant une mesure de la radioactivité en coups par minute (CPM). Cet appareil permet de détecter les rayons gamma, qui sont ceux émis par le Tcm 99 utilisé pour l'étude. Chaque tube contenant un organe a donc été placé dans l'appareil de mesure, pour une durée d'1 minute environ. Dans le cas où le signal obtenu était trop faible, la durée de mesure pouvait être rallongée en fonction des besoins.

Les résultats ont ensuite été obtenus par organe et par gramme d'organe (étant donné la variabilité de taille et de poids des organes chez les différents individus).

La formule de correction selon la décroissance ayant été utilisée pour obtenir les valeurs finales de radioactivité dans les différents organes des souris était la suivante : $A_1 = A_0 e^{(-\ln 2/T)t}$, avec A_1 : l'activité corrigée selon la décroissance au temps de référence t_1 , t_1 : heure d'injection, A_0 : activité en CPM brute (non corrigée) au temps t_0 , t_0 : heure de la mesure, T : demi-vie radioactive du Tcm99 et t : durée écoulée entre les temps t_0 et t_1 .

Ensuite, pour obtenir les résultats finaux, nous avons sommé les résultats en CPM de tous les organes (sauf la queue, qui a été retirée car il s'agissait du site d'injection et qu'elle risquait de fausser les mesures), des urines et des selles. Cette somme était considérée représenter 100% de la dose injectée en L-carnitine. Les pourcentages par organe ont donc été calculés en fonction de cette valeur, puis divisés par le poids de chaque organe pour obtenir des valeurs par gramme d'organe.

b. Suivi longitudinal qualitatif

Ce suivi a été réalisé par imagerie, plus précisément par appareil de scintigraphie de type SPECT/CT (Nano-SPECT-CT system BIOSCAN™, Washington DC, USA) permettant de détecter les rayonnements γ .

Deux souris ont été sélectionnées au sein des deux premières cohortes (IV et PO sur souris adultes non gestantes, donc 4 souris adultes en tout) pour une durée d'imagerie (procédure non invasive) de 45 minutes environ. Chez les femelles gestantes, nous avons sélectionné deux fœtus issus d'une même portée par temps pour l'acquisition d'images (donc 10 fœtus au total). Il ne nous paraissait pas pertinent de reconduire les examens d'imagerie sur les femelles gestantes étant donné que nous possédions déjà les données sur les femelles adultes, et que notre principal intérêt se portait sur la radioactivité présente au sein du fœtus. L'examen d'imagerie a été effectué sous anesthésie volatile (induction à isoflurane à 3%, O₂ à 1L/min puis maintien à 1,5% d'isoflurane et 1 L/min d'O₂). Les souris ont été placées dans l'imageur avec un masque, dans un emplacement chauffé à 37°C permettant leur maintien en position ventrale. Un monitoring de la respiration a été réalisé tout au long de la procédure afin de pouvoir ajuster la profondeur de l'anesthésie. Un gel ophtalmique (Ocrygel®) a également été appliqué pour éviter le dessèchement de la cornée. Une fois l'acquisition de toutes les images terminée, les individus ont été replacés en cage sous lampe chauffante, sous surveillance jusqu'à leur réveil complet. La cage a ensuite été replacée en zone d'hébergement une fois le réveil complet et l'absence d'anomalie constatée. Au total, chaque souris a subi 5 anesthésies : T+10 min, T+1h, T+2h, T+4h et T+24h, correspondant aux différents temps de l'étude. Le fait d'obtenir des résultats sur deux souris nous a permis de nous assurer que les observations étaient reproductibles.

PARTIE 3

RESULTATS

I. Objectifs expérimentaux

Au cours de ces expériences, plusieurs objectifs expérimentaux ont été définis. Dans un premier temps, nous avons administré la L-carnitine par injection intra-veineuse chez des souris saines (= adultes). Utiliser dans un premier temps des souris adultes nous a permis d'obtenir des valeurs de base, nécessaires à l'interprétation des résultats de la deuxième procédure. L'administration par voie intra-veineuse permettait d'être en condition de « biodisponibilité absolue », c'est-à-dire que la dose injectée dans la circulation sanguine était connue. Ainsi, dans ce cas, la mesure de radioactivité dans les différents organes prenait uniquement en compte la distribution, autrement dit la vitesse d'accumulation de la radioactivité dans les différents organes, et l'élimination, autrement dit la vitesse d'excrétion urinaire et hépato-biliaire de la radioactivité. Le signal que l'on attendait devait présenter, selon notre hypothèse, les mêmes caractéristiques que ce qui est connu pour des molécules similaires, à savoir une diminution après 1 heure et une élimination quasi-complète après 4 heures. Le temps 24 heures devait donc servir à s'assurer de l'absence de L-carnitine résiduelle.

Dans un second temps, nous avons administré la molécule par voie orale aux souris adultes. Ceci a permis d'obtenir des données concernant son absorption intestinale par l'organisme, et de se rapprocher des conditions dans lesquelles la L-carnitine serait amenée à être utilisée chez l'Homme dans un cadre thérapeutique.

Enfin, nous avons procédé à une administration par voie IV chez les femelles gestantes. Cette expérience nous a permis d'abord de voir si la gestation était à l'origine d'une modification de la distribution aux différents organes, notamment à l'encéphale, ou de l'élimination, puis de visualiser le passage de la barrière placentaire par dosage de la radioactivité chez les fœtus (encéphale, foie et cadavre), ceci permettant d'orienter nos hypothèses sur les modalités d'action de la L- carnitine.

II. Etude de la biodistribution de la L-carnitine chez la souris adulte

1. Cinétique de biodistribution par injection intra-veineuse

a. Biodistribution quantitative

Les mesures de biodistribution quantitative ont été obtenues par dosage de la radioactivité au compteur à scintillation. Ce compteur retirait automatiquement le bruit de fond ambiant de chaque mesure, ce qui implique que chaque résultat obtenu est une mesure de radioactivité réellement présente au sein de l'organe. Au début de l'expérience, pour chaque souris, la dose de radioactivité injectée était connue. Pour chaque temps de mesure (chaque souris), nous avons prélevé les différents organes d'intérêt définis pour effectuer la mesure de la radioactivité. Chaque organe a été prélevé en entier, et par ailleurs nous avons mesuré la radioactivité rémanente dans le reste du cadavre, ainsi que la radioactivité dans les fèces et les urines retrouvées au fond de la cage. Par conséquent, nous avons mesuré à chaque temps toute la radioactivité, nous permettant de déterminer le pourcentage de radioactivité par organe exprimé par rapport à la totalité de la dose injectée (voir Annexe 2).

Par ailleurs, nous avons systématiquement pesé tous les organes prélevés, ce qui a permis l'obtention du pourcentage de radioactivité par gramme d'organe (voir Annexe 3).

ABSORPTION

Au cours de cette première expérience, l'absorption n'a pas été mesurée. En effet, il ne s'agissait pas d'une donnée pertinente puisque l'absorption représente le transfert d'une molécule de son site d'administration jusqu'à la circulation sanguine. Or, dans le cas d'une injection intraveineuse, l'absorption est rapide et complète puisque la molécule atteint directement la circulation sanguine.

ELIMINATION

Dans un premier temps, nous avons vérifié la cinétique d'élimination de la L-carnitine. Conformément à ce qui est rapporté dans la littérature (voir partie IV. de l'introduction), l'excrétion de la L-carnitine au cours de notre phase expérimentale a été très majoritairement urinaire, avec notamment une partie de la molécule directement excrétée ($12,347 \pm 7,010\%$ présents dans les urines après 10 minutes, voir figure 28 ci-dessous).

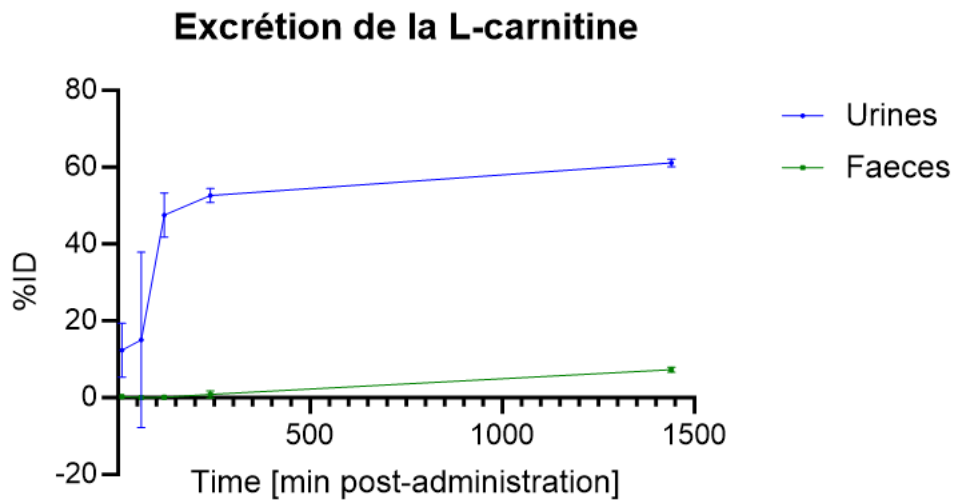


Figure 28. Excrétion urinaire et fécale de la L-carnitine chez la souris adulte après injection IV de L-carnitine. On constate que l'écrasante majorité de l'excrétion s'effectue par voie urinaire. %ID= pourcentage de L-carnitine retrouvé.

La cinétique de présence de L-carnitine dans le rein est également concordante avec cette excrétion urinaire puisque l'on observe une quantité décroissante de L-carnitine au sein de cet organe ($18,037 \pm 8,737\%$ au temps 10 minutes jusqu'à $3,047 \pm 0,263\%$ au temps 24 heures, voir figure 29 ci-dessous).

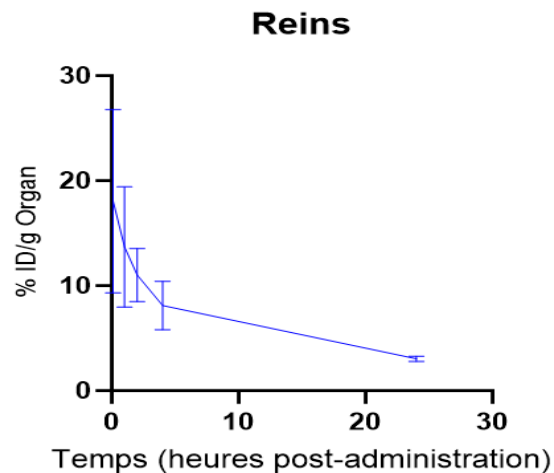


Figure 29. Evolution de la quantité de L-carnitine dans le rein chez les souris adultes après injection par voie intra-veineuse.

Cette élimination s'effectue en deux temps : une première phase d'élimination rapide ($47,513 \pm 5,774\%$ de L-carnitine éliminés dans les deux premières heures), puis une phase de plateau à partir de 4 heures. Après 24 heures, la majorité de la quantité de L-carnitine présente dans l'organisme a été éliminée (avec $61,127 \pm 0,998\%$ retrouvés dans les urines et $7,250 \pm 0,699\%$ dans les fèces, ce qui signifie une rémanence de $31,623 \pm 1,218\%$ de la L-carnitine administrée dans l'organisme).

On constate qu'une excrétion fécale est également à l'œuvre, avec une faible quantité ($7,250 \pm 0,699\%$ en 24 heures) de L-carnitine retrouvée dans les fèces. Ce type d'élimination a également été rapporté dans la littérature. Ceci soulève donc la possibilité d'un deuxième cycle d'élimination hépato-biliaire plus tardive, mais peut également être le signe d'une contamination par les urines au sein de la zone d'hébergement. Cependant, le fait d'obtenir une quantité stable de L-carnitine dans le tube digestif puis une diminution à 24 heures semble corroborer la première hypothèse (voir figure 30 ci-dessous).

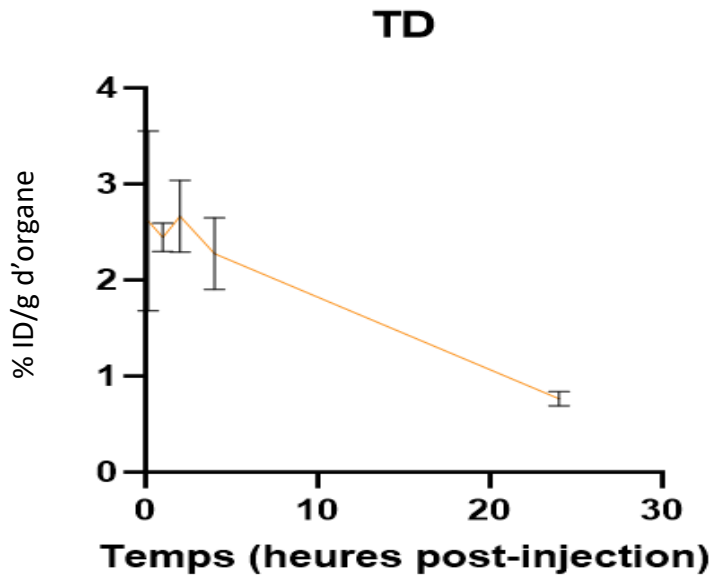


Figure 30. Evolution de la quantité de L-carnitine dans le tube digestif chez les souris adultes après injection par voie intraveineuse.

DISTRIBUTION

Après injection par voie intraveineuse, la totalité de la L-carnitine se retrouve dans la circulation. Elle est ensuite rapidement distribuée aux autres organes (voir figure 31 ci-dessous). On peut voir qu'en seulement deux heures, la quantité de L-carnitine circulante par gramme de sang diminue de plus de 50%.

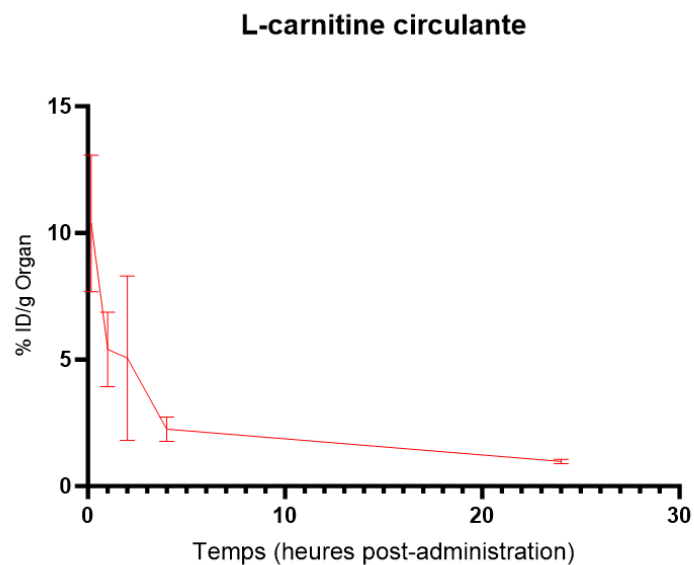


Figure 31. Graphe présentant le taux de L-carnitine présente dans la circulation sanguine en fonction du temps, chez les souris adultes après injection par voie intraveineuse

Cette distribution entre ensuite dans une deuxième phase, moins rapide, à partir de 4 heures. L'élimination de la L-carnitine est donc biphasique. L'obtention de ces valeurs nous a ensuite permis de calculer des demi-vies d'élimination pour ces deux phases.

La première a été calculée en considérant une portion linéaire entre les temps 0 et 2 heures. Ainsi, le calcul de la pente de cette droite nous permet d'obtenir une demi-vie d'élimination (= le temps pour lequel la moitié de la L-carnitine a quitté la circulation sanguine) de 1 heure et 3 minutes. En effectuant le calcul pour la deuxième phase (du temps 4 heures au temps 24 heures), on trouve une demi-vie d'élimination de 17 heures et 40 minutes.

