



HAL
open science

Contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK)

Séverine Olivier

► **To cite this version:**

Séverine Olivier. Contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5092 . tel-03978650

HAL Id: tel-03978650

<https://theses.hal.science/tel-03978650v1>

Submitted on 8 Feb 2023

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

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



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES



Université de Paris

Université de Paris

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Institut Cochin – Equipe AMPK et kinases apparentées à l'AMPK dans la physiopathologie du diabète et de l'obésité

Contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale
par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK)

Par Séverine OLIVIER

Thèse de doctorat de Physiopathologie

Dirigée par Dr. Benoit VIOLLET

Présentée et soutenue publiquement le 26 novembre 2019

Devant un jury composé de :

François JOURET, Professeur Assistant, Université de Liège – Rapporteur

Jean-Pierre SEGAIN, Directeur de Recherche, Université de Nantes – Rapporteur

Malvyne DERKINDEREN, Directrice de Recherche, Université de Nantes – Examineur

Sandrine HORMAN, Professeure, Université catholique de Louvain – Examineur

Maude LE GALL, Directrice de Recherche, Université Paris Diderot – Examineur

Benoit VIOLLET, Directeur de Recherche, Université Paris Descartes – Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

« Le monde est bien plus passionnant quand on ne voit pas seulement de lui ce qu'il daigne nous montrer, mais aussi ce qu'il nous cache. »



Giulia Enders (Le charme discret de l'intestin, (Enders 2014))

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : mes deux rapporteurs François Jouret et Jean-Pierre Segain, et mes trois examinateurs Malvyne Derkinderen, Sandrine Horman et Maude Le Gall.

Ensuite mes remerciements vont bien évidemment à Benoit Viollet qui m'a encadrée durant ces années de thèse. Un grand merci Benoit pour m'avoir confié ce beau projet, et pour m'avoir fait découvrir le monde de l'AMPK ! Merci pour ton soutien, tes conseils et pour toutes nos discussions scientifiques très enrichissantes, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à de nombreuses collaborations et de présenter nos travaux dans des congrès internationaux, je te remercie pour ces belles opportunités qui ont été très riches tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Un grand merci à Sophie Vaultont pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe et à Marc Foretz pour ses conseils techniques et scientifiques sur mon projet de thèse. Je remercie aussi Camille Huet qui m'a bien accompagnée pendant ma thèse. Camille, merci beaucoup pour ton soutien, pour les moments de complicité au labo et en dehors du labo, pour ta bonne humeur permanente, tu m'as été d'une grande aide !

Au delà de l'équipe, merci à toutes les autres équipes voisines du bâtiment « faculté » des 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} étages avec qui j'ai pu échanger sur de nombreux sujets au cours de ma thèse, que ce soit dans les labos, en salle repas, autour d'un café ou au coin d'un couloir. Merci également aux représentants doctorants et post-docs des départements EMD et DRC, à Laurence Bénit pour m'avoir incitée à faire de la médiation scientifique avec les Apprentis Chercheurs, et à JeCCo pour tous leurs événements associatifs. Je tiens à remercier particulièrement Sandrine Barboux et Anne-Françoise Burnol qui ont suivi mon travail de thèse en tant que marraines à l'Institut Cochin. Merci également aux personnes des plateformes de l'Institut Cochin pour leur support technique, et à celles des services de gestion et de laverie qui facilitent notre travail au quotidien.

Comme j'ai pu l'énoncer précédemment, dans le cadre de ma thèse j'ai participé à plusieurs collaborations et eu l'occasion d'apprendre des techniques dans d'autres laboratoires où j'ai été chaleureusement accueillie. Je tiens donc à remercier Jérôme

Tamburini et Adrien Grenier de l'Institut Cochin, Malvyne Derkinderen, Camille Pochard, et Michel Neunlist de l'Université de Nantes, François Jouret, Pascal Rowart et Laurence Poma de l'Université de Liège, Sophie Thenet, Doriane Aguanno et Armelle Leturque du Centre de Recherche des Cordeliers, Benoit Salomon et Jordane Divoux du CIMI à Paris, André Marette, Noémie Daniel et Thibaut Varin de l'Université Laval à Québec, Pradipta Ghosh de UC San Diego, et Kei Sakamoto et Robin Willows de Nestlé Institute of Health Sciences.

J'ai également été bien entourée en dehors de l'Institut Cochin durant ma thèse. Merci beaucoup à ma Dlinou, aux vieux et vieilles de la vieille, à mon association de danse et ma professeure si dévouée, et à la team de gym SF de Vincennes. Tous les moments passés avec vous, festifs ou bien sportifs, m'ont permis de m'aérer l'esprit et de trouver un bon équilibre pendant ces années !

Enfin un immense merci à ma famille, mes parents et mes grands-parents, qui m'ont énormément épaulée (et supportée) quotidiennement tout au long de ma thèse. Merci pour m'avoir toujours encouragée dans tous les choix que j'ai eu à faire jusqu'à présent dans ma vie, et en particulier pour cette expérience de la thèse. J'ai de la chance de vous avoir à mes côtés.

C'est avec émotion que j'écris ces dernières lignes... Ces remerciements sont présentés en introduction de mon travail, et pourtant ce sont bel et bien les derniers mots qui viennent conclure mon manuscrit de thèse.

A nouveau, un immense merci à tous pour cette belle aventure !

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Abréviations.....	3
Introduction générale.....	5
1) Physiologie de l'intestin.....	5
1.1) Anatomie de l'intestin.....	6
1.2) Les cellules de l'épithélium intestinal.....	9
1.2.1) Les cellules souches intestinales.....	10
1.2.2) Les entérocytes.....	11
1.2.3) Les cellules de Goblet.....	12
1.2.4) Les cellules de Paneth.....	13
1.2.5) Les cellules entéroendocrines.....	13
1.2.6) Les cellules M.....	14
1.2.7) Les cellules Tuft.....	14
1.2.8) Le renouvellement de l'épithélium intestinal : de la naissance à la mort des cellules épithéliales.....	15
1.3) La fonction barrière de l'épithélium intestinal.....	17
1.3.1) Les protéines des jonctions intercellulaires.....	17
1.3.2) Altérations de la perméabilité intestinale dans certaines pathologies.....	22
2) L'AMPK, une protéine kinase aux effets pléiotropes.....	25
2.1) La découverte d'une enzyme clé du métabolisme.....	26
2.2) La structure hétérotrimérique de l'AMPK.....	26
2.3) L'AMPK : de sa régulation à ses multiples fonctions.....	32
2.3.1) La régulation de l'AMPK.....	32
2.3.1.a) Régulation par les nucléotides.....	32
2.3.1.b) Activation par phosphorylation.....	35
2.3.1.c) Activation par la privation de glucose.....	38
2.3.1.d) L'inhibition de l'AMPK.....	40
2.3.1.e) Une régulation différente de l'AMPK selon sa localisation subcellulaire	42
2.3.2) Les différentes fonctions de l'AMPK.....	44
2.3.2.a) Identification des cibles de l'AMPK.....	45
2.3.2.b) Fonctions métaboliques de l'AMPK.....	47
2.3.2.c) Fonctions non métaboliques de l'AMPK.....	55
2.4) L'AMPK, une cible thérapeutique.....	60
2.4.1) Les différents types d'activateurs de l'AMPK.....	60
2.4.2) Les inhibiteurs de l'AMPK.....	68
2.4.3) L'intérêt de cibler l'AMPK dans certaines pathologies.....	70
3) Le rôle de l'AMPK dans la fonction barrière.....	76
3.1) Découverte du rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées.....	77
3.2) L'importance de l'AMPK au niveau des jonctions cellules-cellules dans différents tissus.....	80
3.3) L'AMPK et la barrière épithéliale intestinale.....	82
3.3.1) Maintien et réassemblage des jonctions serrées.....	82
3.3.2) Polarité cellulaire et tumorigenèse.....	87

3.3.3) L'inflammation.....	88
3.3.4) Les fonctions d'absorption.....	89
Objectifs.....	91
Matériels & Méthodes.....	93
Résultats.....	99
1) Rôle de l'AMPK dans la régulation des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales Caco-2.....	99
1.1) Génération des cellules Caco-2 invalidées pour l'AMPK.....	99
1.2) L'activation de l'AMPK facilite l'assemblage des jonctions serrées dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2.....	128
1.3) Les cibles de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées.....	150
2) Conséquences de l'absence de l'AMPK intestinale chez la souris.....	153
2.1) Analyse phénotypique des souris invalidées pour l'AMPK intestinale en condition basale.....	153
2.2) Conséquences phénotypiques de l'inactivation de l'AMPK intestinale dans différents modèles pathologiques.....	156
2.2.1) Modèle de colite induite par un traitement au DSS.....	156
2.2.2) Modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique.....	159
2.2.2.a) Effets de la délétion constitutive de l'AMPK intestinale.....	159
2.2.2.b) Effets de la délétion inducible de l'AMPK intestinale.....	163
3) Intérêt d'utiliser l'AMPK comme cible thérapeutique pour la renforcer la barrière intestinale chez la souris.....	174
3.1) Bénéfice d'un traitement à la metformine en condition basale.....	174
3.2) Bénéfice d'un traitement à la metformine dans le contexte de colite.....	175
Discussion et perspectives.....	179
Conclusion.....	195
Annexe 1.....	197
Annexe 2 : Liste des publications.....	210
Annexe 3 : Communications orales et affichées.....	211
Références bibliographiques.....	213