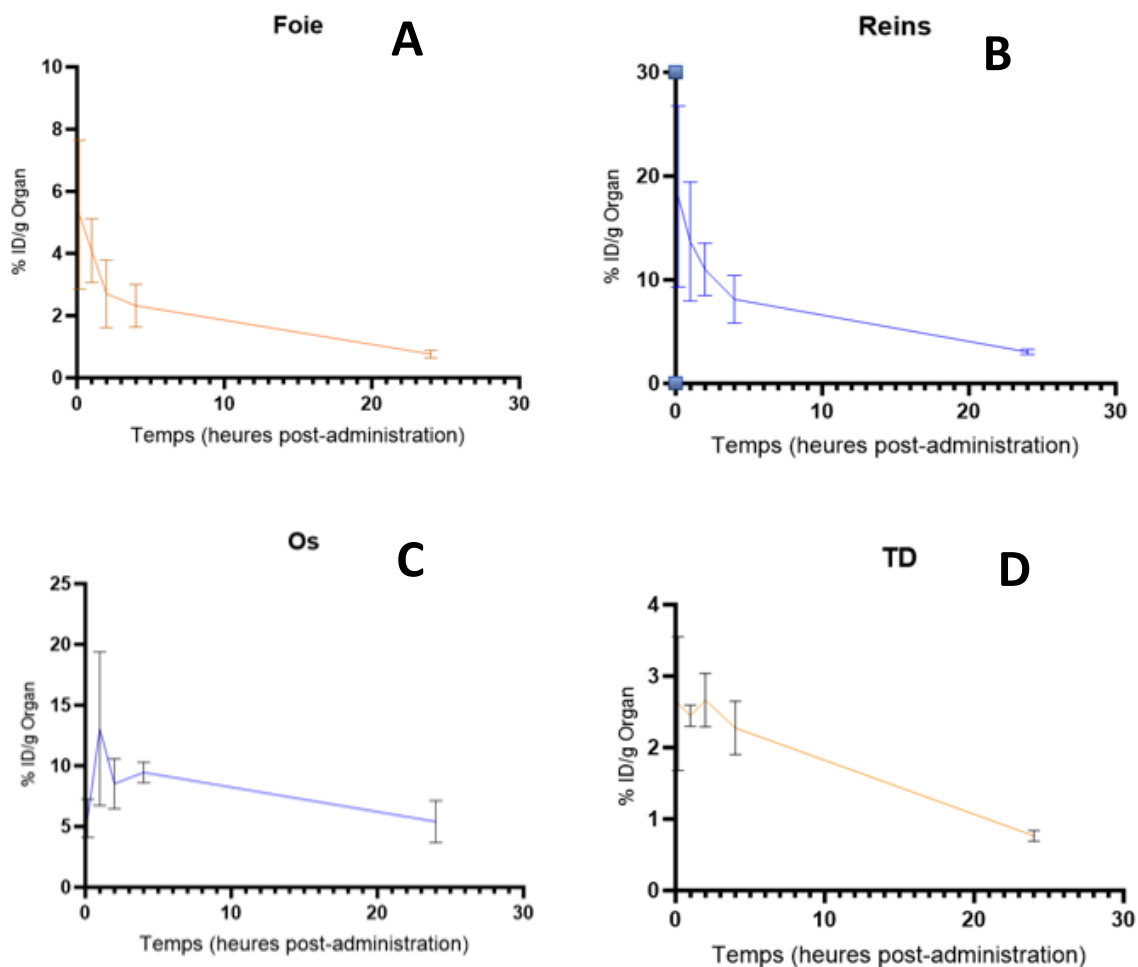


Figure 32. Graphes montrant l'évolution de la quantité de L-carnitine dans différents organes d'intérêt en fonction du temps, chez des souris adultes après injection par voie intraveineuse. A= Foie, B= Reins, C= Os, D= Tube digestif

Concernant les différents organes, d'après le comptage, la radioactivité mesurée se situe principalement dans les os et les reins (voir 32 ci-dessus). En effet, une quantité importante de L-carnitine se retrouve très rapidement dans le rein ($18,037 \pm 8,737\%$ en 10 minutes, figure 31B), puis décroît progressivement jusqu'à 24 heures, ce qui est cohérent avec le mode d'excrétion de la molécule. De plus, la quantité présente dans le rein est supérieure à celle retrouvée dans le sang (2 fois supérieure au temps 10 minutes, puis 4 fois supérieure au temps 2 heures), ce qui montre bien un captage important de la molécule ainsi qu'une accumulation de celle-ci.

Si l'on effectue la même comparaison, cette fois-ci entre la quantité retrouvée dans le sang et dans le foie, on constate qu'après 2 heures, on retrouve $2,700 \pm 1,090\%$ de L-carnitine dans le foie, soit 1,9 fois moins que dans le sang. Après 4 heures en revanche, on retrouve $2,320 \pm 0,685\%$ de L-carnitine dans le foie contre $2,250 \pm 0,478\%$ dans la circulation sanguine. Ces valeurs sont comparables, ce qui indique qu'il n'existe pas une réelle accumulation de L-carnitine dans le foie comme il peut y en avoir dans les reins, mais plutôt que la quantité présente dans cet organe dépend essentiellement de la quantité présente dans la circulation. En parallèle, cette quantité connaît un pic à 1 heure dans les os ($13,063 \pm 6,339\%$, voir figure 32C), suivi d'un plateau jusqu'à 24 heures. La différence entre les valeurs aux différents temps n'étant pas significative, on peut en déduire que la quantité présente dans les os est relativement constante au cours du temps. Cette quantité reste environ 2 fois supérieure à celle retrouvée dans le sang, marquant une réelle accumulation osseuse de la L-carnitine. On constate ainsi qu'il existe une rémanence à 24 heures de cette molécule non seulement au sein des organes liés à l'excrétion (reins, tube digestif), mais également au sein d'autres organes.

En parallèle, on sait que la L-carnitine est fréquemment consommée en tant que complément alimentaire afin de réaliser une prise de masse musculaire plus importante. Au cours de cette expérience, nous nous attendions donc à observer un captage de la L-carnitine par les muscles. On observe un faible captage de la L-carnitine par les muscles ($1,490 \pm 0,631\%$ au temps 10 minutes puis décroissance régulière jusqu'au temps 24 heures, voir figure 33 ci-dessous). Si l'on compare de nouveau cette quantité à celle retrouvée dans la circulation, on constate que la quantité présente dans les muscles est 10 fois inférieure à celle circulante après 2 heures.

Après 4 heures, elle est encore 6 fois inférieure. Cela confirme la très faible captation musculaire de la L-carnitine.

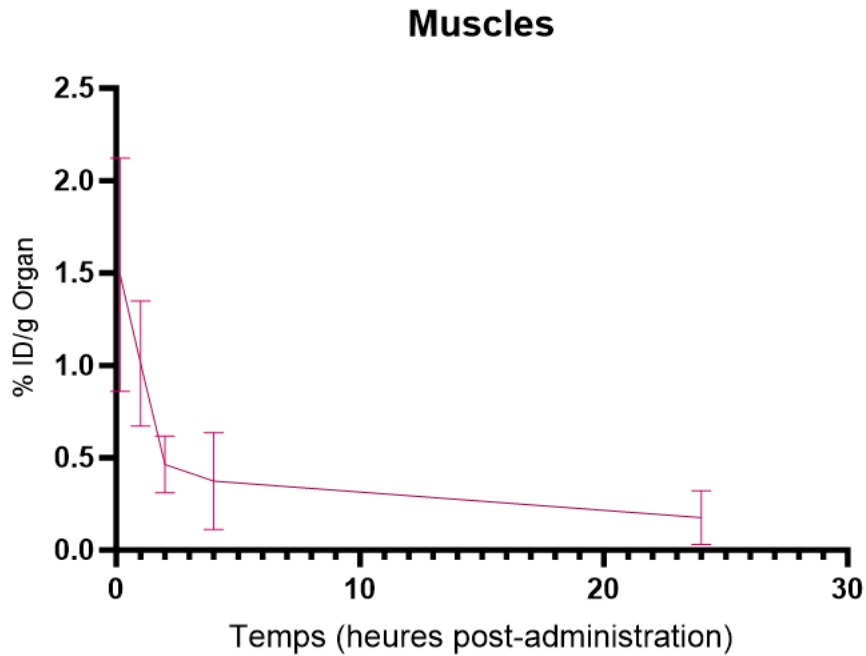


Figure 33. Graphe présentant la quantité de L-carnitine dans les muscles après injection par voie intra-veineuse sur des souris adultes.

L'encéphale, organe d'intérêt au cours de cette étude étant donné l'effet supposé sur le développement neuronal, est étonnamment celui où l'on a retrouvé le moins de L-carnitine ($0,413 \pm 0,129\%$ à 10 minutes au maximum, puis quantité décroissante jusqu'à 24 heures, voir figure 34 ci-dessous).

Encéphale

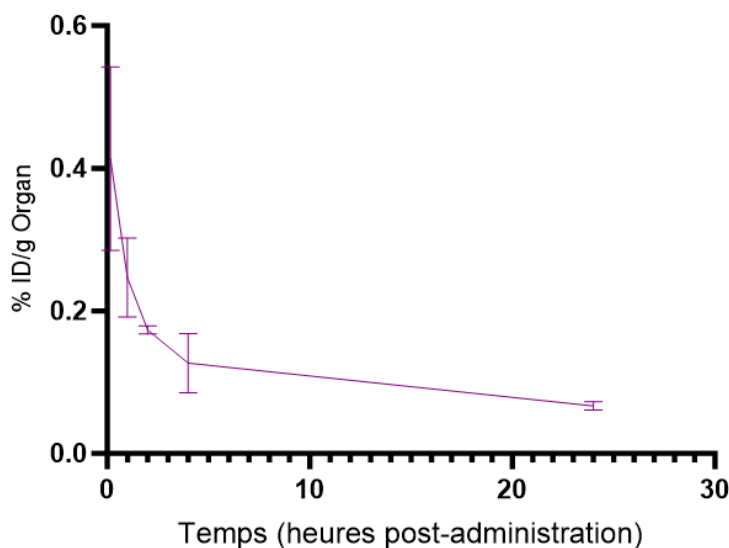


Figure 34. Graphique présentant la quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale au cours de la manipulation. On constate que par rapport aux autres organes, les ordres de grandeur sont bien inférieurs (valeurs inférieures à 0,45% sur les 24 heures).

En nous basant sur cette quantité retrouvée dans l'encéphale, on constate qu'au temps 10 minutes, elle est 25 fois moins importante dans le cerveau que dans la circulation sanguine ($0,413 \pm 0,129\%$ contre $10,373 \pm 2,702\%$). La différence avec les autres organes est frappante (par exemple les reins et les os, voir valeurs plus haut). L'encéphale semble donc capter une quantité infime de L-carnitine. Au temps 2 heures, la quantité présente est 30 fois inférieure à la quantité circulante ($0,173 \pm 0,006\%$ contre $5,053 \pm 3,245\%$). Ainsi, on peut extrapoler que la barrière hémato-méningée bloque un peu moins de 97% du passage de la L-carnitine.

Cette observation est contraire à notre hypothèse de départ, puisque l'on sait que la L-carnitine administrée chez des femelles gestantes et allaitantes possède un effet bénéfique sur le développement cérébral. Ceci soulève des questionnements sur le mécanisme d'action de la L-carnitine et conduit à une hypothèse alternative : il se peut que la L-carnitine ne passe pas la barrière hémato-méningée chez l'adulte et la passe seulement chez l'embryon ou le souriceau.

Il est également important de noter qu'une proportion non négligeable de la molécule étudiée est retrouvée dans l'utérus ($5,163 \pm 1,540\%$ à 10 minutes, puis décroît régulièrement au cours des heures qui suivent, voir figure 35 ci-dessous), information intéressante dans le cadre de notre étude qui se penche également sur le passage de la barrière placentaire chez la femelle gestante.

Utérus et glandes mammaires

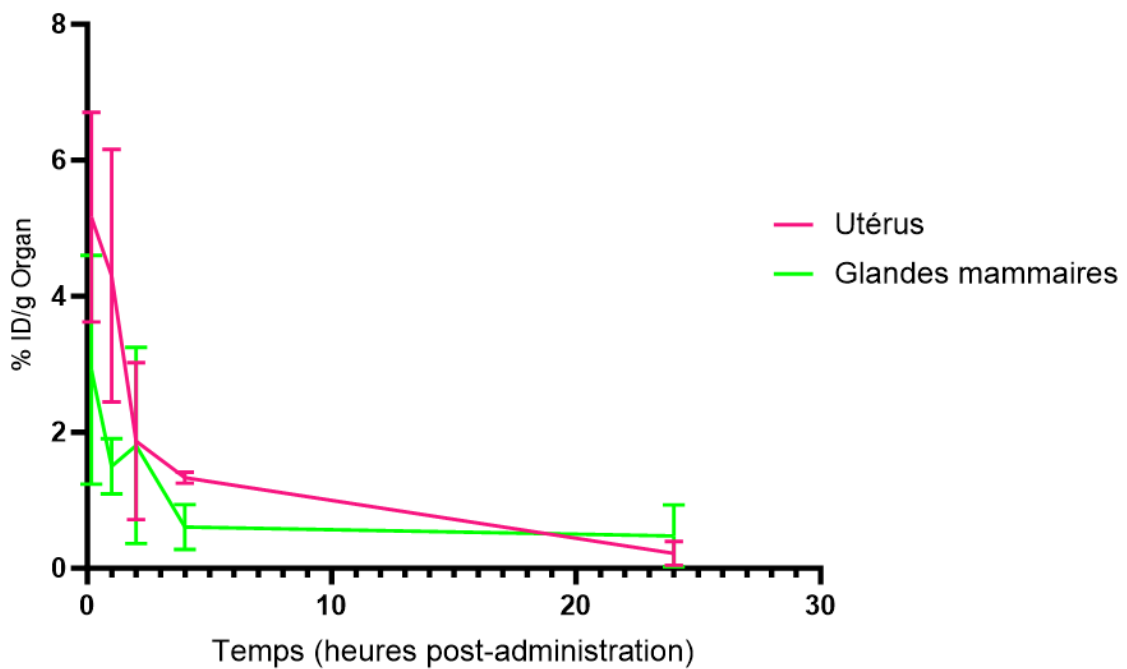


Figure 35. Graphique présentant la quantité de L-carnitine présente dans l'utérus et les glandes mammaires au cours du temps, après injection IV chez les souris adultes.

Le fait de retrouver également un pourcentage de radioactivité non nul au sein des glandes mammaires ($1,500 \pm 0,408\%$ au temps 1 heure par exemple, voir figure 35 ci-dessus) permet de supposer qu'un passage au souriceau est envisageable au cours de la période d'allaitement.

b. Suivi longitudinal qualitatif

Le suivi par imagerie nous a permis de visualiser qualitativement la distribution de la L-carnitine au cours des 24 heures de manipulation. La figure suivante rassemble les images obtenues pour les deux souris de l'étude destinées à l'imagerie (voir figures 36 et 37 ci-dessous). Pour chaque souris, deux séries d'images sont disponibles. La ligne d'images du bas représente les mêmes images que celles du haut tout en faisant varier la sensibilité (on retire la portion entre 0 et 5% pour s'affranchir du bruit de fond ambiant et on accentue le contraste sur les zones de marquage pour mieux visualiser les zones d'accumulation de la L-carnitine). L'image manquante (« Not available ») correspond à un moment où la souris ne répondait plus à l'anesthésie, ce qui a rendu l'acquisition d'images impossible.

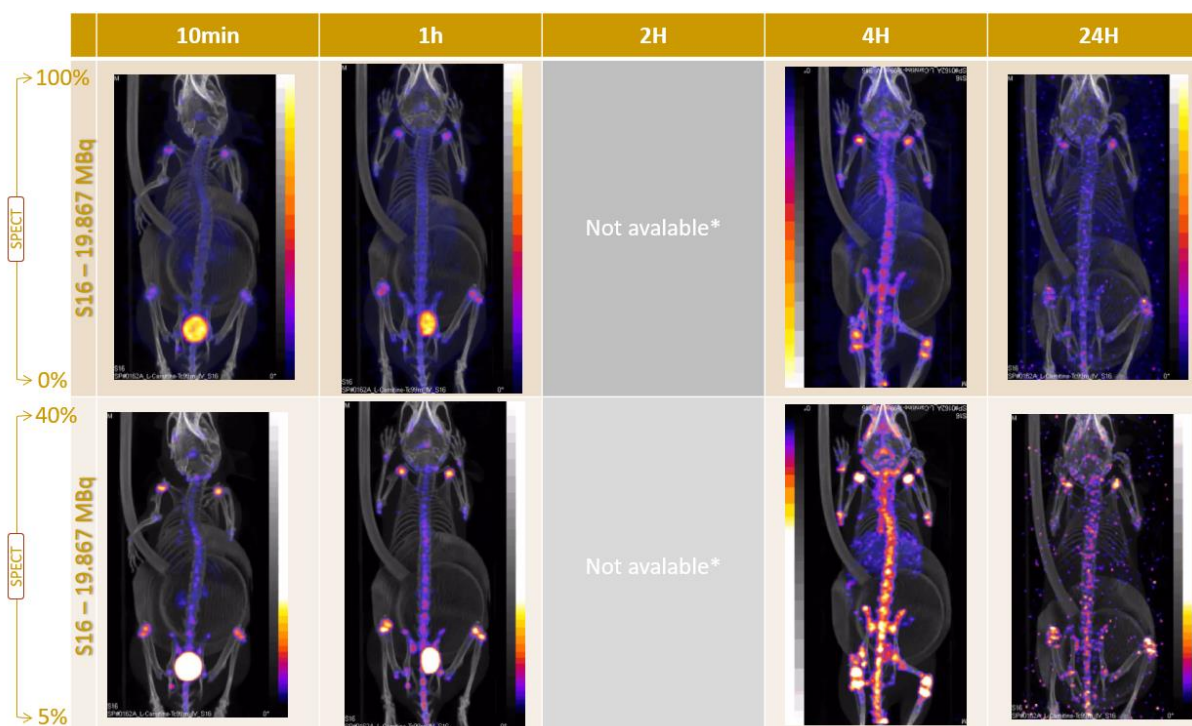


Figure 36. Images obtenues au scanner de la souris 16 à 10 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures. Les résultats concordent avec le comptage décrit précédemment.