Table des illustrations

<i>Figure 1 : Le système digestif chez l'homme.</i>	6
<i>Figure 2 : Coupe transversale présentant les quatre couches de la paroi intestinale.</i>	7
<i>Figure 3 : Morphologie de la muqueuse dans les deux parties de l'intestin.</i>	9
<i>Figure 4 : Les différents types de cellules épithéliales tout au long de l'intestin.</i>	10
<i>Figure 5 : Les quatre types de complexes jonctionnels entre les cellules épithéliales intestinales.</i>	18
<i>Figure 6 : Organisation des protéines des jonctions serrées.</i>	21
<i>Figure 7 : Comparaison des voies paracellulaires en conditions saine et altérée.</i>	23
<i>Figure 8 : Les trois sous-unités de l'AMPK et leurs différentes isoformes.</i>	29
<i>Figure 9 : Comparaison des différents complexes d'AMPK présents dans le muscle squelettique, le foie, et le macrophage chez l'homme et la souris.</i>	31
<i>Figure 10 : Changements de disposition des domaines de l'AMPK lorsque l'AMP se fixe au CBS3.</i>	34
<i>Figure 11 : Activation de l'AMPK à la surface du lysosome en réponse aux variations de glucose via le super complexe v-ATPase-Ragulator/Rag-AXIN-LKB1.</i>	39
<i>Figure 12 : La régulation physiologique de l'AMPK dans la cellule.</i>	41
<i>Figure 13 : Hypothèses sur l'activation des différents pools d'AMPK de la cellule.</i>	44
<i>Figure 14 : Motif de phosphorylation de l'AMPK de P-7 à P+7.</i>	47
<i>Figure 15 : L'AMPK inhibe les deux isoformes de l'ACC.</i>	49
<i>Figure 16 : L'AMPK facilite l'absorption du glucose dans le muscle.</i>	52
<i>Figure 17 : Réarrangements du cytosquelette induits par l'AMPK.</i>	58
<i>Figure 18 : Fonctions métaboliques et non métaboliques de l'AMPK.</i>	59
<i>Figure 19 : Comparaison des structures chimiques du ZMP et de l'AMP.</i>	61
<i>Figure 20 : Fixation du composé A-769662 sur le site ADaM de l'AMPK.</i>	65
<i>Figure 21 : Structures chimiques des activateurs de l'AMPK.</i>	68
<i>Figure 22 : Comparaison des protéines kinases inhibées par le SBI-020695 et le composé C.</i>	69
<i>Figure 23 : Rôles de l'AMPK dans le foie, le coeur, le muscle squelettique, le tissu adipeux, et l'endothélium.</i>	76
<i>Figure 24 : Immunomarquage montrant la relocalisation de la protéine ZO-1 au cours du calcium switch en absence ou en présence d'AICAR dans les cellules MDCK.</i>	79
<i>Figure 25 : L'AMPK favorise l'assemblage des jonctions serrées via la phosphorylation de la cinguline dans les cellules Eph4.</i>	86
<i>Figure 26 : L'absorption du glucose et du fructose au niveau des entérocytes.</i>	90
<i>Figure 27 : Les différentes étapes de l'obtention des cellules Caco-2 invalidées pour les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK par la technologie CRISPR/Cas9.</i>	102
<i>Figure 28 : Alignement des séquences du site de phosphorylation par l'AMPK de la cinguline et la GIV dans différentes espèces.</i>	151
<i>Figure 29 : La méthodologie PamGene pour mesurer les profils d'activité des sérine/thréonine kinases.</i>	152
<i>Figure 30 : Caractérisation du modèle de souris invalidées pour les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales.</i>	154
<i>Figure 31 : La délétion de l'AMPK intestinale induit une augmentation de la perméabilité au niveau du côlon distal.</i>	155

<i>Figure 32 : La délétion de l'AMPK intestinale entraîne un délai dans le processus de ré-épithélisation dans un contexte de colite induite par le DSS.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 33 : Les souris WT et AMPK KO ne présentent pas de différence dans leurs paramètres métaboliques sous régime contrôle ou gras.....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 34 : Les souris AMPK KO sous régime gras présentent une perméabilité exacerbée au niveau du côlon distal.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 35 : Effet du régime gras et de la délétion de l'AMPK sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des protéines des jonctions serrées du côlon distal.</i>	<i>162</i>
<i>Figure 36 : Les souris WT et iAMPK KO ne présentent pas de différence dans leurs paramètres métaboliques sous régimes contrôle ou gras.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure 37 : Les souris iAMPK KO présentent une hyperperméabilité au niveau du côlon distal sous régime contrôle et non sous régime gras.</i>	<i>165</i>
<i>Figure 38 : Effet du régime gras et de la délétion inductible de l'AMPK sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des protéines des jonctions serrées au niveau du côlon distal.</i>	<i>166</i>
<i>Figure 39 : Effets du régime gras et de la délétion inductible de l'AMPK sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux viscéral.</i>	<i>167</i>
<i>Figure 40 : Le régime gras induit une infiltration des cellules myéloïdes dans le côlon et le tissu adipeux viscéral.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure 41 : Analyse du microbiote des souris WT et iAMPK KO sous régimes contrôle et gras.....</i>	<i>173</i>
<i>Figure 42 : Effets du régime gras et de la délétion inductible de l'AMPK sur l'expression de la mucine 2.</i>	<i>173</i>
<i>Figure 43 : La metformine diminue la perméabilité paracellulaire par un mécanisme AMPK-dépendant.</i>	<i>175</i>
<i>Figure 44 : La metformine atténue la colite chez les souris WT et AMPK KO mais diminue la perméabilité intestinale uniquement chez les souris WT.....</i>	<i>177</i>
<i>Figure 45 : La metformine induit l'activation de l'AMPK dans le côlon distal.</i>	<i>178</i>
<i>Figure 46 : Représentation d'une puce microfluidique pour mimer les conditions physiologiques intestinales.</i>	<i>186</i>
<i>Figure 47 : Le rôle de l'AMPK dans le maintien et la reconstruction de la barrière épithéliale intestinale.....</i>	<i>196</i>

Résumé

Contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK)

Mots clés : AMPK ; intestin ; jonctions serrées ; obésité ; colite ; Caco-2 ; metformine ; composé 991

La barrière épithéliale intestinale présente une double fonction au sein de l'organisme, elle permet l'absorption des nutriments mais assure également une protection contre les pathogènes et les toxines. La monocouche de cellules épithéliales tapissant l'intestin constitue une véritable barrière physique grâce au réseau des protéines de jonction reliant ces cellules entre-elles. Parmi ces protéines, ce sont notamment celles impliquées dans la formation des jonctions serrées qui régulent la perméabilité paracellulaire. Des dysfonctions de la barrière intestinale sont observées dans certaines pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou l'obésité. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est principalement connue pour sa fonction de senseur de l'état énergétique cellulaire, cependant cette kinase contrôlerait également l'assemblage des jonctions serrées, comme démontré pour les cellules épithéliales rénales. Les fonctions de l'AMPK dans l'intestin ont été peu étudiées, et dans ce cadre nous nous sommes intéressés à son rôle dans l'homéostasie de la barrière intestinale.

Pour répondre à notre problématique, nous avons travaillé sur des modèles *in vivo* et *in vitro* présentant des altérations de la barrière épithéliale intestinale. Deux modèles pathologiques ont été utilisés *in vivo* : l'un étant un modèle d'obésité induit par un régime hyperlipidique, l'autre un modèle de colite mimant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par un traitement au DSS (Dextran Sulfate Sodium). Sur ces modèles, nous avons notamment étudié : 1) les conséquences de l'absence de l'AMPK en utilisant un modèle de souris présentant une délétion de l'AMPK spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal (Vil-AMPK KO), et 2) l'impact d'une activation pharmacologique de l'AMPK sur la perméabilité intestinale au cours de l'induction de la colite. Enfin, nous avons généré des cellules intestinales Caco-2 invalidées pour l'AMPK (KO) par la technologie CRISPR/Cas9 afin de mieux caractériser *in vitro* le rôle de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées en réponse à un challenge en calcium (calcium switch).

Dans notre modèle animal, nous avons tout d'abord montré que les souris Vil-AMPK KO présentaient une augmentation de la perméabilité intestinale au niveau du côlon distal par rapport aux souris contrôles, suggérant un rôle de l'AMPK dans le maintien de la barrière. Dans un modèle d'obésité, cette perméabilité est exacerbée chez les souris Vil-AMPK KO, mais cette altération n'est pas suffisante pour entraîner des défauts métaboliques majeurs. En revanche, suite à un traitement au DSS, l'absence de l'AMPK entraîne une ré-épithélisation de la barrière intestinale plus lente par rapport à des souris contrôles. En condition basale, un traitement à la metformine diminue la perméabilité intestinale par un mécanisme AMPK-dépendant. De manière similaire, dans notre modèle de colite, la metformine améliore la perméabilité et atténue également l'inflammation. Au cours d'expériences de calcium switch menées sur les cellules Caco-2, nous avons démontré que l'activation pharmacologique de l'AMPK par l'activateur 991 stimulait le réassemblage des jonctions serrées ainsi que leur relocalisation à la membrane plasmique. L'utilisation des cellules KO a notamment permis de définir qu'il s'agissait d'un processus AMPK-dépendant.

Nos résultats montrent que l'AMPK joue un rôle important dans la régulation de la barrière intestinale, notamment au niveau du côlon. L'activation pharmacologique de l'AMPK assure une meilleure ré-épithélisation de la barrière intestinale dans un modèle de colite et un réassemblage plus rapide des jonctions serrées dans les cellules Caco-2. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour définir les cibles directes de l'AMPK dans ce contexte. Ainsi, ces résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique de l'AMPK pour limiter les défauts de la barrière intestinale.

Abstract

Control of intestinal epithelial barrier homeostasis by AMP-activated protein kinase (AMPK)

Key words: AMPK ; intestine ; tight junctions ; obesity ; colitis ; Caco-2 ; metformin ; compound 991

The intestinal epithelial barrier plays a double role within the organism, it enables nutrient absorption but also ensures a protection against pathogens and toxins. The monolayer of epithelial cells lining the intestine forms a real physic barrier thanks to a network of junction proteins linking the cells together. Among these proteins, those involved in tight junctions formation notably regulate the paracellular permeability. Dysfunctions of the intestinal barrier are observed in some diseases like inflammatory bowel diseases or obesity. The AMP-activated protein kinase (AMPK) is mainly known to be a sensor of the cellular energy status; however, this kinase could also regulate the assembly of tight junctions, as shown in renal epithelial cells. The functions of AMPK in the intestine have been poorly investigated, and in this context we were interested in its role in the intestinal barrier homeostasis.

In order to meet our objective, we worked on *in vivo* and *in vitro* models displaying alterations of the intestinal barrier. Two pathological models were investigated *in vivo*: one was a model of obesity induced by a high-fat diet, the other one was a colitis model mimicking inflammatory bowel diseases by a treatment with DSS (Dextran Sulfate Sodium). In these models, we notably studied: 1) the consequences of the absence of AMPK by using a mouse model invalidated for AMPK specifically in the intestinal epithelium (Vil-AMPK KO), and 2) the impact of a pharmacological activation of AMPK on the intestinal permeability during colitis. Finally, we generated intestinal Caco-2 cells invalidated for AMPK (KO) by CRISPR/Cas9 technology to better understand *in vitro* the role played by AMPK in the process of tight junctions reassembly during a calcium switch assay.

In our animal model, we first showed that Vil-AMPK KO mice displayed an increased intestinal permeability in the distal colon compared to control mice, suggesting a role of the AMPK in barrier maintenance. In our model of obesity, this permeability is exacerbated in Vil- AMPK KO mice, but this alteration is not sufficient to induce major metabolic disorders. Nevertheless, following a DSS treatment, the absence of AMPK induces a slower re-epithelization of the intestinal barrier compared to control mice. In basal condition, a treatment with metfomin decreases the intestinal permeability via an AMPK-dependent mechanism. Similarly, in our colitis model, metformin improves the permeability and also attenuates inflammatory signals. In calcium switch assays performed in Caco-2 cells, we demonstrated that the pharmacological activation of AMPK by compound 991 enhanced the reassembly of tight junctions and their relocation at the plasma membrane. The use of KO cells notably enabled us to conclude that this was occurring through an AMPK-dependent process.

Our data show that AMPK plays a major role in the regulation of the intestinal barrier, particularly in the colon. Pharmacological activation of AMPK ensures a better re-epithelization of the intestinal barrier in a colitis model and a faster reassembly of tight junctions in Caco-2 cells. However, further studies are needed to define the direct phopshorylation targets of AMPK in this context. Thus, altogether these results highlight the therapeutic potential of AMPK to limit intestinal barrier disorders.

Abréviations

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ADaM : Allosteric drug and metabolite site

AICAR : 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

AOM : Azoxyméthane

APC : Adenomatous polyposis coli

ATP : Adénosine triphosphate

AXIN2 : Axis Inhibition protein 2

BrdU : Bromodéoxyuridine

CaMKK β : Calmodulin-dependent protein kinase kinase β

CK1 : Caséine kinase 1

CBC : Crypt base columnar

CD : Cellule dendritique

CSEI : Cellule souche épithéliale intestinale

DSS : Dextran sulfate de sodium

FBP : Fructose-1,6-bisphosphate

FRET : Transfert d'énergie par résonance de type Förster

GIP : Peptide insulino-trope dépendant du glucose

GIV : Girdin

GLP-1 : Glucagon-like peptide-1

GLUT : Glucose transporter

GP2 : Glycoprotéine 2

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3-beta

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl-CoA

IgAs : Immunoglobulines A sécrétoires

IL : Interleukine

ILC2 : Cellules lymphoïdes innées de type 2

IFN γ : Interferon gamma
JAMs : Junctional adhesion molecules
LGR5 : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LKB1 : Liver kinase B1
LRC : +4 Label retaining cell
LPS : Lipopolysaccharides
MAGUK : Membrane-associated guanylate kinase
MDCK : Madin-Darby canine kidney
MEF : Mouse embryonic fibroblasts
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MO25 : Mouse protein 25
mTOR : Mammalian target of rapamycin
NADP : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OCT1 : Organic cation transporter 1
PAM : Peptides antimicrobiens
PYY : Peptide YY
RegIII γ : Protéine III γ en régénération d'îlots
SGLT1 : Sodium-glucose transporter 1
siRNA : Small interfering RNA
SNE : Système nerveux entérique
sPLA2 : Phospholipase A2
STRAD : Ste20-related adaptor protein
TA : Amplification transitoire
TAK1 : TGF- β activated kinase 1
TEER : Résistance électrique transépithéliale
TNF : Tumor necrosis factor
TFF3 : Trefoil factor 3
VEGF : Vascular endothelial growth factor
ZO-1 : Zonula occludens-1
ZMP : 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside monophosphate

Introduction générale

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée au rôle de la protéine kinase activée par l'AMP (AMP-activated protein kinase ou AMPK) dans l'intestin, et plus particulièrement à son implication dans le contrôle de l'homéostasie de la barrière intestinale. De nombreuses pathologies, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou l'obésité qui constituent de réels problèmes de santé publique, sont associées à des dysfonctions intestinales. Outre ses fonctions métaboliques, l'AMPK exerce également un rôle dans la formation des jonctions serrées, lesquelles préservent l'intégrité des épithélia. Dans le cadre de ces travaux, nous avons exploré cette fonction de l'AMPK au niveau intestinal, et nous nous sommes en particulier demandé si l'AMPK pouvait constituer une cible thérapeutique pour renforcer la barrière intestinale en cas d'altérations.

Nous décrirons dans une première partie introductive les fonctions de l'intestin et en particulier l'importance de la barrière épithéliale intestinale, les effets pléiotropes de l'AMPK et l'intérêt de cibler cette kinase dans de nombreuses pathologies, et plus précisément le rôle de l'AMPK dans la fonction barrière de l'intestin.

1) Physiologie de l'intestin

L'étude de l'intestin par la communauté scientifique connaît un regain d'intérêt depuis les années 2000, notamment depuis la découverte des effets du microbiote intestinal sur la physiologie et la physiopathologie de l'hôte. De plus, l'émergence de nouvelles thérapeutiques telles que la chirurgie bariatrique dans le cadre de l'obésité et du diabète, ainsi que l'augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin en lien avec les changements de nos modes de vie font de l'intestin un objet d'étude intéressant. Les fonctions métaboliques, protectrices, et mécaniques de l'intestin ainsi que la présence du système nerveux entérique (SNE), lui permettent d'être un organe complexe autonome, souvent qualifié de « deuxième cerveau ». Dans cette première partie, nous nous intéresserons aux différents rôles de

l'intestin et nous détaillerons particulièrement l'épithélium intestinal et sa fonction barrière.

1.1) Anatomie de l'intestin

L'intestin fait partie du tube digestif et s'étend de la fin de l'estomac jusqu'à l'anus (Fig. 1). Chez l'homme, de même que chez les rongeurs, l'intestin est composé de deux parties : l'intestin grêle et le gros intestin (ou côlon).

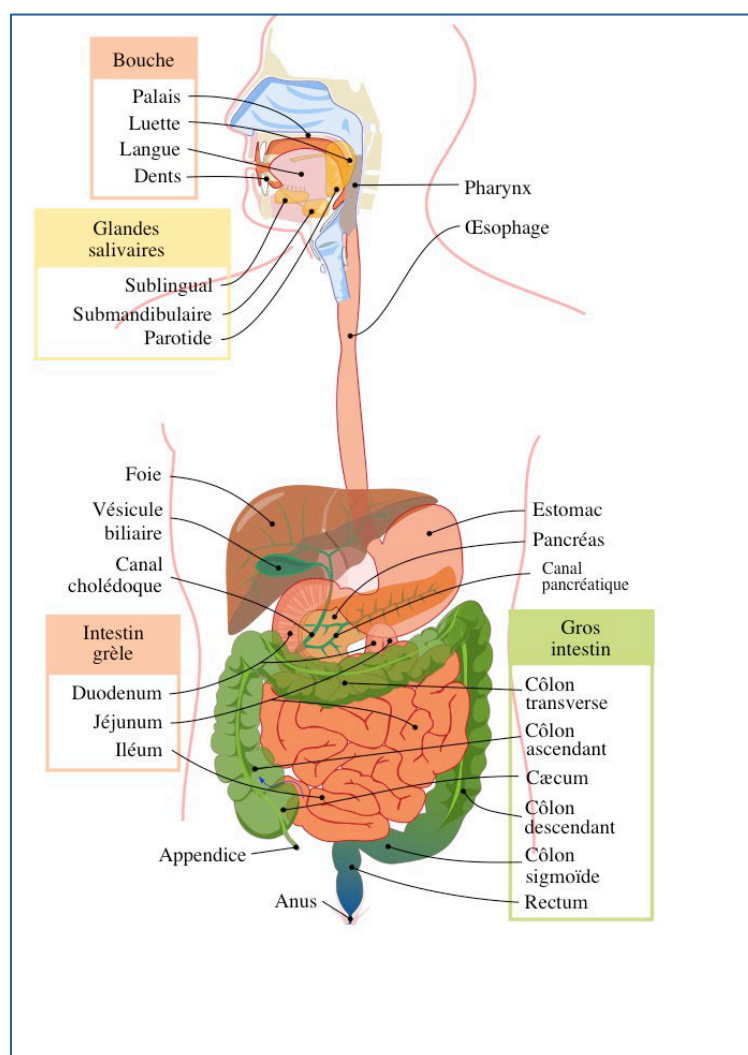


Figure 1 : Le système digestif chez l'homme.