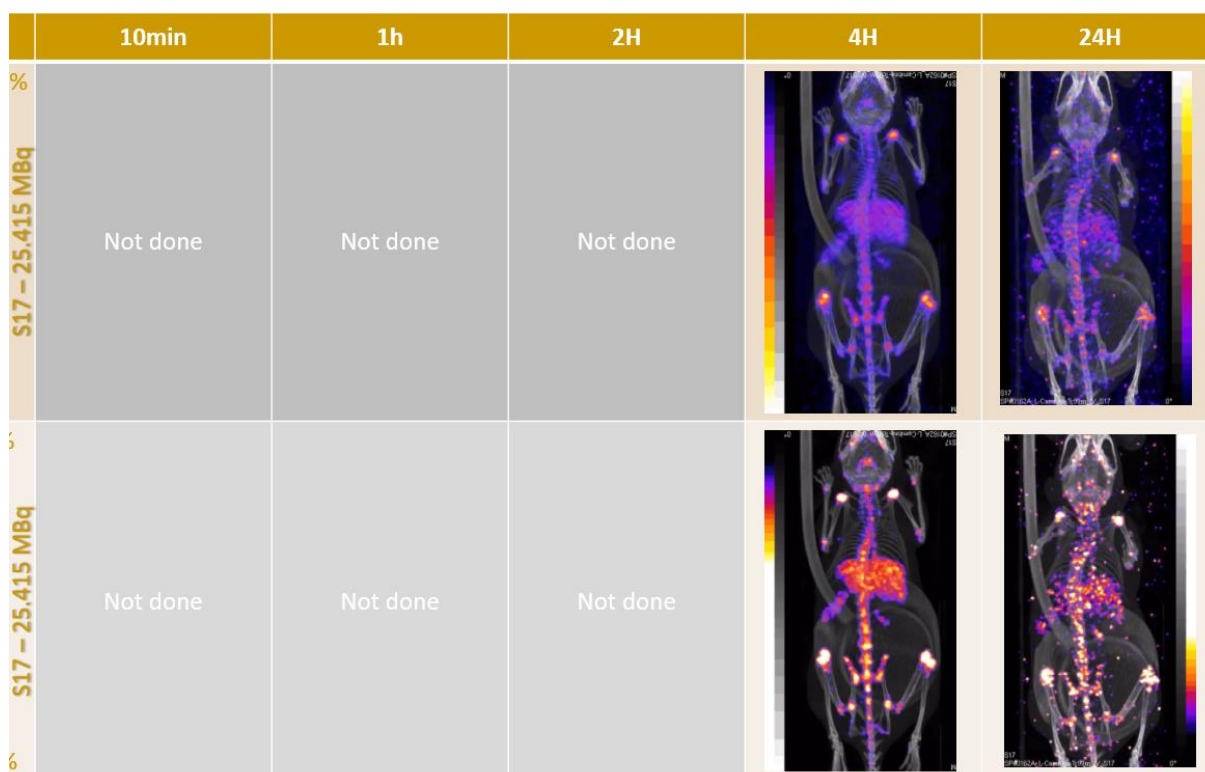


Figure 37. Images obtenues au scanner de la souris 17. Seuls les temps 4 heures et 24 heures ont été réalisés. Ces images sont similaires à celles obtenues pour l'autre souris, avec un marquage plus net au niveau des organes de stockage (os, articulations, foie notamment)

On retrouve sur ces images des résultats compatibles avec ceux obtenus au compteur, c'est-à-dire un stockage majoritaire au niveau des os et des articulations, une quantité importante de radioactivité retrouvée dans la vessie, qui correspond à la quantité excrétée via les urines, ainsi que de la L-carnitine retrouvée dans le foie et dans les reins (métabolisme et excrétion). Comme l'a montré également le comptage, on n'observe aucun marquage radioactif dans l'encéphale même en faisant abstraction du bruit de fond.

2. Cinétique de biodistribution par administration per os

a. Biodistribution quantitative

A la suite de l'étude de biodistribution après injection intraveineuse, nous avons réalisé une étude similaire en administrant la L-carnitine par voie orale. Cette voie est la modalité d'administration de la L-carnitine qui a montré un effet positif sur le développement cérébral. Par ailleurs, la pharmacocinétique après administration orale

permet de mesurer l'absorption de la molécule et de comparer les profils obtenus avec l'administration intraveineuse, qui sert de référence. Les doses de L-carnitine marquée ont été administrées par gavage sous anesthésie, puis les animaux ont été sacrifiés aux différents temps (1 heure, 2 heures, 4 heures et 24 heures), le temps 10 minutes ayant été supprimé car jugé non pertinent au vu du temps de transit nécessaire. De la même manière que pour l'étude réalisée chez les souris par injection intraveineuse, le comptage radioactif des différents organes a permis de mesurer des pourcentages de L-carnitine par organe et par gramme d'organe (voir annexes 4 et 5).

ABSORPTION

Afin de calculer la dose de L-carnitine absorbée par l'organisme, nous avons pris la totalité de la quantité administrée, à laquelle nous avons retiré la quantité présente dans l'entièreté du tube digestif (estomac, intestin grêle et colon ainsi que leur contenu) et la quantité excrétée (c'est-à-dire la L-carnitine présente dans les urines et les fèces). Nous avons fait le choix de compter les organes du tube digestif en plus de leur contenu car lors du prélèvement, tout le contenu n'a pas pu être retiré de ceux-ci, causant une importante contamination. Ceci nous a permis de visualiser l'absorption sur 24 heures (voir figure 38 ci-dessous).

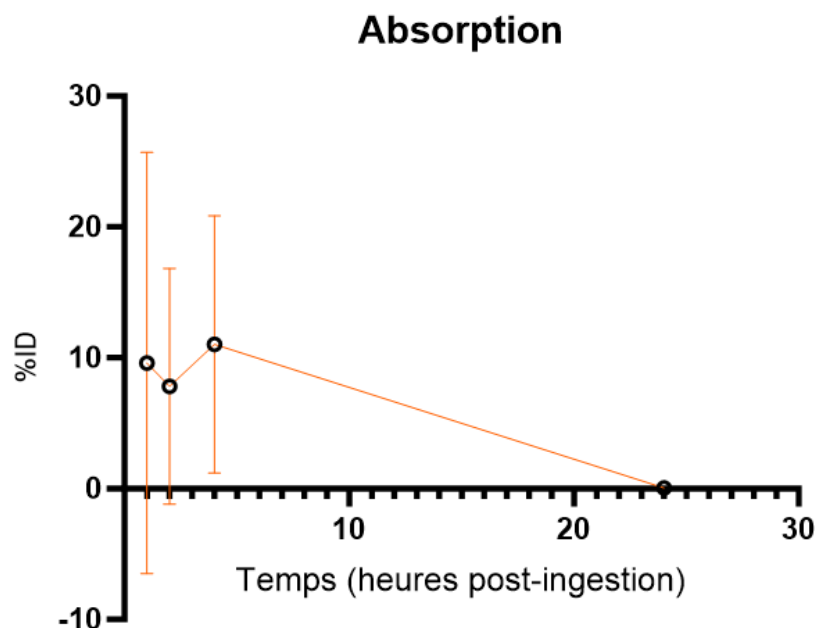


Figure 38. Graphique représentant la quantité de L-carnitine absorbée par l'organisme en fonction du temps, après une administration per os

On constate que la plus grande partie est absorbée dans la première heure, et correspond à moins de 15% de la quantité totale administrée aux souris. Ainsi, la quasi-totalité de la L-carnitine administrée est restée dans le contenu du tube digestif puis a été excrétée. On peut voir que les écarts-types sont très importants sur cette figure car la variabilité inter-individuelle était particulièrement marquée en termes d'absorption de la L-carnitine. Après les 24 heures d'expérience, il en reste seulement $0,053 \pm 0,032\%$ dans l'organisme, indiquant que la quasi-totalité est éliminée avec le contenu digestif en 24 heures.

On retrouve également une quantité importante dans les organes du tube digestif en eux même (voir annexe 4). Cependant l'interprétation doit être prudente puisqu'il peut s'agir d'une contamination par le contenu digestif qui n'a pas pu être retiré en totalité lors des dissections.

ELIMINATION

Contrairement à l'excrétion observée lors de la manipulation à la suite de l'injection IV, l'excrétion observée ici est majoritairement fécale (voir figure 39 ci-dessous). En effet, après 24 heures, $93,470 \pm 5,267\%$ de L-carnitine sont retrouvés dans les selles alors que seulement $5,237 \pm 4,812\%$ sont retrouvés dans les urines.

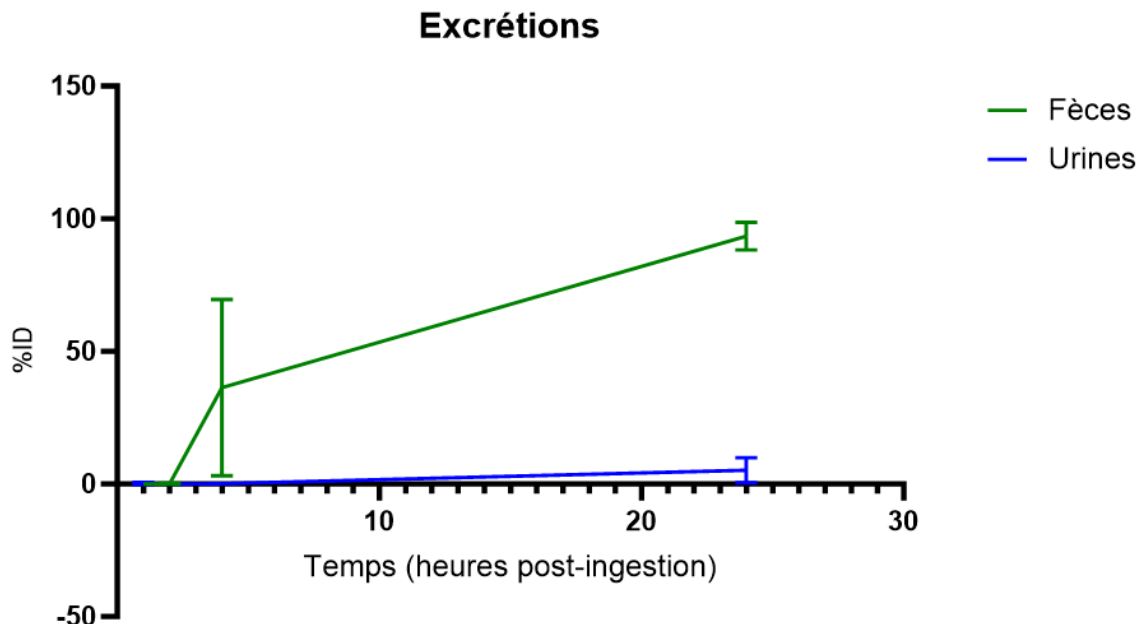


Figure 39. Graphique présentant l'excrétion de la L-carnitine (urinaire et fécale), suite à l'administration per os de L-carnitine. On constate que cette fois-ci, la part d'élimination urinaire est négligeable par rapport à l'élimination fécale

On constate également que l'élimination de la molécule est visible à partir du temps 4 heures. Or, d'après la littérature, le temps de transit chez la souris varie entre 6 et 8 heures selon les lignées (Padmanabhan et al., 2013). Une heure après gavage, le contenu digestif est majoritairement situé entre le caecum et le colon, et le temps restant correspond à la fin de la digestion au sein du colon. Ici, le fait de retrouver de la L-carnitine 4 heures après ingestion signe un temps de transit relativement court par rapport à ce qui est décrit, ce qui indique que cette molécule est éliminée directement avec le bolus alimentaire. La L-carnitine est quasiment totalement éliminée 24 heures après ingestion ($98,707 \pm 7,134\%$ de radioactivité ont été retrouvés en moyenne dans les urines et selles, indiquant la rémanence d'une partie infime de la L-carnitine dans l'organisme).

L'excrétion urinaire n'est visible qu'à partir de 24 heures, et en proportion très faible. De plus, une quantité presque nulle de L-carnitine a été retrouvée dans les reins (moins de 0,1%, voir figure 40 ci-dessous). Cependant, de telles valeurs ne sont pas surprenantes, étant donné la très faible proportion de L-carnitine absorbée au niveau intestinal. En effet, une quantité infime se retrouve dans la circulation et donc filtrée par les reins. A titre de comparaison, pour une absorption totale (100%) après injection par voie IV, on obtenait une quantité de L-carnitine dans les urines de $61,127 \pm 0,998\%$ (soit 61,127% de la quantité initiale absorbée). Pour une absorption initiale de $9,588 \pm 16,107\%$, on se retrouve avec une excrétion urinaire de $5,237 \pm 4,812\%$ (soit 54,6% de la quantité initialement absorbée). Finalement, la proportion de L-carnitine excrétée par voie urinaire ne présente pas de grande différence entre l'administration par voie orale ou par injection intraveineuse.

DISTRIBUTION

En comparant les valeurs avec celles de l'étude IV sur les adultes, on remarque qu'une quantité très faible s'est retrouvée dans les différents organes au cours des 24 heures de l'expérience (voir figure 40 ci-dessous).

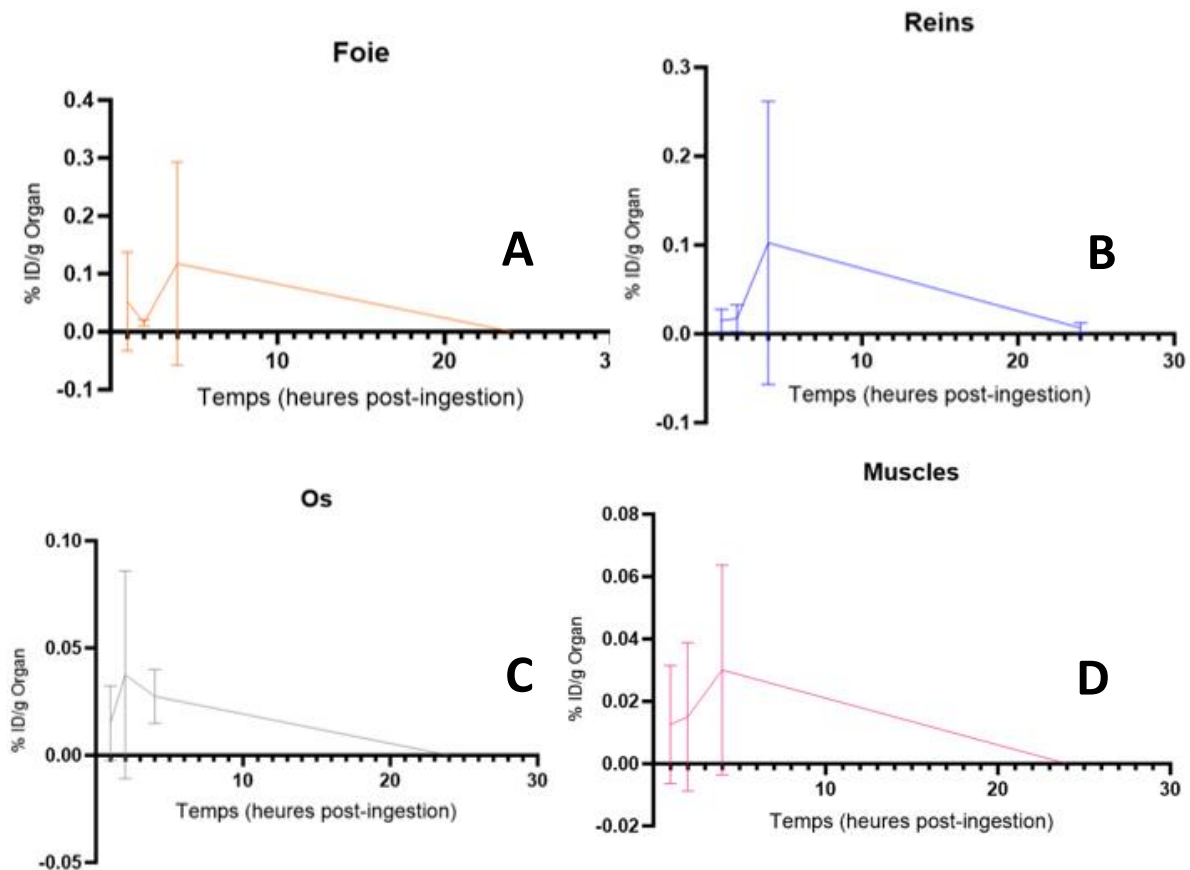


Figure 40. Graphiques représentant l'évolution de la quantité de L-carnitine présente dans certains organes d'intérêt après administration par voie orale chez des souris adultes. A= Foie, B= Reins, C= Os, D= Muscles. On constate que seules de faibles traces ont été retrouvées au sein de ces organes.

En effet, peu de valeurs sont significativement supérieures à 0 au sein des organes ci-dessus. On retrouve néanmoins des traces de L-carnitine dans le foie à 2 heures ($0,015 \pm 0,006\%$, soit $0,19\%$ de la quantité absorbée), dans les os à 4 heures ($0,028 \pm 0,013\%$, soit $0,25\%$ de la quantité absorbée), montrant un léger captage par ces organes. Cependant, pour les muscles et les reins, les valeurs ne sont pas significativement non nulles puisque les écarts types recouvrent 0. On constate que, même en mettant ces valeurs en regard du taux d'absorption, le captage par les différents organes a été beaucoup plus faibles que chez les souris injectées par voie IV.