Le tube digestif comprend la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin, et l'anus. (D'après (Ruiz 2006)).

La paroi intestinale est structurée en quatre couches distinctes. La couche la plus externe est la tunique externe. Elle se présente sous deux aspects différents selon sa localisation au sein du tube digestif : il s'agit de l'adventice aux extrémités du tube digestif où la tunique est simplement constituée d'un tissu conjonctif lâche, et de la séreuse entre ces deux extrémités, constituée d'un tissu conjonctif recouvert par un épithélium ayant un rôle protecteur. Sous la tunique externe se trouve la musculaire composée principalement de cellules musculaires lisses qui assurent le péristaltisme intestinal sous le contrôle du système nerveux entérique, à savoir le passage du bol alimentaire le long de l'intestin. Ensuite, la sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif lâche très riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Enfin, la couche la plus interne en contact avec la lumière intestinale est la muqueuse comprenant la lamina propria, tissu conjonctif riche en cellules immunes, reposant sur la musculaire-muqueuse, et qui est recouverte par une monocouche de cellules épithéliales à la frontière entre la lumière intestinale et l'environnement intérieur de l'organisme (Fig. 2).

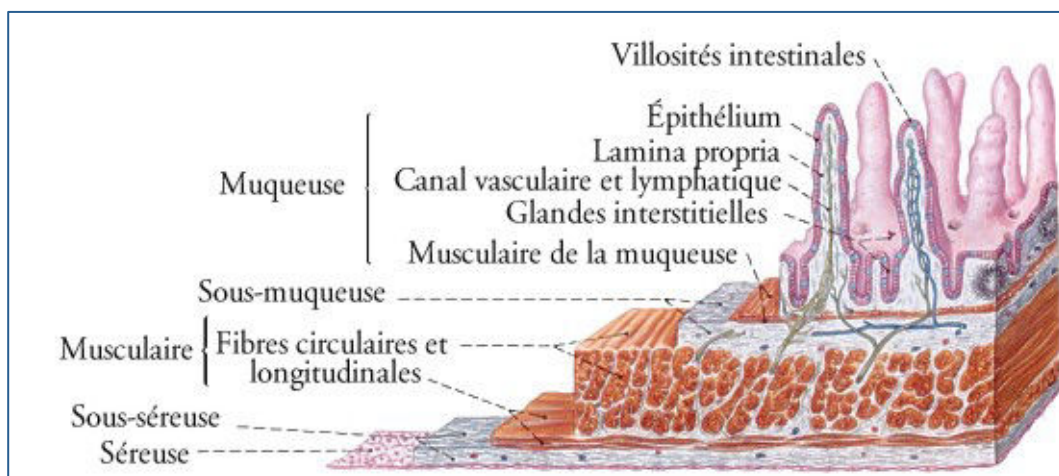


Figure 2 : Coupe transversale présentant les quatre couches de la paroi intestinale.

Les quatre couches comportent la tunique externe (sérosité, sous-sérosité), la musculaire, la sous-muqueuse, et la muqueuse. (D'après (Marieb 1999)).

L'intestin grêle comporte trois segments : le duodénum, le jéjunum, et l'iléon ; c'est dans cette partie de l'intestin que la digestion et l'absorption des nutriments ont lieu. Le duodénum reçoit le chyme alimentaire provenant de l'estomac qui est ensuite mélangé aux sécrétions biliaires et pancréatiques riches en enzymes et permettant la

dégradation des aliments en nutriments absorbables (macromolécules glucidiques, acides aminés, acides gras libres, ...). La majeure partie des nutriments est absorbée au niveau de la muqueuse intestinale du jéjunum. Les nombreux plis circulaires et les projections de la muqueuse dans la lumière intestinale, appelées villosités, ainsi que les microvillosités situées à l'extrémité apicale des cellules absorbantes et leur riche vascularisation font de cette zone une grande surface d'échange (Fig. 3). Chaque villosité comporte un vaisseau lymphatique, appelé le chylifère, ainsi qu'un réseau sanguin composé de capillaires reliés aux artérioles ascendantes et aux veinules descendantes. La plupart des nutriments sont transportés via les capillaires sanguins tandis que les lipides transitent par le vaisseau lymphatique. L'iléon est la partie distale de l'intestin grêle, il permet notamment l'absorption des nutriments non absorbés au niveau du jéjunum (Collins and Badireddy 2019). Au niveau de la partie terminale de l'iléon se trouvent les plaques de Peyer qui forment des agrégats de follicules lymphoïdes, principalement composés de lymphocytes B et T, et qui interviennent dans la réponse immunitaire intestinale (Fig. 3).

Le côlon, ou gros intestin, présente une morphologie différente de l'intestin grêle. Sa muqueuse est plus épaisse, elle est organisée sous formes de cryptes et ne possède pas de villosités (Fig. 3). Le côlon est spécialisé dans la réabsorption d'eau, de certaines vitamines, l'hydratation des fèces et assure la digestion de certains aliments n'ayant pas été absorbés au niveau de l'intestin grêle. Le côlon accueille la plus grande diversité microbienne du tube digestif, il existe entre 10^9 et 10^{12} bactéries par millilitre, avec plus d'une centaine d'espèces différentes. Les bactéries du côlon participent notamment à la digestion des polysaccharides comme les fibres alimentaires présentes dans les fruits, les légumes et les céréales. Cette fermentation permet la synthèse de vitamines et d'acides gras à chaînes courtes qui ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte en agissant sur le métabolisme énergétique, l'inflammation ou encore la modulation du microbiote (Cani and Delzenne 2007).

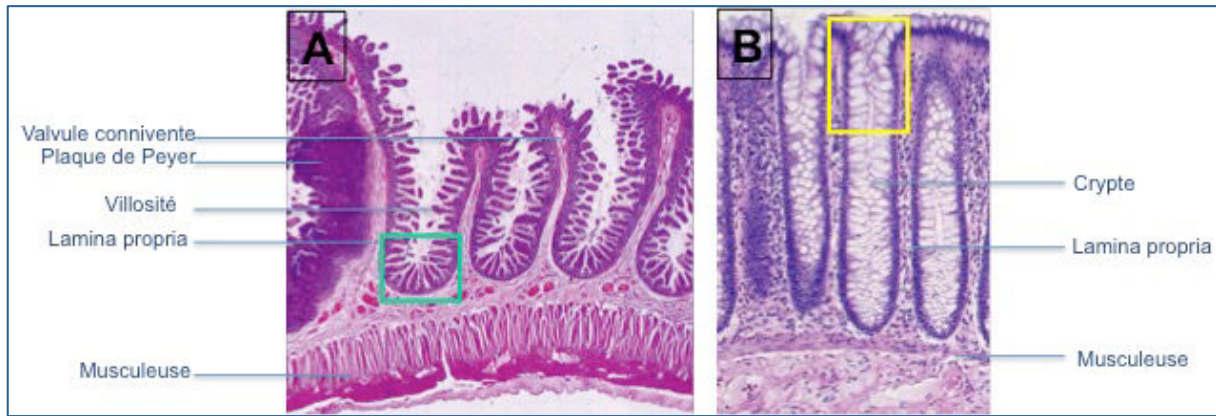


Figure 3 : Morphologie de la muqueuse dans les deux parties de l'intestin.

Comparaison de l'épithélium intestinal entre l'intestin grêle (A) et le côlon (B). (D'après (Abadjan 2006)).

1.2) Les cellules de l'épithélium intestinal

Dans la suite de cette partie introductive, nous nous focaliserons sur la muqueuse intestinale, et plus particulièrement sur l'épithélium intestinal, son organisation, ses propriétés et son rôle bénéfique à l'échelle de l'organisme. Nous nous intéresserons dans un premier temps à l'ensemble des cellules qui composent l'épithélium intestinal et aux processus qui régulent son renouvellement.

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales prismatiques suivant le profil des villosités et des cryptes tout au long de l'intestin. Ces cellules reposent sur la lamina propria, où l'on retrouve principalement des lymphocytes, des macrophages, et des cellules dendritiques, et elles sont recouvertes par une couche de mucus protectrice. Les bactéries commensales appartenant au microbiote intestinal se tiennent à distance de l'épithélium, toutefois certaines espèces de bactéries résident au sein du mucus, notamment au niveau du côlon (Fig. 4). L'épithélium intestinal présente des fonctions très variées, il s'agit d'une structure dynamique en constant renouvellement ; ainsi plusieurs types de cellules sont retrouvés au sein de cet épithélium. Les cellules souches intestinales pluripotentes sont à l'origine de l'ensemble des cellules différenciées de l'épithélium. Deux types principaux de cellules ont été identifiés : les cellules absorbantes, composées par les entérocytes, et les cellules sécrétrices, composées par les cellules de Goblet, les cellules de Paneth, et les

cellules entéroendocrines (Fig. 4). D'autres types de cellules dont les fonctions sont encore peu décrites dans la littérature ont également été identifiées : il s'agit des cellules M et des cellules Tuft (Barker 2014).

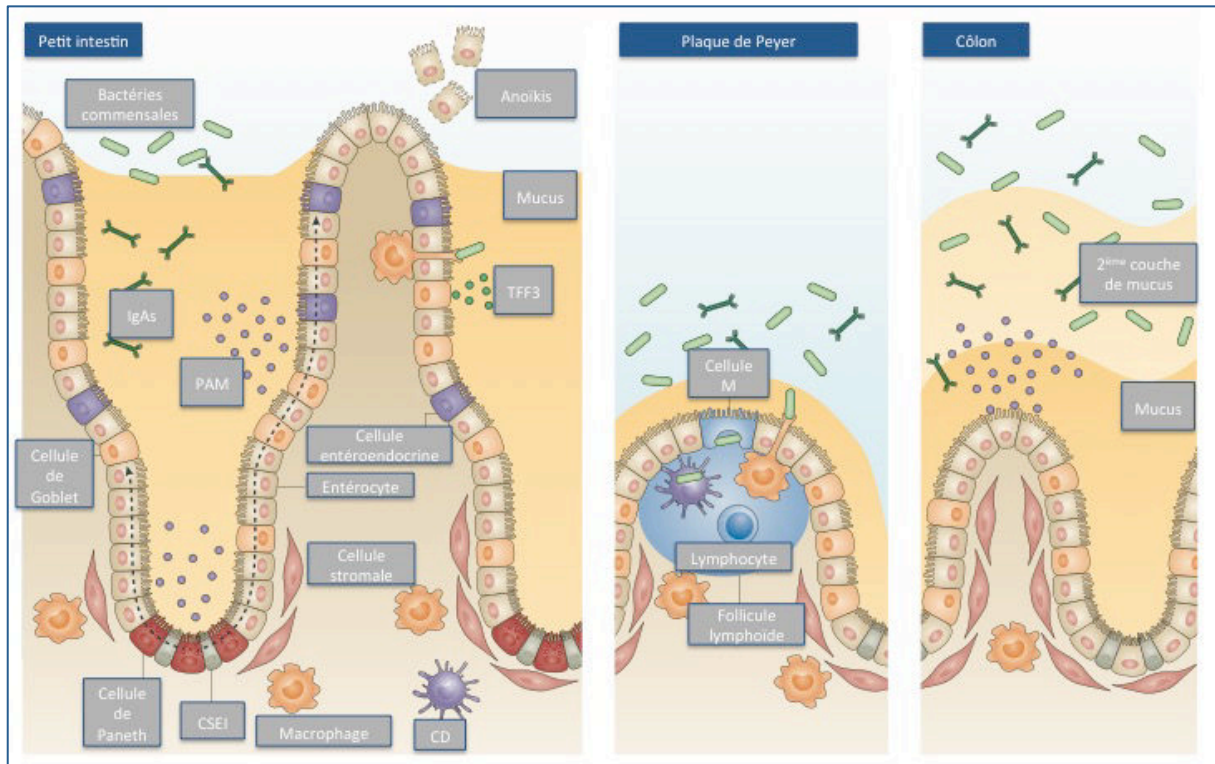


Figure 4 : Les différents types de cellules épithéliales tout au long de l'intestin.

Les cellules épithéliales sont présentées au niveau du petit intestin, des plaques de Peyer (principalement localisées dans la partie distale de l'iléon), et du côlon. (D'après (Peterson and Artis 2014)).

1.2.1) Les cellules souches intestinales

Les cellules souches intestinales se situent au fond des cryptes de Lieberkühn. La division des cellules souches donne naissance aux progéniteurs à amplification transitoire (TA) qui se divisent ensuite deux à trois fois. Les progéniteurs TA migrent le long de l'axe crypto-villositaire et génèrent les cellules différenciées de l'épithélium. Au cours de ces quarante dernières années, deux modèles de cellules souches ont été décrits dans la littérature : le modèle « Crypt Base Columnar » (CBC) et le modèle « +4 Label Retaining Cell » (LRC) (Barker 2014). Ces modèles ont longtemps été en concurrence, mais aujourd'hui il est toujours difficile d'établir lequel de ces deux

modèles est correct. Ainsi, il est actuellement admis que deux pools distincts de cellules souches existent au fond des cryptes intestinales et agissent en synergie pour assurer l'homéostasie et le bon renouvellement de l'épithélium intestinal. Dans la suite de ce paragraphe, nous décrirons de manière synthétique ces deux modèles.

Les auteurs Cheng et Leblond ont décrit les CBCs comme étant des cellules indifférenciées avec une activité proliférative importante, localisées à la base des cryptes et intercalées avec les cellules de Paneth. Par des expériences de marquage à la thymidine tritiée, les auteurs ont pu montrer le caractère multipotent des cellules CBCs (Cheng and Leblond 1974). Le récepteur LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5) a été identifié comme un marqueur spécifique des CBCs de part son expression restreinte aux cellules de la crypte et comme étant une cible de la voie Wnt, très importante pour le renouvellement de l'épithélium (Barker et al. 2007).

Le groupe de Potten a quant à lui identifié une localisation différente des cellules souches intestinales qu'il appelle LRCs. En effet, il a décrit un groupe de cellules non différenciées au sein de la crypte formant un anneau en position +4 par rapport à la base des cryptes, situé au dessus des cellules de Paneth, et ayant deux propriétés caractéristiques des cellules souches. Ils ont notamment montré par des expériences de double marquage à la thymidine tritiée des brins parentaux et au bromodeoxyuridine (BrdU) des brins nouvellement synthétisés, que ces cellules étaient capables de procéder à une division cellulaire asymétrique. Suite à cette division, les brins parentaux étaient retrouvés dans les cellules filles, assurant ainsi la stabilité génétique, et les brins nouvellement synthétisés étaient retrouvés uniquement dans les progéniteurs TA qui intègrent le programme de différenciation (Potten et al. 2002). Par ailleurs, ce groupe a également montré que les LRCs étaient très sensibles aux rayonnements ionisants induisant des dégradations de l'ADN, et que les LRCs dégradées étaient systématiquement éliminées et remplacées par des progéniteurs (Potten 1977).

1.2.2) Les entérocytes

Les entérocytes constituent le type cellulaire le plus abondant au sein de l'épithélium, il s'agit des colonocytes au niveau du côlon. Les entérocytes sont spécialisés dans l'absorption des nutriments. Pour réaliser cette fonction, les entérocytes présentent une morphologie et une polarité bien particulières. Leur pôle apical est

constitué de microvillosités, formant une bordure en brosse, qui augmentent la surface d'absorption et qui constituent la voie d'entrée des nutriments dans la cellule. Les microvillosités sont recouvertes par le glycocalyx, composé de glycoprotéines telles que les mucines (Maury et al. 1995) et certaines enzymes qui contribuent à la digestion des aliments. Le pôle basolatéral se situe du côté du réseau capillaire comprenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques. En plus de cette fonction principale d'absorption, les entérocytes participent également à la défense de l'épithélium en sécrétant certains peptides antimicrobiens (PAMs). Il a notamment été montré que les entérocytes étaient capables de produire des β -défensines (O'Neil et al. 1999) et la protéine Ily en régénération d'îlots (RegIly), qui est une lectine de type C ciblant les bactéries Gram positives (Vaishnava et al. 2011).

1.2.3) Les cellules de Goblet

Les cellules de Goblet, également appelées cellules caliciformes ou cellules à mucus produisent la couche de mucus qui tapisse l'épithélium intestinal, elles ont donc un rôle protecteur. Elles représentent environ 5% des cellules épithéliales et sont plus abondantes au niveau de la partie distale du petit intestin et du côlon. Leur forme caractéristique, à savoir une région apicale élargie et une fine partie basale, vient de l'importante quantité de granules contenant les glycoprotéines prêtes à être sécrétées par la cellule à son pôle apical. Le mucus contient principalement des glycoprotéines telles que les mucines. Il existe vingt gènes codant pour les mucines, la mucine 2 (Muc2) est la protéine la plus abondante au niveau intestinal. Les cellules de Goblet produisent également d'autres peptides tel que le Trefoil factor 3 (TFF3) qui joue un rôle important dans le maintien et la protection du mucus (Kim and Ho 2010). Le mucus exerce un double rôle de lubrification et de protection. Concernant son rôle protecteur, le petit intestin présente une unique couche de mucus protégeant la surface épithéliale des bactéries de la lumière intestinale ; cependant, le côlon présente une double couche de mucus avec une première couche interne protégeant l'épithélium et une couche externe colonisée par les bactéries. L'importance de Muc2 a été démontrée dans un modèle murin de souris délétées pour le gène codant cette protéine. En effet, les souris déficientes présentent des altérations de la couche de mucus qui devient alors pénétrable par les bactéries et ces souris sont plus susceptibles de développer une

inflammation intestinale de type colite (Johansson et al. 2008).

1.2.4) Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth se situent dans le fond des cryptes de l'intestin grêle uniquement, elles sont spécialisées dans la production des peptides antimicrobiens (PAMs), lesquels protègent la muqueuse intestinale. Elles sont intercalées avec les cellules souches intestinales et participent ainsi au microenvironnement de ces dernières. Les protéines antimicrobiennes sécrétées par les cellules de Paneth sont les α -défensines, la glycosidase lysozyme C, la phospholipase A2 (sPLA2), et la lectine de type C RegIII γ . Ces protéines présentes dans le mucus assurent la régulation du microbiote intestinal en ciblant les bactéries pathogènes mais également en limitant le nombre de bactéries résidentes, et assurent ainsi une bonne symbiose entre l'hôte et son microenvironnement bactérien. La plupart de ces protéines agissent via la dégradation de la surface des bactéries Gram-positif ou Gram-négatif selon leur nature (Bevins and Salzman 2011) (Mukherjee et al. 2014).