De plus, si on regarde à nouveau notre principal organe d'intérêt, l'encéphale, la quantité de L-carnitine que l'on y retrouve est de nouveau très faible (mais non nulle, voir figure 41 ci-dessous). Ainsi, on retrouve $0,018 \pm 0,015\%$ à 1 heure, soit $0,19\%$ de

la quantité absorbée. Cette quantité décroît ensuite jusqu'à 24 heures où elle devient nulle.

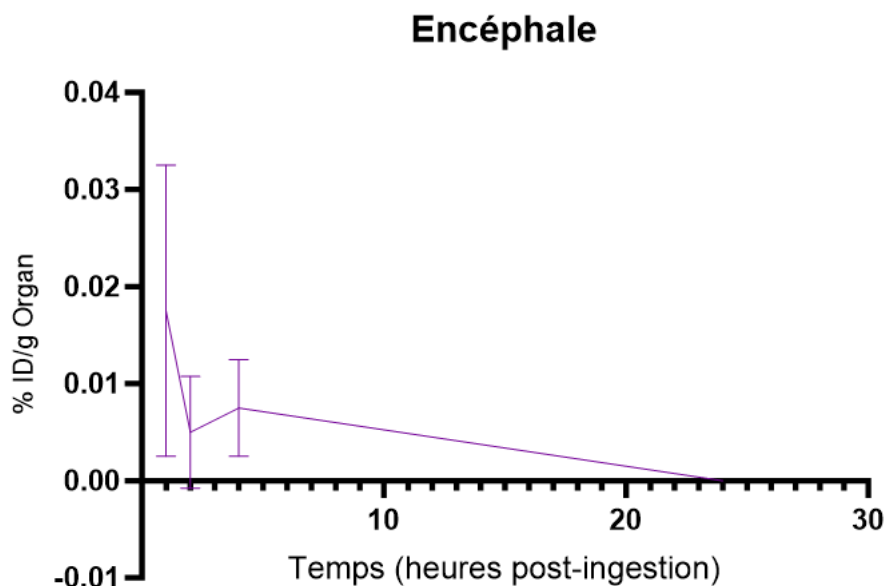


Figure 41. Graphique représentant la quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale, aux différents temps après administration par voie orale chez des souris adultes.

Ainsi, l'administration de L-carnitine PO a permis d'obtenir peu de conclusions significatives, montrant principalement que seule une faible quantité de la L-carnitine administrée était réellement absorbée par l'organisme.

Une des explications possibles serait que la dose utilisée n'était pas suffisante. En effet, nous avons ici administré une dose de 100 ng de L-carnitine par souris, représentant une dose comprise entre 5 et 6,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Or, dans la littérature, les doses utilisées sont plutôt de l'ordre de 30 mg/kg chez l'Homme (Martens, 2009). De plus, il serait également possible d'augmenter la dose de radioactivité injectée afin d'obtenir un meilleur signal. En effet, les doses injectées ici ont été situées entre 2 et 3 MBq, sachant que l'on peut augmenter ces doses jusqu'à 40 MBq sans atteindre le seuil de toxicité.

Ceci soulève la possibilité que pour avoir des résultats pertinents et intéressants dans le cadre d'une utilisation chez l'Homme plus tard, il faudrait potentiellement reconduire l'étude en administrant la L-carnitine sur une longue durée (par exemple plusieurs jours ou plusieurs semaines, comme cela avait été le cas dans l'étude initialement conduite sur les femelles gestantes et allaitantes. Cette étude chronique permettrait donc peut-

être de visualiser une accumulation de la L-carnitine, notamment dans l'encéphale qui est notre principal organe d'intérêt.

b. Suivi longitudinal qualitatif

À la suite du gavage des souris, nous avons procédé à l'acquisition d'images grâce au scanner, tout comme lors de la première série de manipulations. Les images obtenues ont confirmé les résultats obtenus par comptage de radioactivité : la quasi-totalité de la radioactivité est restée dans le tube digestif (donc dans le contenu de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon). La radioactivité était non détectable en dehors du tube digestif (voir figures 42 et 43 ci-dessous).

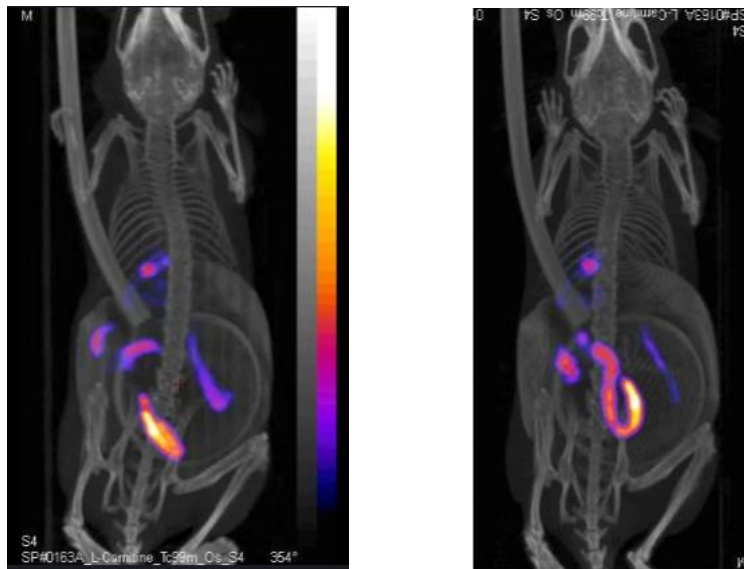


Figure 42. Images obtenues au scanner après administration per os, aux temps 1 heure et 2 heures

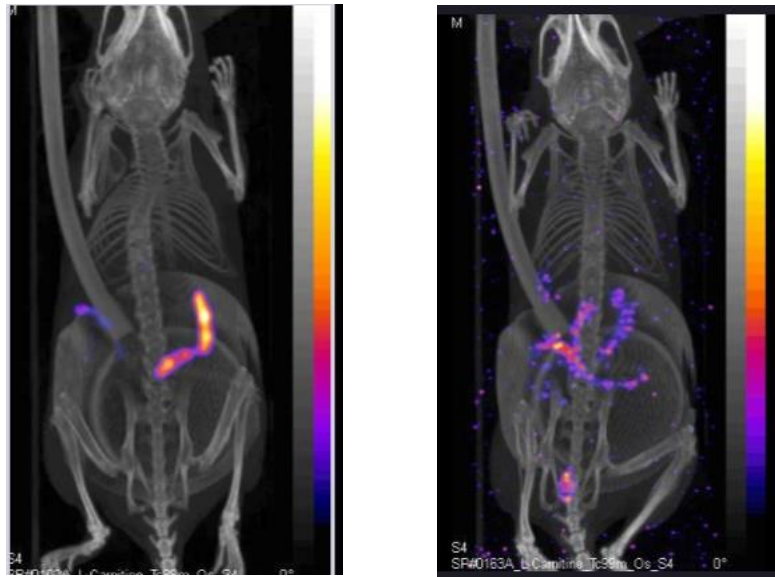


Figure 43. Images obtenues au scanner chez les souris après administration per os, aux temps 4 heures et 24 heures.

III. Etude de la biodistribution chez la souris gestante

1. Cinétique de biodistribution par injection intra-veineuse

a. Biodistribution quantitative

L'un des enseignements principaux de notre première étude sur la biodistribution de la L-carnitine chez la femelle adulte est un passage très faible dans le cerveau. Néanmoins, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique se renforce avec l'âge de sorte qu'il est possible qu'une dose plus importante de L-carnitine puisse se retrouver dans le cerveau chez le fœtus, à un âge où le traitement peut entraîner des effets bénéfiques. Par ailleurs, la quantité relativement importante de L-carnitine retrouvée dans l'utérus de la femelle non gestante laisse penser que la L-carnitine est susceptible de passer la barrière placentaire. Pour tester ces hypothèses, nous avons choisi d'établir le profil de biodistribution de la L-carnitine chez la femelle gestante. Au cours de cette série d'expériences, les organes d'intérêt ont été prélevés chez la mère, mais également chez le fœtus dont nous avons prélevé le placenta, le foie (où débouche la veine ombilicale et qui est donc le premier organe irrigué par le sang placentaire), l'encéphale (cible de notre étude) et le reste du cadavre fœtal. La voie d'administration retenue a été la voie IV, qui bien que moins pertinente d'un point de vue thérapeutique, permet de nous affranchir des défauts d'absorption constatés par voie orale. Les résultats concernant tous les organes sont disposés dans les

graphiques situés en annexe (voir annexes 6 et 7). Concernant les fœtus, chacun a été disséqué dans chaque portée, ainsi « Fœtus brain » correspond à tous les encéphales des fœtus d'une portée, de même pour le foie. Ceci permet de visualiser la radioactivité totale absolue transmise aux fœtus lors de la gestation.

ABSORPTION

Au cours de cette expérience, l'absorption n'a pas été mesurée, tout comme lors de l'administration IV chez les souris non gestantes. En effet, il ne s'agit pas d'une donnée pertinente puisque l'absorption représente le transfert d'une molécule de son site d'administration jusqu'à la circulation sanguine. Or, dans le cas d'une injection intraveineuse, l'absorption est rapide et complète puisque la molécule atteint directement la circulation sanguine.

ELIMINATION

L'excrétion de la L-carnitine a été majoritairement urinaire, tout comme dans les autres cohortes (voir figure 44 ci-dessous). De la même manière que lors de l'étude IV sur les souris adultes, un cycle d'excrétion par les fèces a pu être mis en évidence, plus important cette fois-ci (jusqu'à $33,317 \pm 21,554$ % en 24 heures). Il semble qu'au cours de cette expérience il y ait eu une forte variabilité biologique concernant les excréctions des différentes souris.

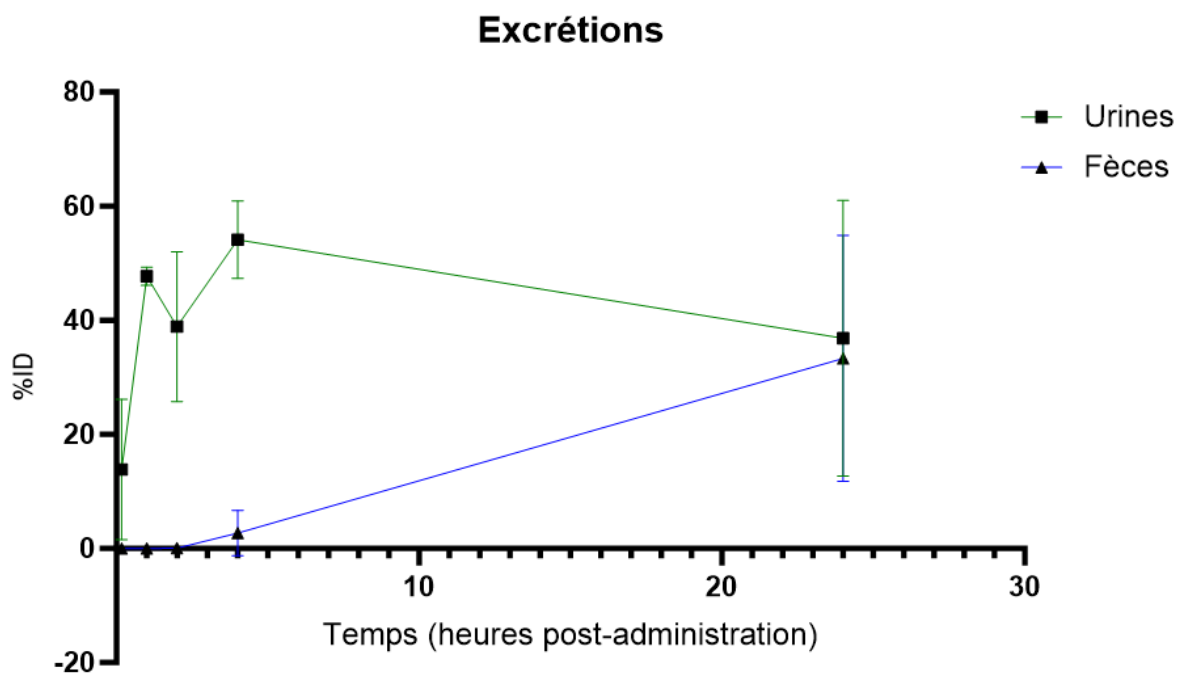


Figure 44. Graphique présentant l'excrétion de la L-carnitine (urinaire et fécale), à la suite de l'administration intra-veineuse de L-carnitine chez les femelles gestantes. La part d'élimination par voie hépato-biliaire semble bien plus importante que lors de l'étude chez les adultes.

24 heures après l'administration de la L-carnitine, $70,147 \pm 32,379\%$ de la dose injectée a été éliminée dans les urines ou les fèces. Cela signifie qu'environ 30% de L-carnitine en moyenne étaient toujours présents dans l'organisme, résultat comparable à celui obtenu chez les souris adultes dans la première étude.

DISTRIBUTION

Lors de cette série de manipulations, la distribution sanguine de la L-carnitine vers les autres organes a également été très rapide (voir figure 45 ci-dessous). En effet, 10 minutes après l'injection, on retrouve seulement $9,760 \pm 2,418\%$ de L-carnitine dans

le sang. Cela signifie que plus de 90% de la L-carnitine a été distribué aux différents organes dans les 10 premières minutes.

Circulation

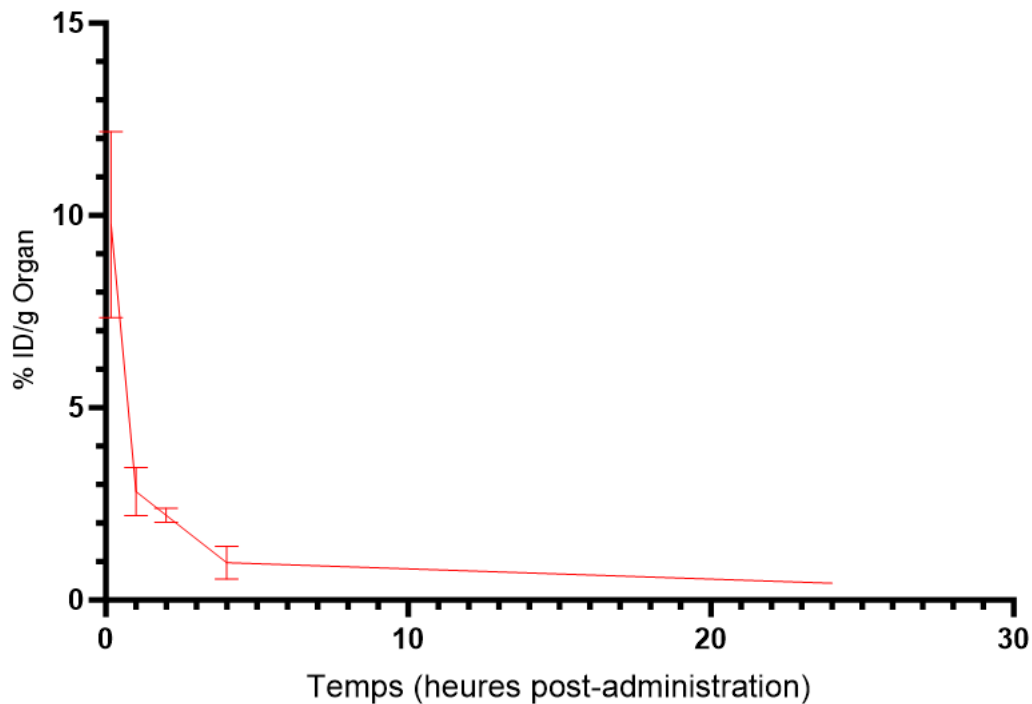


Figure 45. Graphe présentant le taux de L-carnitine circulante en fonction du temps, chez les souris gestantes après injection IV. On constate que la distribution aux différents organes est plus rapide que chez les souris adultes.

Comme nous l'avons fait pour évaluer la distribution chez les souris adultes non gestantes, nous pouvons ici séparer la distribution de la L-carnitine en deux phases et calculer des demi-vies d'élimination pour chacune.

La première a été calculée en considérant une portion linéaire entre les temps 0 et 2 heures. Ainsi, le calcul de la pente de cette droite nous permet d'obtenir une demi-vie d'élimination (= le temps pour lequel la moitié de la L-carnitine a quitté la circulation sanguine) de 1 heure et 1 minute (similaire à ce qui avait été obtenu chez les souris adultes non gestantes). En effectuant le calcul pour la deuxième phase (du temps 2 heures au temps 24 heures), on trouve une demi-vie d'élimination de 13 heures et 42 minutes. L'élimination a donc été plus rapide chez les souris gestantes puisque sur cette phase, la demi-vie d'élimination chez les souris adultes non gestantes était de 17 heures et 40 minutes.

Distribution chez la femelle gestante

Au cours de cette expérience, nous avons pu observer chez les femelles gestantes des résultats comparables avec ceux obtenus chez les souris adultes. En effet, parmi les organes d'intérêt, le rein et le foie sont toujours des organes de captage importants de la L-carnitine (voir figure 46 ci-dessous). Le rein concentre ainsi $11,760 \pm 2,545\%$ de la quantité injectée 10 minutes après l'administration aux souris. Si l'on compare les valeurs de quantité de L-carnitine présente dans les reins et celles de la quantité circulante, on constate qu'après 2 heures, on retrouve $2,200 \pm 0,187\%$ de L-carnitine dans le sang contre $7,093 \pm 0,617\%$ dans les reins, soit 3,2 fois moins. De même, au temps 4 heures, on retrouve $0,973 \pm 0,426\%$ de L-carnitine dans le sang contre $4,910 \pm 0,512\%$ dans les reins, soit 5 fois moins. La quantité circulante étant moins importante que la quantité présente dans les reins, cela nous permet d'affirmer, tout comme chez les souris adultes non gestantes, qu'il existe une accumulation rénale de L-carnitine.