1.2.5) Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont présentes tout au long de l'intestin mais représentent un très faible pourcentage des cellules épithéliales intestinales. Ces cellules sont spécialisées dans la production d'hormones intestinales en réponse aux apports alimentaires et participent à la régulation de la digestion et de la motilité intestinale. Il existe plusieurs sous-types de cellules entéroendocrines selon les hormones produites et qui sont localisés dans des zones bien précises de l'intestin selon leurs fonctions (Gribble and Reimann 2016). Nous citerons quelques exemples de ces cellules. Au niveau gastrique, on retrouve les cellules enterochromaffines qui produisent de la sérotonine, neurotransmetteur responsable du péristaltisme intestinal, ou encore les cellules G productrices de la gastrine qui favorise la sécrétion d'acide dans le fundus gastrique et les cellules D productrices de la somatostatine qui a un rôle inhibiteur sur la sécrétion des hormones intestinales et diminue l'absorption des nutriments. Au niveau

proximal de l'intestin, au sein du duodénum, il existe les cellules K et les cellules I qui produisent respectivement le peptide insulinothrompé dépendant du glucose (GIP), favorisant la sécrétion d'insuline, et la cholécystokinine, hormone anorexigène. Enfin, au niveau distal de l'intestin, dans l'iléon et le côlon, on retrouve principalement les cellules L qui produisent le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), incrétine stimulant la sécrétion d'insuline et réduisant la sécrétion de glucagon, et le peptide YY (PYY), impliqué dans le ralentissement de la vidange gastrique.

1.2.6) Les cellules M

Les cellules M ou Microfold, sont localisées au niveau des plaques de Peyer, elles participent à la réponse immunitaire de l'intestin en étant spécialisées dans la présentation d'antigènes au tissu lymphoïde sous-jacent. Ces cellules ont une morphologie particulière, leur glycocalyx et leurs microvillosités sont réduits. De part cette spécificité, les cellules M assurent des fonctions de phagocytose et de transcytose d'antigènes et de microorganismes permettant ainsi leur transfert au niveau des follicules lymphoïdes et aboutissant à l'initiation de la réponse immunitaire par les cellules dendritiques et les lymphocytes (Mabbott et al. 2013). Les mécanismes de transcytose au niveau des cellules M sont peu connus, cependant un mécanisme ciblant les bactéries possédant des pili de type I a été identifié. En effet, les cellules M possèdent le récepteur Glycoprotéine 2 (GP2) à leur pôle apical, et ce récepteur reconnaît la protéine FimH, présente au sein des pili de type I. Ainsi, par ce mécanisme, les cellules M sont capables de transporter des entérobactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli* et *Salmonella enterica* à travers l'épithélium intestinal (Hase et al. 2009).

1.2.7) Les cellules Tuft

Les cellules Tuft présentent une morphologie atypique avec une forme allongée et un ensemble de microvillosités surdéveloppées au niveau apical. La nature de ces cellules a longtemps été méconnue. Initialement, les cellules Tuft ont été décrites comme ayant un rôle dans la chémoréception. Mais récemment, plusieurs groupes ont démontré un rôle des cellules Tuft dans la réponse immunitaire de type 2. Suite à une infection parasitaire helminthique, les cellules Tuft produisent la cytokine Interleukine-25 (IL-25)

entraînant la stimulation des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) qui permettent ensuite de lutter contre l'infection en favorisant le péristaltisme intestinal et la production de peptides antiparasitaires (Ting and von Moltke 2019).

1.2.8) Le renouvellement de l'épithélium intestinal : de la naissance à la mort des cellules épithéliales

L'épithélium intestinal est constamment exposé à un environnement luminal complexe pouvant altérer les cellules épithéliales. Dans ce contexte, l'épithélium doit procéder à un renouvellement rapide pour former une barrière efficace et assurer le bon fonctionnement de ses cellules. En moyenne, plus de 300 millions de cellules épithéliales sont générées chaque jour, ces cellules sont renouvelées tous les 3 à 5 jours, sauf les cellules de Paneth qui ont une durée de vie plus longue au sein des cryptes et sont renouvelées toutes les 3 à 6 semaines (Barker 2014). Dans ce paragraphe, nous décrirons les principales voies de signalisation impliquées dans le renouvellement de l'épithélium intestinal.

Le maintien de la prolifération cellulaire au sein des cellules souches intestinales est assuré par la voie Wnt/ β -caténine. En absence des ligands Wnt, il existe un complexe cytoplasmique formé par les protéines GSK3 β , APC, AXIN2 et CK1 capable de phosphoryler la β -caténine, ce qui entraîne ensuite sa dégradation par la cellule. Lorsque les ligands Wnt se fixent sur leurs récepteurs, la β -caténine est libérée de ce complexe et peut alors, sous sa forme non phosphorylée, se fixer sur des facteurs de transcription dans le noyau des cellules, comme Tcf4, induisant ensuite les voies de signalisation de la prolifération. Il a été montré que l'absence de Tcf4 chez des souris entraînait la perte des zones de prolifération au sein des cryptes démontrant ainsi l'importance de Tcf4 pour le maintien des cellules souches intestinales. Il existe plusieurs gènes codants pour les ligands Wnt. Les cellules de Paneth ont d'abord été identifiées comme étant une source de Wnt, et grâce à leur localisation entre les cellules souches CBCs, elles constituent une niche pour ces dernières (Sato et al. 2011). Par la suite, il a été montré que d'autres cellules non épithéliales, telles que les cellules stromales mésenchymateuses, étaient également capables de produire les ligands Wnt (Farin et al. 2012).

Les cellules filles issues de la division des cellules souches se différencient au cours de leur migration le long de l'axe crypto-villositaire. La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans ce processus, et notamment dans la détermination du lignage cellulaire. Si une cellule exprime le récepteur transmembranaire Notch, la fixation de ses ligands Delta et Jagged exprimés par une cellule voisine dans le contexte d'une interaction cellule-cellule entraîne le clivage du récepteur Notch. Le domaine intracellulaire du récepteur Notch migre ensuite dans le noyau où il assure la transcription de ses gènes cibles (Medema and Vermeulen 2011). Cette voie de signalisation est particulièrement importante au sein des cellules se trouvant au fond des cryptes. L'activation de la voie Notch permet l'expression de la protéine Hes-1 et inhibe l'expression des protéines Math-1 et Neurogenin-3, qui sont tous trois des facteurs de transcription déterminant le lignage. Un gain de fonction de la voie Notch, assuré par une forme constitutivement active du récepteur chez la souris, empêche le développement du lignage sécrétoire. En effet, ces souris ne présentent pas de cellules de Goblet ni de cellules entéroendocrines, signifiant que Hes-1 induit le profil entérocyte (Fre et al. 2005). A l'inverse, l'inhibition de la voie Notch chez la souris induit la réexpression de Math-1 et conduit à un lignage sécrétoire, avec notamment une production importante de cellules de Goblet (van Es et al. 2005). Ainsi, le modèle suivant a été proposé : à partir d'une cellule souche mère deux cellules filles sont obtenues, et parmi ces cellules filles, l'une peut exprimer la voie Notch et devenir un entérocyte tandis que l'autre peut avoir perdu la voie Notch en s'éloignant de la crypte et ainsi devenir une cellule sécrétrice (Yang et al. 2001).

L'épithélium intestinal se renouvelle constamment, ainsi lorsque les cellules épithéliales atteignent le haut des villosités, celles-ci sont exfoliées via un processus appelé anoïkis. L'anoïkis correspond à une perte de l'adhésion des intégrines à la matrice extracellulaire, ce qui entraîne alors l'apoptose des cellules. L'anoïkis peut également se produire au sein des cellules de la crypte lorsque celles-ci sont défectueuses. Ces processus sont régulés par les caspases et les homologues de Bcl-2 (Dufour et al. 2004).

1.3) La fonction barrière de l'épithélium intestinal

1.3.1) Les protéines des jonctions intercellulaires

Comme nous l'avons introduit dans les précédents paragraphes, la monocouche des cellules épithéliales intestinales forme une barrière physique et chimique, protégeant ainsi l'organisme des pathogènes et des toxines de l'environnement extérieur. D'une part, la composante physique est caractérisée par l'ensemble des protéines de jonctions reliant les cellules entre-elles et par la couche de mucus sécrétée par les cellules caliciformes ; d'autre part, la composante chimique est assurée par les peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales.

Les quatre types de complexes jonctionnels permettant de relier les cellules épithéliales entre-elles sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions communicantes, et les desmosomes (Fig. 5).

Les jonctions adhérentes encerclent les cellules épithéliales au niveau de leur pôle apical, elles sont localisées sous les jonctions serrées. Le complexe des jonctions adhérentes assure la liaison entre les cellules adjacentes grâce aux interactions entre les protéines transmembranaires appartenant à ce complexe ; il permet également le maintien de la polarité cellulaire. Les protéines transmembranaires E-cadhérines et nectines, dont les domaines extracellulaires permettent l'adhésion entre les cellules, sont reliées aux microfilaments d'actine du cytosquelette des cellules via les protéines cytoplasmiques d'ancrage, les caténines et les afadines. L'interaction entre les E-cadhérines de deux cellules adjacentes est dépendante de la présence de calcium, ce qui n'est pas le cas pour l'interaction entre les nectines (Meng and Takeichi 2009).