Si l'on effectue la même comparaison pour le foie, on observe, après 2 heures, la présence de $2,067 \pm 0,042\%$ de L-carnitine (voir figure 46 ci-dessous), soit une quantité comparable à celle présente dans le sang. Après 4 heures, on retrouve $1,680 \pm 0,226\%$ de L-carnitine dans le foie, soit 1,7 fois plus que dans le sang. Ces résultats sont comparables à ceux qui avaient été obtenus chez les souris non gestantes, à savoir qu'il n'y a pas d'accumulation de L-carnitine dans le foie, et que la quantité présente dépend essentiellement de la quantité présente dans le sang.

Nous avons également cherché à évaluer la quantité de L-carnitine présente dans l'utérus. En effet, une certaine quantité était déjà présente chez les souris adultes non gestantes, et le but ici était de voir si la quantité retrouvée dans cet organe se trouvait modifiée, ce afin de soutenir l'hypothèse de passage de la barrière placentaire au cours de la gestation. On constate ainsi qu'après 2 heures, $1,827 \pm 0,150\%$ de la L-carnitine injectée est présente dans l'utérus (voir figure 46 ci-dessous). Cette quantité est légèrement inférieure à celle retrouvée dans le sang, il n'y a donc pas de phénomène d'accumulation de la molécule. Ces valeurs semblent plutôt indiquer un passage de la L-carnitine dans l'utérus, ce qui soutient potentiellement l'hypothèse d'un passage de la barrière placentaire.

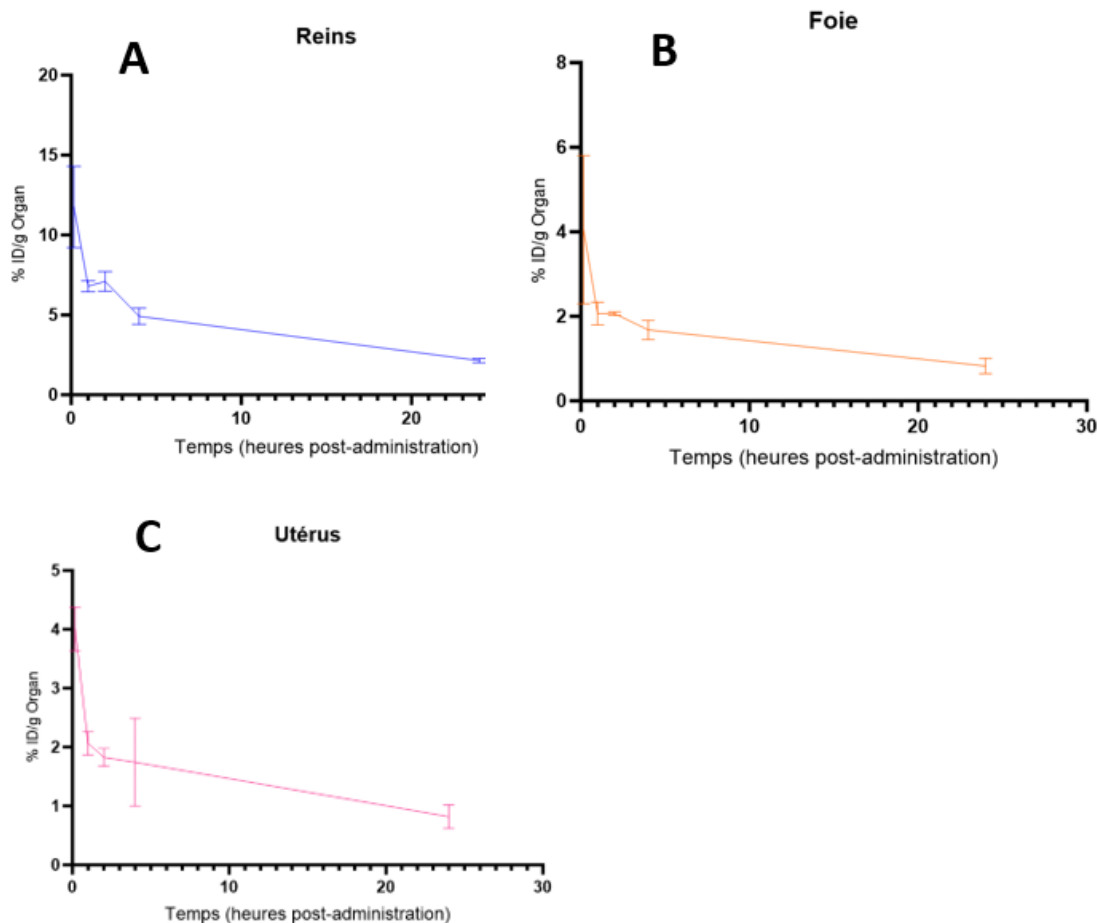


Figure 46. Graphiques présentant le pourcentage de L-carnitine en fonction du temps dans différents organes chez la femelle gestante après injection par voie intraveineuse. A= Reins ; B= Foie ; C= Utérus.

Le dernier organe d'intérêt que nous avons étudié chez la mère est l'encéphale. Les quantités de L-carnitine retrouvées lors de cette expérience sont, comme pour les deux cohortes précédentes, très faibles. Ainsi, 10 minutes après l'injection, on retrouve seulement $0,440 \pm 0,085\%$ de L-carnitine dans l'encéphale (voir figure 47 ci-dessous). Si l'on compare les pourcentages présents dans cet organe aux pourcentages sanguins, on obtient les résultats suivants : après 2 heures, l'encéphale contient $0,133 \pm 0,006\%$ de L-carnitine. Ceci représente 16 fois moins de L-carnitine que dans la circulation. Après 4 heures, la quantité retrouvée est de $0,087 \pm 0,025\%$, c'est-à-dire 11 fois moins de L-carnitine que dans le sang. Ainsi, on constate que, tout comme chez les souris non gestantes, une très faible proportion de L-carnitine a pu passer la barrière hémato-méningée. Ainsi, on peut extrapoler que cette barrière bloque 91% de la L-carnitine, contre 97% chez les femelles non gestantes. Il existe donc tout de même une faible différence entre les deux cohortes. On peut donc considérer la possibilité

que la gestation modifie la perméabilité de la barrière hémato-méningée, permettant ainsi le passage d'une plus grande quantité de L-carnitine.

Encéphale

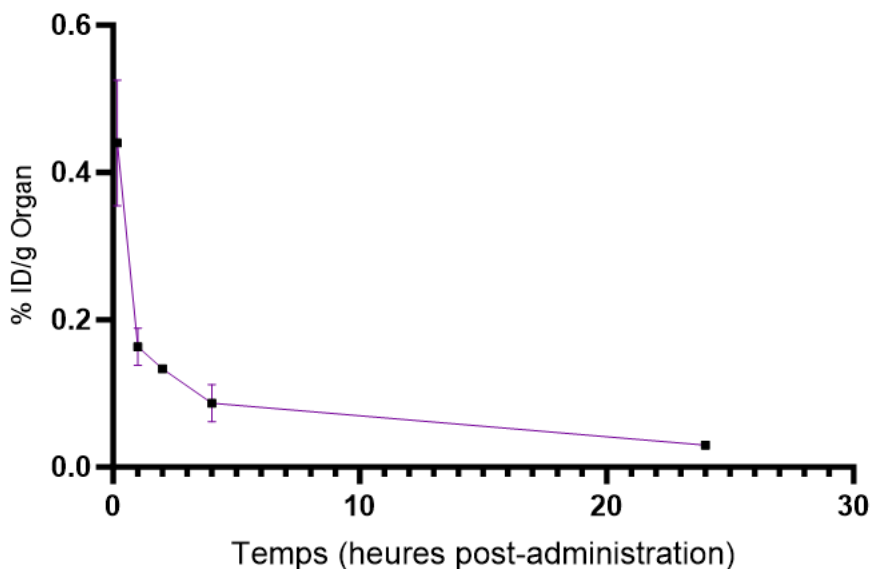


Figure 47. Graphique représentant la quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale, aux différents temps après administration par injection intraveineuse chez des souris gestantes.

Distribution chez le fœtus

Lorsque l'on compare les quantités retrouvées chez le fœtus aux quantités précédentes, on remarque qu'une quantité infime traverse effectivement la barrière placentaire. Afin d'évaluer la quantité parvenant jusqu'aux fœtus, nous nous sommes intéressés à la quantité de L-carnitine présent dans les placentas, le foie, l'encéphale et le cadavre fœtaux.

Dans un premier temps, on constate qu'une quantité importante de L-carnitine se retrouve dans le placenta (voir figure 48 ci-dessous). En effet, 10 minutes après l'injection, $3,253 \pm 0,318\%$ de L-carnitine sont présents dans les placentas. Si l'on effectue une comparaison avec la quantité circulante, comme il a été fait pour les organes des femelles gestantes, nous obtenons les résultats suivants : après 2 heures, les placentas contiennent $2,580 \pm 0,026\%$ de L-carnitine, valeur comparable

avec la valeur obtenue dans la circulation sanguine. Après 4 heures, on retrouve $2,693 \pm 0,758\%$ de L-carnitine dans les placentas contre $0,973 \pm 0,426\%$. Ainsi, la quantité placentaire reste relativement stable tandis que la quantité sanguine a tendance à diminuer. On constate alors qu'il reste moins de L-carnitine dans le sang que dans les placentas, traduisant une certaine accumulation de la molécule. Ce résultat appuie donc notre hypothèse de passage de la barrière placentaire.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux fœtus à proprement parler. Dans un premier temps, nous avons pu constater que les valeurs de pourcentage de L-carnitine étaient significativement non nulles, que ce soit dans le foie, l'encéphale, ou le cadavre des fœtus. La quantité retrouvée dans ces organes est très faible : 1 heure après injection, on retrouve $0,040 \pm 0,020\%$ de L-carnitine dans l'encéphale fœtal, $0,057 \pm 0,015\%$ dans le foie fœtal et $0,083 \pm 0,023\%$ dans le cadavre fœtal.

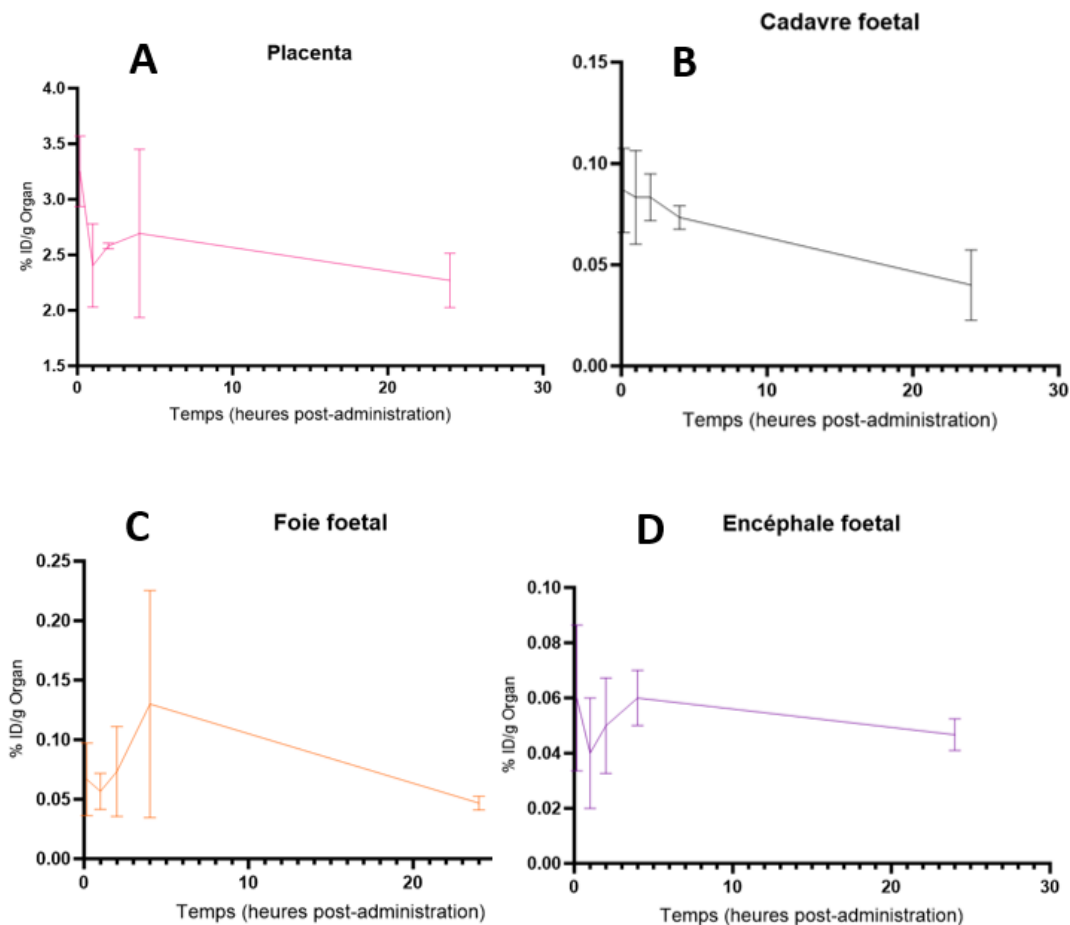


Figure 48. Graphiques représentant l'évolution de la quantité de L-carnitine chez le fœtus au cours du temps, après injection par voie intraveineuse chez les femelles gestantes. A= placentas ; B= Cadavre fœtal ; C= Foie fœtal ; D= Encéphale fœtal. Pour chaque organe, les valeurs ont été calculées systématiquement à partir de tous les fœtus d'une portée.

Ces valeurs sont bien moins importantes que celles retrouvées dans la circulation sanguine, il n'y a donc pas d'accumulation observable après une injection par voie intraveineuse chez la mère. En effet, si l'on effectue une comparaison aux temps 2 heures, 4 heures et 24 heures, on obtient les résultats suivants :

- Après 2 heures, on retrouve $0,073 \pm 0,038\%$ de L-carnitine dans le foie fœtal, soit 30 fois moins que dans la circulation sanguine. En parallèle, on retrouve $0,050 \pm 0,017\%$ de L-carnitine dans le cerveau fœtal, soit 44 fois moins que dans la circulation sanguine.
- Après 4 heures, on retrouve $0,130 \pm 0,095\%$ de L-carnitine dans le foie fœtal, soit 7,5 fois moins que dans la circulation sanguine. En parallèle, on retrouve $0,060 \pm 0,010\%$ de L-carnitine dans le cerveau fœtal, soit 16,2 fois moins que dans la circulation sanguine.
- Après 24 heures, on retrouve $0,047 \pm 0,006\%$ de L-carnitine dans le foie fœtal, soit 9,2 fois moins que dans la circulation sanguine. En parallèle, on retrouve $0,047 \pm 0,006\%$ de L-carnitine dans le cerveau fœtal, soit également 9,2 fois moins que dans la circulation sanguine.

Il est ensuite possible d'extrapoler ces valeurs pour évaluer le passage de la L-carnitine par la barrière placentaire. Si l'on additionne les valeurs obtenues pour le foie, l'encéphale et le cadavre des fœtus, on peut extrapoler que la barrière placentaire permet le passage de 27% de la L-carnitine d'après les résultats obtenus 4 heures après injection. Si l'on se base sur les valeurs obtenues 24 heures après injection, ce pourcentage passe à 31%. Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette expérience confirment notre hypothèse de passage de la barrière placentaire après injection de L-carnitine par voie intraveineuse chez des femelles gestantes.

b. Suivi longitudinal qualitatif

Au cours de cette expérience, nous avons de nouveau réalisé un suivi par imagerie afin de visualiser de manière globale la distribution de la radioactivité suite à l'injection de L-carnitine chez les femelles gestantes. L'acquisition d'images a été réalisée chez les fœtus aux différents temps de l'étude, afin de détecter les zones d'accumulation de la radioactivité.

Ces images nous ont permis de confirmer les résultats obtenus au comptage (résultats non montrés ici car n'ayant pas permis de tirer de conclusion supplémentaire). En effet, nous avons pu observer une quantité importante de radioactivité massée au niveau des placentas des fœtus. La sensibilité étant moins bonne qu'au comptage, les images ne nous ont pas permis pas de visualiser les faibles quantités de L-carnitine présentes dans le cerveau et l'encéphale des fœtus. L'imagerie nous permet ainsi une meilleure appréciation globale de la distribution de la L-carnitine dans les différents organes (principalement chez les souris adultes), mais ne nous apporte pas de nouvelles données concernant le captage par les différents organes, notamment à cause de taux trop faibles.

PARTIE 4

DISCUSSION

I. Objectifs de l'étude et résultats

Au cours de cette étude, l'objectif de mon travail était à la fois de caractériser la pharmacocinétique de la L-carnitine chez la souris adulte et la souris gestante, mais également d'objectiver un passage de la barrière placentaire par cette molécule, afin d'affiner notre connaissance de son mécanisme d'action et des possibilités thérapeutiques qui en découlent.

1. Chez les souris adultes non gestantes

Au sein de la cohorte de souris adultes non gestantes, notre objectif était d'établir des valeurs de base de biodistribution de la L-carnitine afin de permettre une meilleure interprétation des résultats obtenus chez les femelles gestantes.

Les résultats que nous avons obtenus ici sont compatibles avec ceux décrits dans la littérature. En effet, les deux expériences (injection par voie IV et administration PO) nous ont permis de mettre en évidence une excrétion majoritairement urinaire. Ceci avait déjà été observé au cours d'études de pharmacocinétique de la L-carnitine chez l'Homme (Martens, 2009) (Rebouche, 2004) (Reuter and Evans, 2012). Au cours de ces expériences, nous avons pu également mettre en évidence un cycle d'excrétion hépato-biliaire, après injection par voie intraveineuse. Ceci ne correspond pas à ce que l'on peut retrouver dans la littérature, où des métabolites de la L-carnitine sont retrouvés dans les selles uniquement lorsque l'administration a été réalisée par voie orale (Rebouche and Chenard, 1991).

En termes de captation de la L-carnitine par les organes, lors de l'expérience IV, la majorité de la quantité de L-carnitine a été retrouvée dans les organes liés au métabolisme et à l'excrétion de cette molécule (le foie et les reins), ainsi que dans les os. Cette observation est cohérente avec le fait qu'il a été montré que la L-carnitine pouvait avoir un effet bénéfique chez des patients atteints de fragilité osseuse (Terruzzi et al., 2019). La captation au niveau de l'encéphale était très faible, témoignant d'un

passage très limité de la barrière hémato-méningée. Or, il a déjà été montré dans la littérature que cette molécule avait la capacité de traverser cette barrière. Ceci a été observé via une augmentation de la concentration en L-carnitine au sein du liquide cérébro-spinal (Pennisi et al., 2020). De plus, on sait que le transport de L-carnitine de la circulation sanguine à l'encéphale se fait grâce à un transporteur de cations organiques appelé OCTN2, qui transporte la L-carnitine et le sodium (Jones et al., 2010). Il existe également dans la littérature des preuves du rôle du transporteur $B^{0,+}$, un transporteur dépendant des ions Na^+ et Cl^- , dans la captation de la L-carnitine par l'encéphale et dans les astrocytes (Nałecz et al., 2004). La différence entre nos résultats et ce qui est évoqué dans la littérature pourrait être imputée prioritairement aux modalités de notre étude (dose, durée) : a priori, la L-carnitine est censée passer la barrière hémato-méningée. Ici, l'hypothèse est qu'en modifiant la dose ou la durée d'administration, nous pourrions retrouver des résultats similaires à ceux décrits par les autres études.

Nous avons également pu observer que 24 heures après administration (par voie orale ou intraveineuse), une faible quantité de L-carnitine était toujours présente dans l'organisme ($98,707 \pm 7,134\%$ de L-carnitine éliminés après administration PO, et $68,277 \pm 1,917\%$ éliminés après administration par voie IV). Ceci s'accompagne d'une rémanence d'autant plus faible dans le principal organe d'intérêt de cette étude qu'est l'encéphale. Or, il a été montré que la L-carnitine avait un effet sur le développement neuronal chez la souris (Lanfranchi et al., 2020). Ceci nous permet donc de considérer plusieurs hypothèses sur le fonctionnement de cette molécule. Celles-ci sont développées dans la partie II.

L'expérience consistant à administrer la L-carnitine par voie orale nous a surtout permis de mettre en évidence la faible absorption intestinale de cette molécule, et nous a conforté dans l'idée qu'une administration chronique et/ou à plus grande dose serait nécessaire pour obtenir des résultats significatifs de quantité de L-carnitine dans les différents organes. Ceci est cohérent avec ce qui avait été obtenu chez l'Homme, où l'administration par voie orale nécessitait des doses beaucoup plus importantes que lors d'une injection par voie intraveineuse pour obtenir des taux circulants significatifs (Martens, 2009).

2. Chez les souris gestantes

L'objectif initial était de réaliser les mêmes expériences que pour les souris non gestantes, c'est-à-dire de travailler sur une cohorte pour laquelle l'administration de L-carnitine se faisait par injection intraveineuse et une autre pour laquelle on administrait la molécule par voie orale. Or, considérant les résultats que nous avons obtenus pour la cohorte PO chez les femelles non gestantes et les quantités très faibles retrouvées chez les fœtus après injection IV chez les femelles gestantes, il ne nous a pas paru pertinent de réaliser une expérience avec administration par voie orale. En effet, étant donné la faible absorption de la L-carnitine et le faible passage de la barrière placentaire, nous ne pouvions pas nous attendre à détecter suffisamment de L-carnitine chez les fœtus après une administration PO chez les mères.

Nous avons pu constater que la barrière hémato-méningée avait permis le passage d'une quantité plus importante de L-carnitine chez la souris gestante (9% contre 3%, soit trois fois plus que chez les souris adultes non gestantes), suggérant des modifications de perméabilités par rapport à l'expérience conduite sur la cohorte de souris non gestantes. Etant donné que la quantité de L-carnitine a également été amenée à varier au sein de différents organes, nous pouvons donc soulever l'hypothèse que la gestation, induisant un certain nombre de changements hormonaux, modifie la perméabilité de la barrière hémato-méningée et/ou modifie le métabolisme et la distribution de la L-carnitine. Ceci n'a pour l'instant pas été objectivé ni quantifié dans la littérature. Il faut néanmoins garder en tête que ces résultats dépendent également d'une variabilité individuelle.

Ensuite, nous avons pu confirmer notre hypothèse de passage de la barrière placentaire : en effet, une quantité significative de L-carnitine a été retrouvée dans les placentas, et nous avons également pu mettre en évidence de la L-carnitine au sein des fœtus, même s'il s'agissait d'une quantité très faible (9 à 44 fois moins que dans la circulation sanguine de la mère). Ceci a déjà été suggéré dans la littérature, par exemple dans une étude visant à montrer les bénéfices d'une supplémentation maternelle en L-carnitine chez les nouveau-nés ayant une mère fumeuse (Chan et al., 2017). Cette étude a été réalisée sur des souris, et a montré qu'il existait effectivement

un intérêt à supplémenter la mère en L-carnitine pour pallier **les** conséquences du tabagisme dans l'encéphale des nourrissons. Il existe également d'autres études, réalisées notamment sur des porcs et visant à montrer l'effet d'une supplémentation maternelle en L-carnitine sur divers paramètres sanguins et physiologiques chez le nouveau-né (Rooney et al., 2019). Néanmoins, l'interprétation des résultats obtenus chez les fœtus doit rester prudente au vu des quantités extrêmement faibles de L-carnitine retrouvées dans les organes fœtaux.

Une étude réalisée en 1985 consistant à évaluer le passage de la L-carnitine à travers le placenta chez l'Homme a montré qu'il existait effectivement un captage de la L-carnitine par le placenta, mais que celle-ci y était métabolisée et ne passait pas dans la circulation fœtale (Schmidt-Sommerfeld et al., 1985). Ces résultats font écho à ceux que nous avons obtenus au sein de notre étude, et pourraient expliquer les faibles quantités de L-carnitine que nous avons retrouvées dans les organes fœtaux.

II. Hypothèses et perspectives

1. Biais liés aux modalités des différentes expériences

Tout d'abord, l'une des explications possibles à la faible quantité de L-carnitine présente dans l'encéphale de la souris adulte ou du fœtus serait que la dose utilisée n'était pas suffisante. En effet, nous avons ici administré une dose de 100 ng de L-carnitine par souris, représentant une dose comprise entre 5 et 6,7 µg/kg. Or, dans la littérature, les doses utilisées sont plutôt de l'ordre de 25 (Rebouche, 2004) à 30 mg/kg chez l'Homme (Martens, 2009). Dans des études menées chez la souris, on retrouve même des doses de l'ordre de 200 mg/kg (Mollica et al., 2020). De plus, il serait également possible d'augmenter la quantité totale de radioactivité injectée afin d'obtenir un meilleur signal. En effet, les doses injectées ici ont été situées entre 2 et 3 MBq, sachant que l'on peut augmenter ces doses jusqu'à 40 MBq sans atteindre le seuil de toxicité.

Ceci soulève la possibilité que pour avoir des résultats pertinents et intéressants dans le cadre d'une utilisation chez l'Homme plus tard, il faudrait potentiellement reconduire l'étude en administrant la L-carnitine à plus forte dose, en injectant une quantité totale de radioactivité plus importante ou sur une plus longue durée (par exemple plusieurs

jours ou plusieurs semaines, comme cela avait été le cas dans l'étude initialement conduite sur les femelles gestantes et allaitantes, pour lesquelles la L-carnitine avait été introduite dans l'eau de boisson (à hauteur d'environ 133 mg/kg par souris et par jour) de la détection de la gestation (E13.5) jusqu'à 21 jours après la mise-bas (P21) (Lanfranchi et al., 2020). Cette étude chronique permettrait donc peut-être de visualiser une accumulation de la L-carnitine, notamment dans l'encéphale qui est notre principal organe d'intérêt. Cependant, ces modalités d'administration présenteraient un inconvénient puisqu'en utilisant une quantité plus importante de radioactivité, il serait possible d'étudier l'effet sur une durée plus longue mais pas d'effectuer des administrations répétées.

2. Hypothèses sur les modalités d'action possibles de la L-carnitine

Comme nous avons pu le constater, la barrière hémato-méningée permet le passage d'une quantité très faible de L-carnitine, entraînant un captage d'autant plus faible par l'encéphale. Or, il a été montré que la L-carnitine avait un effet bénéfique sur le développement neuronal, mais également qu'elle présentait des effets similaires à ceux d'un antidépresseur (Cherix et al., 2020) (Nasca et al., 2013), notamment via une stimulation de la sécrétion de sérotonine et de noradrénaline (Smeland et al., 2012). Ceci doit nous amener à considérer diverses hypothèses concernant son mode de fonctionnement, qui pourrait ne pas être direct au vu des résultats obtenus.

Dans un premier temps, comme il a été développé plus haut, une administration chronique et/ou avec une dose de L-carnitine plus importante serait à expérimenter afin d'étudier les modifications induites sur la biodistribution, et de ce fait sur le captage par l'encéphale. Cette hypothèse est, à la suite de notre étude, celle qui nous paraît la plus pertinente.

Ensuite, il est possible que la L-carnitine possède une action indirecte, notamment via une action sur le microbiote. En effet, il a été démontré, dans la littérature, un lien entre microbiote et autisme chez l'Homme, et entre microbiote intestinal et troubles du comportement chez la souris. Certaines études s'intéressent ainsi au liens entre troubles gastro-intestinaux et troubles du comportement chez les personnes atteintes de TSA (Saurman et al., 2020). Il semblerait, plus particulièrement, que l'alimentation consommée ait des conséquences sur l'évolution de ces troubles. En effet, la consommation de fibres permet de produire des acides gras à chaîne courte, pouvant

entraîner des conséquences bénéfiques comme délétères sur le développement neuronal des patients. (Taniya et al., 2022). De nombreuses études ont été menées, notamment une qui a permis de montrer qu'en effectuant une transplantation de bactéries intestinales de souris sociables à des souris anxieuses et inversement, on observait qu'après 3 semaines seulement, les souris anxieuses devenaient plus sociables, avec une meilleure réponse aux stimuli, et les souris sociables devenaient plus anxieuses avec un délai de réponse plus long à ces mêmes stimuli (Sharon et al., 2019). Cette étude, comme beaucoup d'autres conduites récemment, contribue à expliciter le lien entre microbiote intestinal et système nerveux, plus précisément entre ce dernier et le système nerveux entérique (Taniya et al., 2022).

Il se pourrait également que la L-carnitine agisse sur le cerveau indirectement en agissant sur un autre organe, par exemple les muscles. A ce sujet, il est intéressant de noter que la L-carnitine a un tropisme fort pour le muscle dans notre étude, ce qui conforte les études chez l'Homme montrant une accumulation de la L-carnitine dans le muscle. En effet, il est connu que les muscles sont en lien étroit avec le système nerveux, étant donné notamment que l'exercice physique possède des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives des individus (Zoladz and Pilc, 2010). Des études menées au cours des dernières années ont également montré que l'exercice physique (donc le développement musculaire), peut permettre de prévenir l'apparition de certaines pathologies neurodégénératives chez l'Homme. Par exemple, des exercices d'aérobique chez un groupe d'individus auraient permis de prévenir la diminution de volume de l'hippocampe, permettant ainsi d'obtenir des améliorations en termes de mémoire spatiale (Erickson et al., 2011). D'autres études soulèvent le fait que l'inactivité physique soit un facteur de risque important de développement de la démence (Pani et al., 2022). Il serait donc envisageable que, via un effet sur les muscles, la L-carnitine permette un rétablissement du développement neuronal normal chez le souriceau.

Il est également possible de considérer que la L-carnitine n'agit pas directement au sein de l'encéphale, mais plutôt qu'elle permet l'activation ou la synthèse d'une autre molécule qui elle, possède un effet bénéfique sur le développement neuronal.

De la même façon, il est envisageable que la L-carnitine permette simplement une amélioration du métabolisme général, ayant pour conséquence de favoriser un développement neuronal normal.

3. Passage au souriceau chez les souris allaitantes

Afin de compléter les résultats obtenus grâce aux expériences menées au sein de cette étude, il serait également intéressant de quantifier, s'il existe, le potentiel passage de la L-carnitine au souriceau au cours de l'allaitement. En effet, lors de l'étude qui avait permis de mettre en évidence le rôle de la L-carnitine dans le cadre des troubles du neurodéveloppement, celle-ci avait été administrée pendant et après la gestation.

Evaluer le passage au souriceau au cours de l'allaitement nous permettrait de préciser la fenêtre de passage de la L-carnitine (gestation ou allaitement). Ainsi, des expériences sont d'ores et déjà planifiées afin de déterminer si oui ou non il existe un passage de la L-carnitine dans le lait, et si la molécule s'y retrouve en quantité suffisante pour induire un effet bénéfique sur les souriceaux.

Il est en effet indispensable de préciser le stade physiologique auquel la L-carnitine exerce son effet : selon le moment d'administration (durant la gestation ou au cours de l'allaitement), la proposition thérapeutique serait modifiée. Etant donné que la détection de l'autisme se fait autour de 4 ans chez l'enfant, il est difficile d'envisager un traitement au cours de la gestation. Ainsi, il est nécessaire de caractériser plus précisément la fenêtre d'action de la L-carnitine chez la souris avant de pouvoir envisager des essais cliniques chez l'Homme.

CONCLUSION

Le travail réalisé au cours de cette étude nous a permis de caractériser la pharmacocinétique de la L-carnitine, tant chez la souris adulte saine que chez la souris gestante. Nous avons désormais une meilleure appréciation de sa distribution et de son accumulation dans les différents organes suite à l'administration par voie intraveineuse, principalement dans le foie, les reins et les os. L'encéphale, qui était notre principal organe d'intérêt, a montré une captation très faible de L-carnitine, malgré ce que l'on sait de l'efficacité de cette molécule dans le cadre des troubles du neurodéveloppement. Les quantités retrouvées chez le fœtus ont permis de mettre en évidence un passage de la barrière placentaire, malgré des quantités mesurées très faibles. La L-carnitine présente une trop faible absorption intestinale pour être retrouvée en quantité suffisante dans les différents organes à la suite d'une administration unique par voie orale, ce qui permet d'envisager les prochaines expériences, notamment chez des souris allaitantes, avec des modalités différentes (durée et/ou dose plus importantes) afin d'espérer obtenir des quantités significativement plus importantes dans l'encéphale. Les prochaines expériences réalisées sur souris allaitantes devraient permettre d'affiner les résultats obtenus au cours de cette étude et de pouvoir proposer, à termes, des modalités plus précises d'administration de la L-carnitine dans le cadre du traitement des TSA.

En conclusion, mon travail de thèse guidera de futures études visant à déterminer la fenêtre thérapeutique de la L-carnitine dans des modèles murins de troubles du neurodéveloppement, et constitue un pas vers une potentielle application à terme chez l'homme

BIBLIOGRAPHIE

Adeva-Andany, M. M., I. Calvo-Castro, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García, and A. M. Pedre-Piñeiro, 2017, Significance of L-carnitine for human health : IUBMB Life, v. 69, no. 8, p. 578–594, doi :10.1002/iub.1646.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, 2002, General Principles of Cell Communication, *in* Molecular Biology of the Cell. 4th edition : Garland Science.

Al-Dhuayan, I. S., 2023, Biomedical role of L-carnitine in several organ systems, cellular tissues, and COVID-19 : Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia, v. 82, p. e267633, doi:10.1590/1519-6984.267633.

Aleman, S. et al., 2015, New suggestive genetic loci and biological pathways for attention function in adult attention-deficit/hyperactivity disorder : American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics, v. 168, no. 6, p. 459–470, doi :10.1002/ajmg.b.32341.