De même que les jonctions adhérentes, les desmosomes constituent des jonctions d'ancrage. Cependant, les desmosomes forment des plaques d'adhésion le long de la paroi latérale entre les cellules adjacentes. Au niveau de ces plaques, l'espace intercellulaire est appelé zone dense, il s'agit d'une zone d'interaction entre les cadhérines transmembranaires des deux cellules. Ces cadhérines, en particulier la desmocolline et la desmoglérine, sont liées à la desmoplakine au niveau cytoplasmique, elle-même attachée aux filaments intermédiaires. Ainsi, les desmosomes assurent l'architecture épithéliale et la résistance tissulaire (Garcia et al. 2018).

Les jonctions communicantes mettent en relation les cytoplasmes de deux cellules adjacentes, et assurent notamment l'échange d'ions et de métabolites de petite taille entre ces cellules. Elles forment des canaux au sein de la membrane plasmique, lesquels sont constitués des protéines connexines. L'assemblage de six connexines définissent le connexon au niveau de la membrane plasmique, et les canaux entre deux cellules sont constitués par deux connexons, un par cellule (Nielsen et al. 2012).

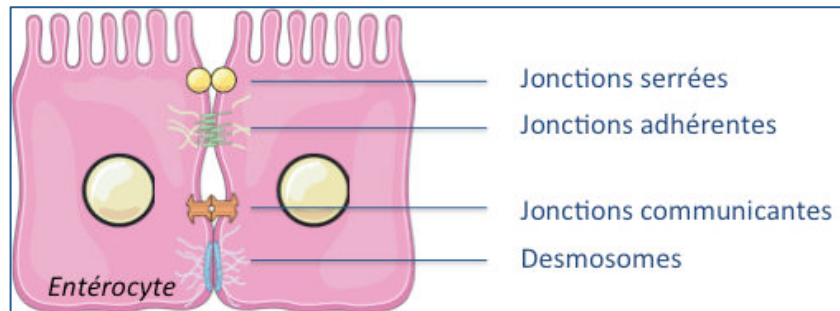


Figure 5 : Les quatre types de complexes jonctionnels entre les cellules épithéliales intestinales.

Les jonctions intercellulaires comportent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions communicantes, et les desmosomes.

Dans la suite de cette section, nous nous intéresserons plus particulièrement aux protéines des jonctions serrées. En effet, ces protéines jouent un rôle majeur dans la régulation de la perméabilité intestinale, et limitent le phénomène d'hyperperméabilité observé dans certaines pathologies. Nous développerons cet aspect dans le dernier paragraphe de cette partie.

L'observation en microscopie électronique des épithelia au sein de divers organes chez le rat et le cochon d'Inde a permis de caractériser la structure des jonctions serrées. Elles se situent au pôle apical des cellules épithéliales, et elles assurent un contact direct entre les cellules, formant ainsi une jonction étanche (Farquhar and Palade 1963). De part leur conformation, les jonctions serrées assurent le maintien des pôles apical et basolatéral, et empêchent notamment la diffusion des lipides membranaires entre ces deux zones. Elles interviennent également dans la régulation du flux paracellulaire, à savoir le passage de molécules entre les cellules, et forment un pore sélectif, permettant uniquement la diffusion des ions, de l'eau et de petites molécules. Les jonctions serrées sont composées d'un complexe de protéines transmembranaires et de protéines

cytoplasmiques reliées au cytosquelette. La liaison aux filaments d'actine leur permet ainsi de jouer également un rôle important dans des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la polarisation (Aijaz et al. 2006).

Les trois familles de protéines transmembranaires composant les jonctions serrées sont les occludines, les claudines et les « Junctional adhesion molecules » (JAMs). Ces protéines transmembranaires sont liées à des protéines cytoplasmiques, elles-mêmes reliées aux microfilaments d'actine. Les occludines et les claudines présentent plusieurs isoformes, elles possèdent deux boucles extracellulaires, et leurs domaines N- et C-terminaux sont situés au niveau cytoplasmique (Chiba et al. 2008). L'utilisation de modèles génétiques a permis de mettre en évidence les fonctions de chacune de ces deux familles. En effet, chez des souris invalidées pour l'occludine, aucun défaut morphologique n'a été observé à l'échelle des jonctions serrées. Cependant ces souris présentent des défauts de croissance, une hyperplasie de certains organes et une inflammation chronique. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'absence d'occludine pourrait affecter certaines voies de signalisation intracellulaire dans la mesure où sa région cytoplasmique est capable d'interagir avec de nombreuses protéines, ce qui expliquerait ces défauts. Toutefois, l'occludine ne semble pas être impliquée dans la formation des jonctions serrées, cette protéine aurait plutôt un rôle stabilisateur au sein du complexe des jonctions serrées (Saitou et al. 2000). A l'inverse, plusieurs études ont montré que l'invalidation des isoformes des claudines était associée à un défaut des jonctions serrées et de la fonction barrière. Par exemple, l'invalidation de la claudine-15 entraîne un phénotype d'hypertrophie intestinale associée à une augmentation de la prolifération, qui pourrait être expliqué par une altération du flux paracellulaire et du microenvironnement (Tamura et al. 2008). Dans d'autres types de tissus, il a été montré que l'invalidation des claudines modifiait directement la structure du complexe des jonctions serrées. Par exemple, l'absence de la claudine-11 entraîne une désorganisation des jonctions serrées dans les cellules de Sertoli (Gow et al. 1999). Ainsi, les claudines interviennent dans la formation des jonctions serrées. Les protéines JAMs sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elles présentent une unique région transmembranaire, deux domaines Ig-like extracellulaires, et une région C-terminale au niveau cytoplasmique. Il existe trois types de JAMs : JAM-A, JAM-B et JAM-C (Chiba et al. 2008). Tout comme les claudines, les JAMs interviennent dans la formation des jonctions serrées. En effet, il a été montré que la transfection de JAMs

dans des cellules ovariennes de hamster chinois, lesquelles ne forment initialement pas de jonctions serrées, était capable d'induire une adhésion intercellulaire et de réduire ainsi la perméabilité paracellulaire. Plus précisément, les protéines JAMs assurent la formation du complexe des jonctions serrées dans ce modèle en favorisant la localisation de l'occludine et de Zonula occludens-1 (ZO-1) au niveau de la membrane plasmique, protéine cytoplasmique des jonctions serrées que nous décrirons dans la suite de cette partie (Bazzoni et al. 2000).

Les protéines cytoplasmiques du complexe des jonctions serrées appartiennent aux familles des protéines « Membrane-associated guanylate kinase » (MAGUK) et des protéines « Partitioning defective » (Par). Ces protéines présentent un domaine PDZ dans leur région N-terminale qui leur permet d'interagir avec les régions C-terminales des protéines transmembranaires JAMs, occludines, et claudines. La région C-terminale de ces protéines cytoplasmiques permet quant à elle leur interaction avec le cytosquelette de la cellule (Guillemot et al. 2008). La famille des protéines MAGUK comprend les Zonula occludens-1,-2,-3. ZO-1 a été la première protéine cytoplasmique identifiée comme étant associée aux jonctions serrées (Stevenson et al. 1986) ; il s'agit d'ailleurs d'une des protéines les plus couramment utilisées comme marqueur du complexe des jonctions serrées. Les protéines ZO présentent trois domaines PDZ. Tout d'abord, le PDZ1 permet l'association des ZO aux claudines. Il a notamment été montré dans des cellules rénales « Madin-Darby canine kidney » (MDCK) que l'inactivation de ZO-1 et ZO-2 induisait un défaut dans la perméabilité paracellulaire qui était associé à une réduction des claudines-1 et -2 (Fanning et al. 2012). Ensuite, le PDZ2 permet la dimérisation des protéines ZO. L'importance de la dimérisation de ZO-1 a été mise en évidence dans les cellules épithéliales de glandes mammaires de souris Eph4 pour la polymérisation des claudines (Umeda et al. 2006). Le PDZ3 intervient dans la liaison entre ZO-1 et les protéines JAMs (Itoh et al. 2001). Enfin, les protéines cytoplasmiques présentent également, en plus des domaines PDZ, des domaines « Src homology 3 » (SH3) et « Guanylate kinase » (GuK) leur permettant de se lier aux occludines (Schmidt et al. 2004). Les protéines Par, et notamment le complexe Par3/aPKC/Par6, appartiennent également au complexe des jonctions serrées. Elles ont été découvertes chez le ver *Caenorhabditis elegans*, et il a été montré que ces protéines jouaient un rôle majeur dans le développement de la polarité embryonnaire (Kemphues et al. 1988). Les protéines Par3/aPKC/Par6 forment ainsi un complexe de polarité. Les protéines Par

présentent plusieurs domaines qui leur permettent d'interagir entre-elles. En effet, Par6 possède des domaines « Phox/Bem 1 » (PB1) et PDZ qui assurent sa liaison respectivement avec l'aPKC et Par3 (Chen and Zhang 2013). Il a été montré que le complexe Par3/aPKC/Par6 était uniquement capable de se lier aux protéines transmembranaires JAMs, notamment via le domaine PDZ de Par3 (Ebnet et al. 2003). L'importance du complexe de polarité dans la formation des jonctions serrées a été confirmée dans des cellules MDCK. En effet, la surexpression de Par3 favorise l'établissement de la résistance électrique transépithéliale qui reflète l'intégrité de l'épithélium, ce qui n'est pas observé dans le cas de la surexpression d'un mutant de Par3 invalidé pour son site de liaison avec l'aPKC (Hirose et al. 2002).

L'ensemble du complexe des jonctions serrées est présenté dans la figure ci-dessous.