Alessi, D. R., K. Sakamoto, and J. R. Bayascas, 2006, LKB1-dependent signaling pathways : Annual Review of Biochemistry, v. 75, p. 137–163, doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142702.

Anderson, S. et al., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome : Nature, v. 290, no. 5806, p. 457–465, doi :10.1038/290457a0.

Åstrand, P.-O., and K. Rodahl, 1994, Précis de physiologie de l'exercice musculaire : Elsevier Masson, 552 p.

Autisme, la piste génétique, 2019 : <<https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/dossiers/autisme-piste-genetique>> (accessed June 28, 2023).

Baas, A. F., J. Kuipers, N. N. van der Wel, E. Batlle, H. K. Koerten, P. J. Peters, and H. C. Clevers, 2004, Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD : Cell, v. 116, no. 3, p. 457–466, doi :10.1016/s0092-8674(04)00114-x.

Banerjee, S., A. Zagórska, M. Deak, D. G. Campbell, A. R. Prescott, and D. R. Alessi, 2014, Interplay between Polo kinase, LKB1-activated NUA1 kinase, PP1 β MYPT1

phosphatase complex and the SCF β TrCP E3 ubiquitin ligase : *The Biochemical Journal*, v. 461, no. 2, p. 233–245, doi :10.1042/BJ20140408.

Barnes, A. P., B. N. Lilley, Y. A. Pan, L. J. Plummer, A. W. Powell, A. N. Raines, J. R. Sanes, and F. Polleux, 2007, LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons : *Cell*, v. 129, no. 3, p. 549–563, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.025.

Bélanger, M., I. Allaman, and P. J. Magistretti, 2011, Brain energy metabolism : focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation: *Cell Metabolism*, v. 14, no. 6, p. 724–738, doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.

BOUCHEZ Cyrielle, 2020, Étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* : Bordeaux, 333 p.

Bremer, J., 1983, Carnitine--metabolism and functions : *Physiological Reviews*, v. 63, no. 4, p. 1420–1480, doi :10.1152/physrev.1983.63.4.1420.

Chan, Y. L., S. Saad, I. Al-Odat, B. G. Oliver, C. Pollock, N. M. Jones, and H. Chen, 2017, Maternal L-Carnitine Supplementation Improves Brain Health in Offspring from Cigarette Smoke Exposed Mothers : *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, p. 33, doi:10.3389/fnmol.2017.00033.

Chaste, P., and M. Leboyer, 2012, Autism risk factors : genes, environment, and gene-environment interactions: *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 14, no. 3, p. 281–292, doi :10.31887/DCNS.2012.14.3/pchaste.

Cherix, A., T. Larrieu, J. Grosse, J. Rodrigues, B. McEwen, C. Nasca, R. Gruetter, and C. Sandi, 2020, Metabolic signature in nucleus accumbens for anti-depressant-like effects of acetyl-L-carnitine : *eLife*, v. 9, p. e50631, doi:10.7554/eLife.50631.

Courchet, J., T. L. Lewis, S. Lee, V. Courchet, D.-Y. Liou, S. Aizawa, and F. Polleux, 2013, Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture : *Cell*, v. 153, no. 7, p. 1510–1525, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.021.

Courchet, V., A. J. Roberts, G. Meyer-Dilhet, P. Del Carmine, T. L. Lewis, F. Polleux, and J. Courchet, 2018, Haploinsufficiency of autism spectrum disorder candidate gene NUAK1 impairs cortical development and behavior in mice, 1 : *Nature Communications*, v. 9, no. 1, p. 4289, doi :10.1038/s41467-018-06584-5.

Ellouze, S., 2023, Alterations of cortical circuits in mice following premature brain injuries, phdthesis : Claude Bernard Lyon 1, 204 p.

Erickson, K. I. et al., 2011, Exercise training increases size of hippocampus and improves memory : Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 108, no. 7, p. 3017–3022, doi :10.1073/pnas.1015950108.

Escalona, E., M. Muñoz, R. Pincheira, Á. A. Elorza, and A. F. Castro, 2020, Cytosolic NUAK1 Enhances ATP Production by Maintaining Proper Glycolysis and Mitochondrial Function in Cancer Cells : Frontiers in Oncology, v. 10, p. 1123, doi:10.3389/fonc.2020.01123.

Faits, M. C., C. Zhang, F. Soto, and D. Kerschensteiner, 2016, Dendritic mitochondria reach stable positions during circuit development : eLife, v. 5, p. e11583, doi:10.7554/eLife.11583.

Fan, X., and Y. Agid, 2018, At the Origin of the History of Glia : Neuroscience, v. 385, p. 255–271, doi:10.1016/j.neuroscience.2018.05.050.

Faria-Pereira, A., and V. A. Morais, 2022, Synapses : The Brain's Energy-Demanding Sites: International Journal of Molecular Sciences, v. 23, no. 7, p. 3627, doi :10.3390/ijms23073627.

Ferreira, G. C., and M. C. McKenna, 2017, L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain : Neurochemical Research, v. 42, no. 6, p. 1661–1675, doi :10.1007/s11064-017-2288-7.

Guan, S., L. Zhao, and R. Peng, 2022, Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes : From Structure to Function: International Journal of Molecular Sciences, v. 23, no. 22, p. 13880, doi :10.3390/ijms232213880.

Gyawali, A., S. J. Hyeon, H. Ryu, and Y.-S. Kang, 2021, The Alteration of L-Carnitine Transport and Pretreatment Effect under Glutamate Cytotoxicity on Motor Neuron-Like NSC-34 Lines : Pharmaceutics, v. 13, no. 4, p. 551, doi :10.3390/pharmaceutics13040551.

Houten, S. M., and R. J. A. Wanders, 2010, A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation : Journal of Inherited Metabolic Disease, v. 33, no. 5, p. 469–477, doi :10.1007/s10545-010-9061-2.

Iossifov, I. et al., 2012, De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum : *Neuron*, v. 74, no. 2, p. 285–299, doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.009.

Johnson, M. R. et al., 2016, Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease : *Nature Neuroscience*, v. 19, no. 2, p. 223–232, doi :10.1038/nn.4205.

Jones, L. L., D. A. McDonald, and P. R. Borum, 2010, Acylcarnitines : Role in brain: *Progress in Lipid Research*, v. 49, no. 1, p. 61–75, doi: 10.1016/j.plipres.2009.08.004.

Kim, H., M. Kim, S.-K. Im, and S. Fang, 2018, Mouse Cre-LoxP system : general principles to determine tissue-specific roles of target genes: *Laboratory Animal Research*, v. 34, no. 4, p. 147–159, doi :10.5625/lar.2018.34.4.147.

Lanfranchi, M., G. Meyer-Dilhet, R. D. Reis, A. Garcia, C. Blondet, L. Javin, A. Amar, and J. Courchet, 2020, The AMPK-related kinase NUA1 controls cortical axons branching through a local modulation of mitochondrial metabolic functions : *bioRxiv*, p. 2020.05.18.102582, doi:10.1101/2020.05.18.102582.

Lemarie Fanny, 2016, Impact de l'acide octanoïque alimentaire sur l'octanoylation de la Ghréline, chez le rat : *Agrocampus Ouest*, 195 p.

Lewis, T. L., J. Courchet, and F. Polleux, 2013, Cell biology in neuroscience : Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching: *The Journal of Cell Biology*, v. 202, no. 6, p. 837–848, doi :10.1083/jcb.201305098.

Longo, N., M. Frigeni, and M. Pasquali, 2016, Carnitine transport and fatty acid oxidation : *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1863, no. 10, p. 2422–2435, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.023.

Lukens, J. R., and U. B. Eyo, 2022, Microglia and Neurodevelopmental Disorders : *Annual Review of Neuroscience*, v. 45, p. 425–445, doi:10.1146/annurev-neuro-110920-023056.

Maenner, M. J., 2023, Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020 : *MMWR. Surveillance Summaries*, v. 72, doi :10.15585/mmwr.ss7202a1.

Martens, F., 2009, Appréciation de l'effet de la L-carnitine sur les posologies d'érythropoïétine chez l'hémodialysé chronique.

McPartland, J., and F. R. Volkmar, 2012, Autism and related disorders : Handbook of Clinical Neurology, v. 106, p. 407–418, doi:10.1016/B978-0-444-52002-9.00023-1.

Minschew, N. J., and D. L. Williams, 2007, The New Neurobiology of Autism : Archives of neurology, v. 64, no. 7, p. 945–950, doi :10.1001/archneur.64.7.945.

Misgeld, T., and T. L. Schwarz, 2017, Mitostasis in Neurons : Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture: Neuron, v. 96, no. 3, p. 651–666, doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.055.

Molina, E., and L. Hong, 2021, NUA Kinases : Brain-Ovary Axis: Cells, v. 10, doi:10.3390/cells10102760.

Mollica, G., P. Senesi, R. Codella, F. Vacante, A. Montesano, L. Luzi, and I. Terruzzi, 2020, L-carnitine supplementation attenuates NAFLD progression and cardiac dysfunction in a mouse model fed with methionine and choline-deficient diet : Digestive and Liver Disease, v. 52, no. 3, p. 314–323, doi: 10.1016/j.dld.2019.09.002.

Morris-Rosendahl, D. J., and M.-A. Crocq, 2020, Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept : Dialogues in Clinical Neuroscience, v. 22, no. 1, p. 65–72, doi :10.31887/DCNS.2020.22.1/macrocq.

Nalecz, K. A., D. Miecz, V. Berezowski, and R. Cecchelli, 2004, Carnitine : transport and physiological functions in the brain: Molecular Aspects of Medicine, v. 25, no. 5–6, p. 551–567, doi: 10.1016/j.mam.2004.06.001.

Nasca, C. et al., 2013, L-acetylcarnitine causes rapid antidepressant effects through the epigenetic induction of mGlu2 receptors : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, no. 12, p. 4804–4809, doi :10.1073/pnas.1216100110.

Nunnari, J., and A. Suomalainen, 2012, Mitochondria : in sickness and in health: Cell, v. 148, no. 6, p. 1145–1159, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.

Padmanabhan, P., J. Grosse, A. B. M. A. Asad, G. K. Radda, and X. Golay, 2013, Gastrointestinal transit measurements in mice with 99mTc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT : EJNMMI research, v. 3, no. 1, p. 60, doi :10.1186/2191-219X-3-60.

Pani, J., C. Marzi, D. Stensvold, U. Wisløff, A. K. Håberg, and S. Diciotti, 2022, Longitudinal study of the effect of a 5-year exercise intervention on structural brain

complexity in older adults. A Generation 100 substudy : *NeuroImage*, v. 256, p. 119226, doi:10.1016/j.neuroimage.2022.119226.

Parenti, I., L. G. Rabaneda, H. Schoen, and G. Novarino, 2020, Neurodevelopmental Disorders : From Genetics to Functional Pathways: *Trends in Neurosciences*, v. 43, no. 8, p. 608–621, doi: 10.1016/j.tins.2020.05.004.

Pathak, D., K. J. Sepp, and P. J. Hollenbeck, 2010, Evidence That Myosin Activity Opposes Microtubule-Based Axonal Transport of Mitochondria : *The Journal of Neuroscience*, v. 30, no. 26, p. 8984–8992, doi :10.1523/JNEUROSCI.1621-10.2010.

Pennisi, M., G. Lanza, M. Cantone, E. D'Amico, F. Fisicaro, V. Puglisi, L. Vinciguerra, R. Bella, E. Vicari, and G. Malaguarnera, 2020, Acetyl-L-Carnitine in Dementia and Other Cognitive Disorders : A Critical Update: *Nutrients*, v. 12, no. 5, p. 1389, doi :10.3390/nu12051389.

Radu, A. G. et al., 2019, LKB1 specifies neural crest cell fates through pyruvate-alanine cycling : *Science Advances*, v. 5, no. 7, p. eaau5106, doi :10.1126/sciadv.aau5106.

Rangaraju, V., N. Calloway, and T. A. Ryan, 2014, Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function : *Cell*, v. 156, no. 4, p. 825–835, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042.

Rangaraju, V., M. Lauterbach, and E. M. Schuman, 2019, Spatially Stable Mitochondrial Compartments Fuel Local Translation during Plasticity : *Cell*, v. 176, no. 1–2, p. 73-84. e15, doi:10.1016/j.cell.2018.12.013.

Rebouche, C. J., 2004, Kinetics, Pharmacokinetics, and Regulation of L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Metabolism : *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1033, no. 1, p. 30–41, doi :10.1196/annals.1320.003.

Rebouche, C. J., and C. A. Chenard, 1991, Metabolic fate of dietary carnitine in human adults : identification and quantification of urinary and fecal metabolites: *The Journal of Nutrition*, v. 121, no. 4, p. 539–546, doi :10.1093/jn/121.4.539.

Reuter, S. E., and A. M. Evans, 2012, Carnitine and acylcarnitines : pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects: *Clinical Pharmacokinetics*, v. 51, no. 9, p. 553–572, doi :10.1007/BF03261931.

Ronzano, R., 2017, [Astrocytes and microglia : active players in synaptic plasticity]: *Medicine Sciences: M/S*, v. 33, no. 12, p. 1071–1078, doi :10.1051/medsci/20173312014.

Rooney, H. B., K. O'Driscoll, J. V. O'Doherty, and P. G. Lawlor, 2019, Effect of l-carnitine supplementation and sugar beet pulp inclusion in gilt gestation diets on gilt live weight, lactation feed intake, and offspring growth from birth to slaughter¹ : *Journal of Animal Science*, v. 97, no. 10, p. 4208–4218, doi :10.1093/jas/skz268.

Rossi, M. J., and G. Pekkurnaz, 2019, Powerhouse of the Mind : Mitochondrial Plasticity at the Synapse: *Current opinion in neurobiology*, v. 57, p. 149–155, doi:10.1016/j.conb.2019.02.001.

Salcedo-Arellano, M. J., R. J. Hagerman, and V. Martínez-Cerdeño, 2020, Fragile X syndrome : clinical presentation, pathology and treatment: *Gaceta Medica De Mexico*, v. 156, no. 1, p. 60–66, doi :10.24875/GMM.19005275.

Sandin, S., P. Lichtenstein, R. Kuja-Halkola, H. Larsson, C. M. Hultman, and A. Reichenberg, 2014, THE FAMILIAL RISK OF AUTISM : *JAMA*, v. 311, no. 17, p. 1770–1777, doi :10.1001/jama.2014.4144.

Satoh, D., and S. Arber, 2013, Carving Axon Arbors to Fit : Master Directs One Kinase at a Time: *Cell*, v. 153, no. 7, p. 1425–1426, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.047.

Saurman, V., K. G. Margolis, and R. A. Luna, 2020, Autism Spectrum Disorder as a Brain-Gut-Microbiome Axis Disorder : *Digestive Diseases and Sciences*, v. 65, no. 3, p. 818–828, doi :10.1007/s10620-020-06133-5.

Schmidt-Sommerfeld, E., D. Penn, R. J. Sodha, M. Prögler, M. Novak, and H. Schneider, 1985, Transfer and Metabolism of Carnitine and Carnitine Esters in the in Vitro Perfused Human Placenta, 7 : *Pediatric Research*, v. 19, no. 7, p. 700–706, doi :10.1203/00006450-198507000-00013.

Shah, A. M., and F. E. Wondisford, 2020, Reply to Hernández—Glycolysis and gluconeogenesis : A teaching view: *The Journal of Biological Chemistry*, v. 296, p. 100021, doi:10.1016/j.jbc.2020.100021.

Sharon, G. et al., 2019, Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice : *Cell*, v. 177, no. 6, p. 1600-1618.e17, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.004.

Shelly, M., L. Cancedda, S. Heilshorn, G. Sumbre, and M.-M. Poo, 2007, LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization : *Cell*, v. 129, no. 3, p. 565–577, doi: 10.1016/j.cell.2007.04.012.

Smeland, O. B., T. W. Meisingset, K. Borges, and U. Sonnewald, 2012, Chronic acetyl-L-carnitine alters brain energy metabolism and increases noradrenaline and serotonin content in healthy mice : *Neurochemistry International*, v. 61, no. 1, p. 100–107, doi: 10.1016/j.neuint.2012.04.008.

Smolders, S., 2017, Microglial migration and adhesion molecules during embryonic brain development, phdthesis : Université Pierre et Marie Curie - Paris VI ; Universiteit Hasselt (1970-....).

Spillane, M., A. Ketschek, T. T. Merianda, J. L. Twiss, and G. Gallo, 2013, Mitochondria Coordinate Sites of Axon Branching through Localized Intra-axonal Protein Synthesis : *Cell Reports*, v. 5, no. 6, p. 1564–1575, doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.022.

Su, Y., S. Bian, and M. Sawan, 2020, Real-time in vivo detection techniques for neurotransmitters : a review: *The Analyst*, v. 145, no. 19, p. 6193–6210, doi :10.1039/d0an01175d.

Südhof, T. C., 2021, The cell biology of synapse formation : *The Journal of Cell Biology*, v. 220, no. 7, p. e202103052, doi :10.1083/jcb.202103052.

Taniya, M. A. et al., 2022, Role of Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder and Its Therapeutic Regulation : *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 915701, doi:10.3389/fcimb.2022.915701.

Terruzzi, I. et al., 2019, L-Carnitine Reduces Oxidative Stress and Promotes Cells Differentiation and Bone Matrix Proteins Expression in Human Osteoblast-Like Cells : *BioMed Research International*, v. 2019, p. 5678548, doi:10.1155/2019/5678548.

Thapar, A., and M. Rutter, 2021, Genetic Advances in Autism : *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 51, no. 12, p. 4321–4332, doi :10.1007/s10803-020-04685-z.

Turcotte, L. P., 2003, Mitochondria : Biogenesis, Structure, and Function—Symposium Introduction: *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 35, no. 1, p. 82.

Vidal 2001 : le dictionnaire. 77e éd. Paris : Ed. Du Vidal, 2001, 2343 et 256 p., n.d.

Villedieu, C., 2018, Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection : effet du vieillissement.

Vojinovic, D. et al., 2018, Genome-wide association study of 23,500 individuals identifies 7 loci associated with brain ventricular volume, 1 : Nature Communications, v. 9, no. 1, p. 3945, doi :10.1038/s41467-018-06234-w.

Williams, R. W., and K. Herrup, 1988, The control of neuron number : Annual Review of Neuroscience, v. 11, p. 423–453, doi:10.1146/annurev.ne.11.030188.002231.

Zanelli, S. A., N. J. Solenski, R. E. Rosenthal, and G. Fiskum, 2005, Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine : Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1053, p. 153–161, doi:10.1196/annals.1344.013.

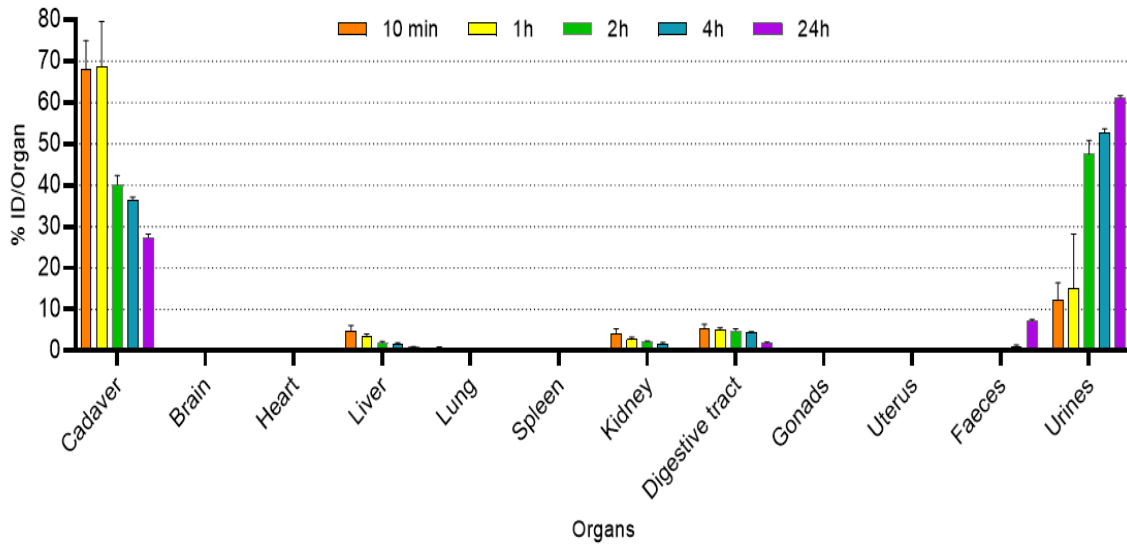
Zerimech, S., 2019, Dépression Corticale Envahissante : nouveau mécanisme d'initiation par hyperactivité des neurones GABAergiques, et stratégie pharmacologique pour la réduire, phdthesis : COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019).

Zhao, F., 2020, Mise en place du dépistage néonatal du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (MCAD) par spectrométrie de masse en tandem: Grenoble Alpes.

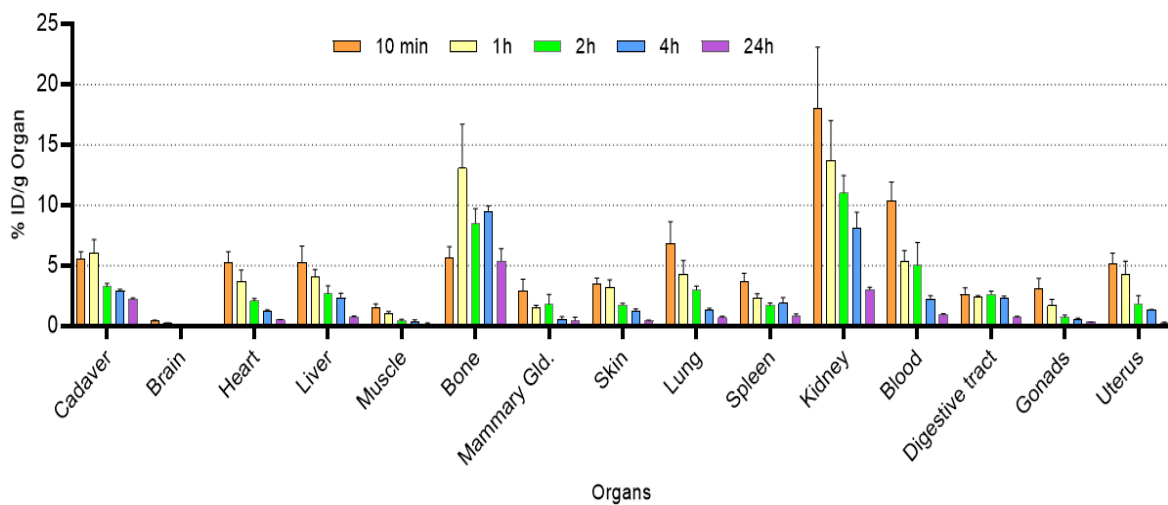
Zoladz, J. A., and A. Pilc, 2010, The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor : from animal to human studies: Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society, v. 61, no. 5, p. 533–541.

ANNEXES

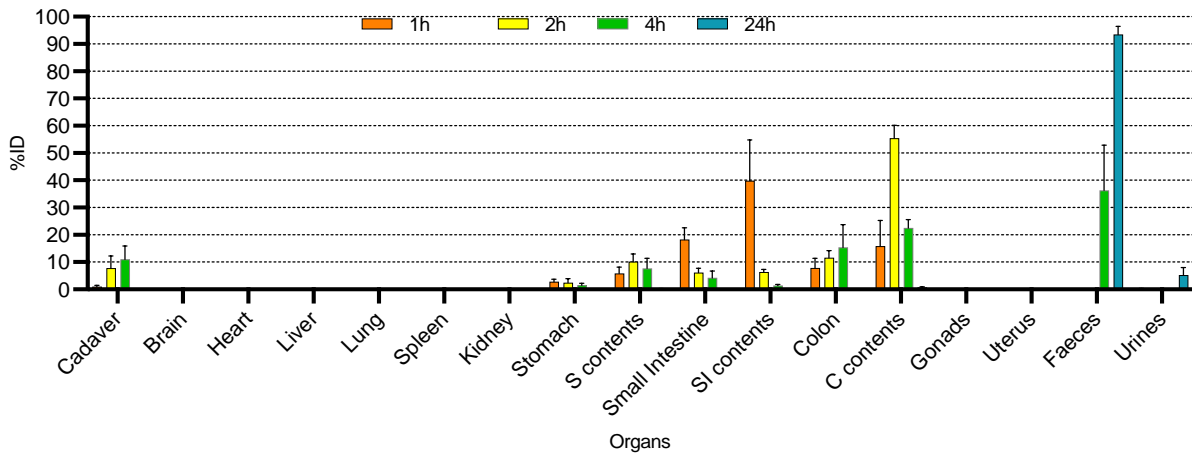
Annexe 1. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par organe, aux différents temps de l'étude suite à l'injection par voie intra-veineuse chez les souris non gestantes. On remarque que certains organes, tels que le cerveau et le cœur, ne montrent pas de signe de stockage de L-carnitine.



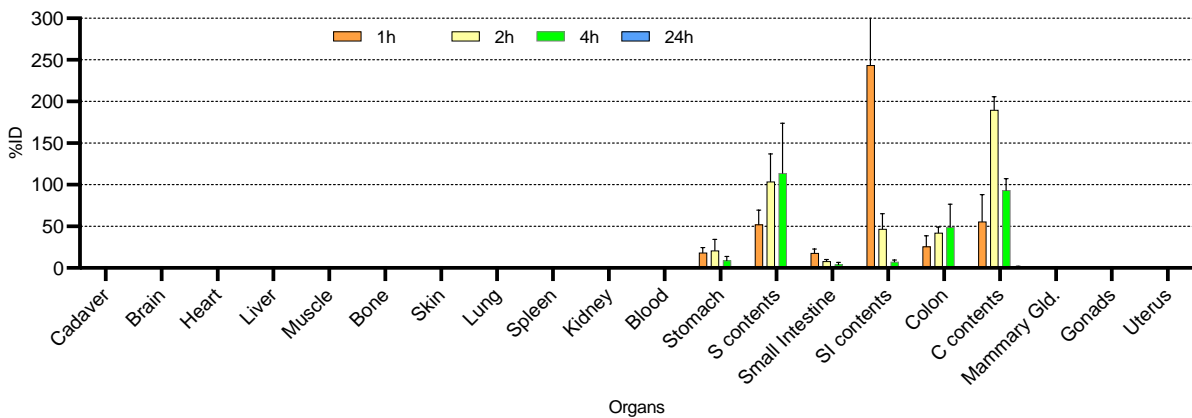
Annexe 2. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe, aux différents temps de l'étude suite à l'injection par voie intra-veineuse chez les souris non gestantes. On retrouve une distribution globale de la L-carnitine au sein de l'organisme, avec des proportions différentes selon l'organe considéré.



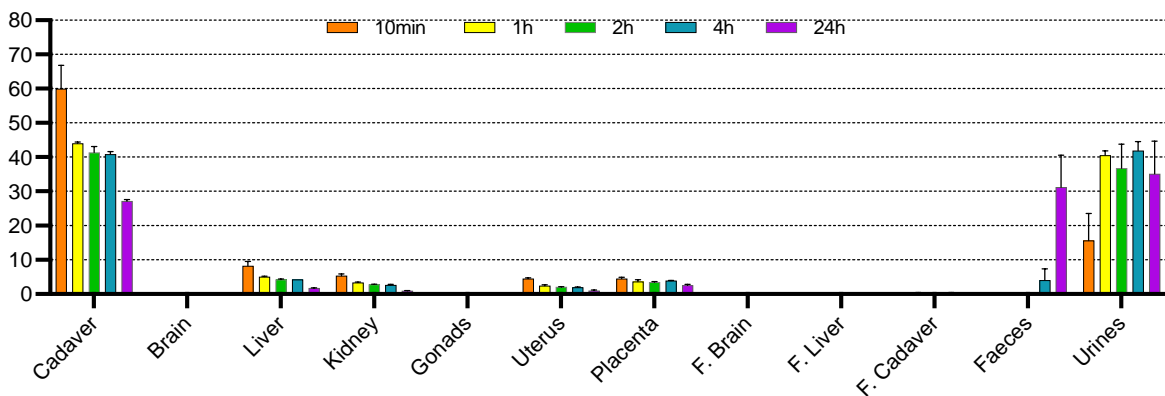
Annexe 3. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par organe, aux différents temps de l'étude, à la suite de l'administration PO de L-carnitine. On remarque que l'absorption de la L-carnitine au niveau intestinal est un facteur limitant important.



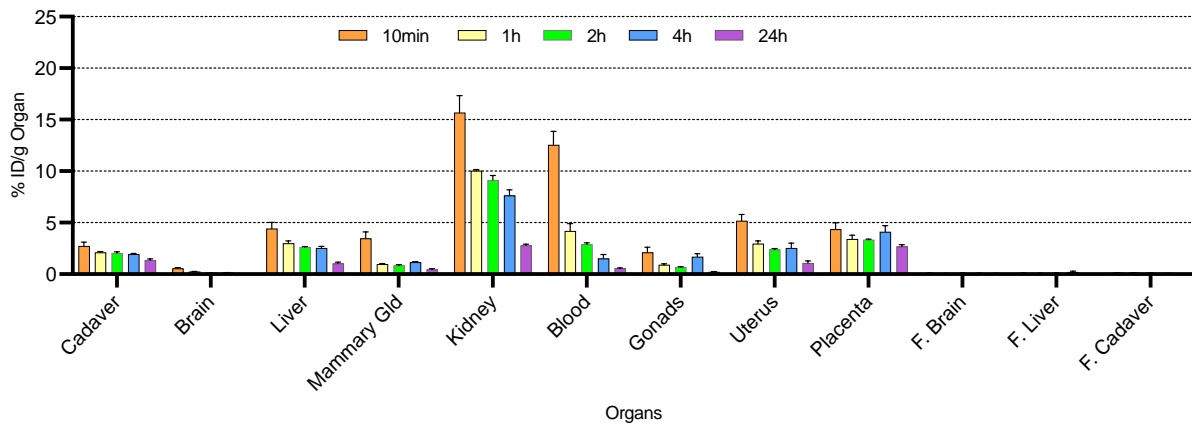
Annexe 1. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe, aux différents temps de l'étude à la suite de l'administration PO de L-carnitine.



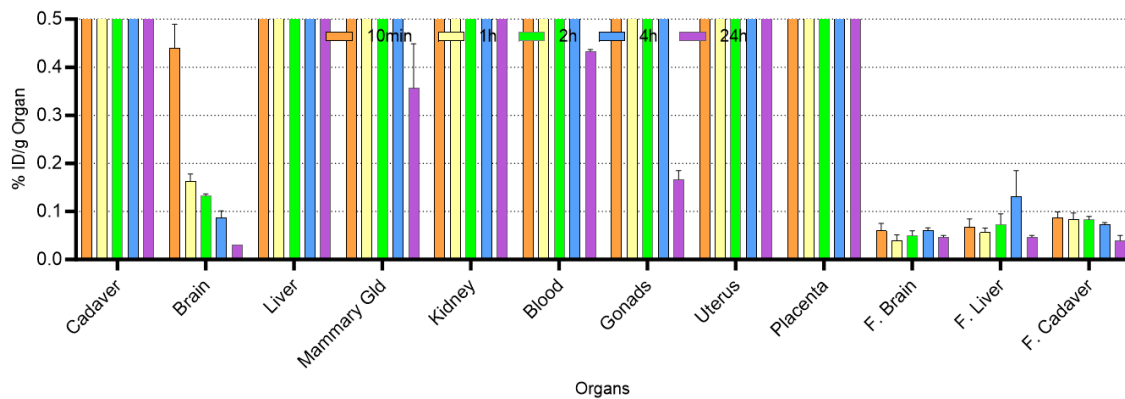
Annexe 5. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par organe de la mère et du fœtus, aux différents temps de l'étude, suite à l'administration IV de L-carnitine aux femelles gestantes.



Annexe 2. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe de la mère et du fœtus, aux différents temps de l'étude, à la suite de l'administration IV de L-carnitine aux femelles gestantes. On constate que les quantités retrouvées au niveau des fœtus sont très faibles.



Annexe 3. Graphique représentant le pourcentage de radioactivité par gramme d'organe de la mère et du fœtus, aux différents temps de l'étude, suite à l'administration IV de L-carnitine aux femelles gestantes. L'échelle est modifiée par rapport au graphique précédent afin de pouvoir mieux visualiser les quantités présentes dans les fœtus.



ETUDE PHARMACOCINETIQUE D'UNE MOLECULE D'INTERET THERAPEUTIQUE POTENTIEL, LA L-CARNITINE, CHEZ LA SOURIS GESTANTE

Auteur

GAY Loïs

Résumé

Au cours de l'enfance, le cerveau est très sensible aux perturbations métaboliques pouvant éventuellement survenir dans les premiers mois de vie. Ces perturbations peuvent mener, selon de nombreuses études récentes, à un défaut d'organisation des réseaux neuronaux, ce qui peut conduire à l'apparition de troubles neurodéveloppementaux tels que les troubles du spectre autistique (TSA), pour lesquels une recherche de solutions thérapeutiques est essentielle. Dans cette étude, nous avons étudié la pharmacocinétique de la L-carnitine, une molécule dont il a été prouvé récemment qu'elle pouvait corriger des défauts de développement de la connectivité corticale lorsqu'elle était administrée à des souris gestantes et allaitantes. Sa biodistribution a été évaluée chez des souris non gestantes et gestantes afin de caractériser son accumulation dans les différents organes, principalement l'encéphale, pour lequel la captation était très faible. Un passage de la barrière placentaire a également été objectivé grâce à la présence de L-carnitine maternelle retrouvée chez les fœtus. Ces résultats ont permis de préciser nos connaissances de la pharmacocinétique de la L-carnitine, et seront à compléter avec une étude similaire portant sur des femelles allaitantes.

Mots-clés

L-CARNITINE, BIODISTRIBUTION, NEURODEVELOPPEMENT, SOURIS, METABOLISME,

Jury

Président du jury : Pr **SCHAEFFER Laurent**

Directeur de thèse : Dr **COURCHET Julien**

1er assesseur : Pr **BERNY Philippe**

2ème assesseur : Dr **CHETOT Thomas**