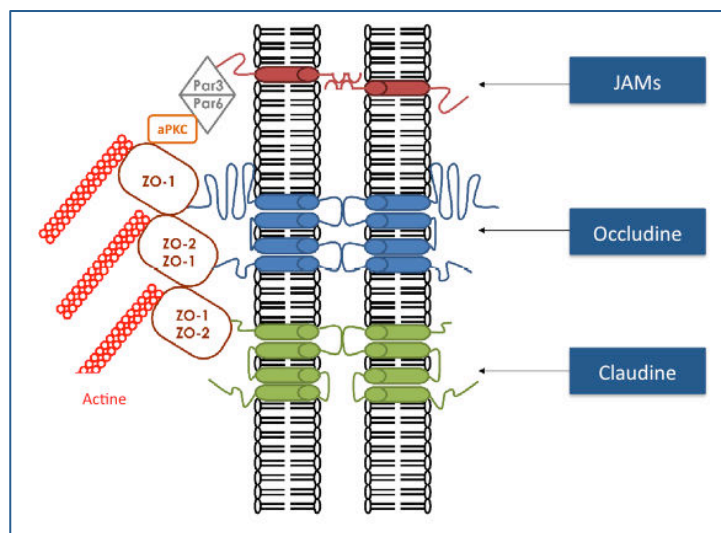


Figure 6 : Organisation des protéines des jonctions serrées.

Le complexe des jonctions serrées comporte des protéines transmembranaires et des protéines cytoplasmiques. Les trois types de protéines transmembranaires sont les JAMs, occludines, et claudines, lesquelles sont associées aux protéines cytoplasmiques Par3/aPKC/Par6, ZO-1 et ZO-2, elles-mêmes reliées aux microfilaments d'actine. (D'après (Rowart et al. 2018)).

1.3.2) Altérations de la perméabilité intestinale dans certaines pathologies

L'épithélium intestinal constitue une barrière semi-perméable dans la mesure où il permet l'absorption des nutriments essentiels à la survie de l'organisme tandis qu'il empêche le passage de composés nuisibles pour la santé de l'hôte tels que des toxines ou des pathogènes. Les deux voies de passage à travers l'épithélium sont la voie paracellulaire et la voie transcellulaire. La voie paracellulaire correspond au passage d'ions et de molécules telles que l'eau entre deux cellules adjacentes ; la voie transcellulaire permet l'absorption de nutriments tels que les monosaccharides, les acides gras, les acides aminés, les minéraux et les vitamines, à travers la cellule grâce à des transports passif, actif, ou par endocytose et exocytose. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons particulièrement à la perméabilité paracellulaire et aux conséquences pathologiques liées à des dysfonctions de cette voie.

Parmi les protéines des jonctions serrées, ce sont notamment les claudines qui jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité paracellulaire, alors que l'occludine semble plutôt exercer une fonction stabilisatrice. Il existe de nombreuses protéines appartenant à la famille des claudines, certaines sont impliquées dans la fonction barrière et induisent ainsi une diminution de la perméabilité paracellulaire (claudines-1,-3,-4,-5,-8,-9,-11,-14), et d'autres contribuent à la formation des pores et à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (claudines-2,-7,-12,-15) (Suzuki 2013). En cas d'altération de la fonction barrière de l'épithélium intestinal, associée à une déstabilisation des protéines des jonctions serrées, une hyperperméabilité paracellulaire se met en place causant généralement une inflammation de la muqueuse intestinale (Fig. 7).

L'hyperperméabilité intestinale est observée dans de nombreuses pathologies chez l'homme, incluant à la fois des maladies intestinales telles que la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, le cancer colorectal, et des maladies extra-intestinales telles que l'obésité, le diabète, la dépression, ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. A titre d'exemples, nous ne développerons que les cas de la maladie de Crohn et de l'obésité.

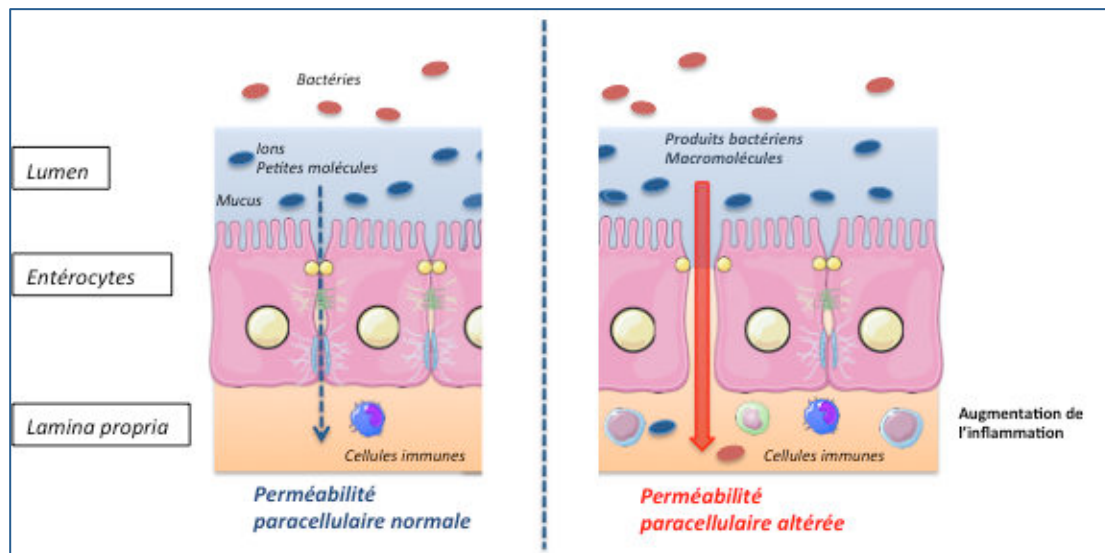


Figure 7 : Comparaison des voies paracellulaires en conditions saine et altérée.

En cas d'altération de la barrière intestinale, l'hyperperméabilité facilite le passage de produits bactériens et de macromolécules dans l'organisme induisant alors un recrutement et une activation des cellules immunes et de ce fait un état inflammatoire.

La maladie de Crohn fait partie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Elle se caractérise par une inflammation pouvant toucher toutes les parties du tube digestif. Les patients alternent entre des phases de crises associées à des douleurs abdominales et des phases de rémission sans symptômes apparents. Les causes de cette maladie sont multiples et incluent des facteurs génétiques, auto-immuns, et environnementaux. Les patients atteints de la maladie de Crohn présentent une hyperperméabilité intestinale (Welcker et al. 2004), une diminution de la résistance de la barrière intestinale associée à une altération et une discontinuité des protéines des jonctions serrées le long de la membrane plasmique (Zeissig et al. 2007). Une étude a montré à partir de biopsies prélevées chez des patients dans des zones inflammatoires du côlon, une diminution de l'expression de l'occludine, des claudines-5 et -8, une expression inchangée des claudines-1 et -4, et une augmentation de la claudine-2 par rapport à des sujets en phase de rémission. Au niveau des zones inflammées chez les patients, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont présentes dans la muqueuse et peuvent participer à l'altération de la barrière intestinale. Les auteurs de cette étude ont ainsi mis en évidence sur des cellules HT-29 issues d'un adénocarcinome de côlon humain que le « tumor necrosis factor » α (TNF α) était capable d'augmenter l'expression de la claudine-2, montrant ainsi que les cytokines interviennent dans la régulation des

jonctions serrées (Zeissig et al. 2007). Toutefois, des études suggèrent que l'hyperperméabilité associée à l'altération des jonctions serrées pourrait être le facteur initial dans la pathogenèse, précédant ainsi le développement de l'inflammation. En effet, des études ont montré que des sous-groupes de parents proches de patients atteints de la maladie de Crohn présentaient une hyperperméabilité intestinale sans pour autant présenter de symptômes apparents, permettant alors d'émettre d'hypothèse que la perméabilité intestinale pourrait être un facteur de risque dans le développement de la maladie de Crohn (May et al. 1993).

L'obésité est une maladie métabolique caractérisée par une inflammation de bas grade et une résistance à l'insuline. Le lien entre obésité et hyperperméabilité intestinale a notamment été décrit dans des modèles de rongeurs soumis à un régime hyperlipidique. En effet, un groupe a montré que des souris nourries avec un régime hyperlipidique pendant quatre semaines présentaient une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une diminution de l'expression transcriptionnelle des protéines des jonctions serrées ZO-1 et occludine. De plus, ces souris présentaient également une endotoxémie métabolique, observée par l'augmentation des lipopolysaccharides (LPS) dans le sang (Cani et al. 2008). Or, ce même groupe avait déjà montré dans une étude précédente que l'endotoxémie métabolique chez des souris soumises à un régime hyperlipidique était associée à une modulation du microbiote de ces souris. Les auteurs ont notamment mis en évidence une baisse des *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et des *Eubacterium rectale/Clostridium coccoïdes* chez les souris obèses (Cani et al. 2007). De manière intéressante, il a été montré par la suite qu'un traitement avec des antibiotiques, ayant pour but d'induire des changements du microbiote, chez des souris soumises à un régime hyperlipidique, induisait une diminution de l'endotoxémie, de la perméabilité intestinale, et restaurait les niveaux d'expression de ZO-1 et de l'occludine. Ainsi, les modulations du microbiote en réponse à un régime hyperlipidique pourraient être à l'origine du phénomène d'hyperperméabilité dans un contexte d'obésité chez les rongeurs (Cani et al. 2008). Toutefois, les données sur la relation entre l'obésité et l'hyperperméabilité chez l'homme ne sont pas toutes concordantes. En effet, certaines études ne montrent pas de modifications de perméabilité chez les sujets obèses (Brignardello et al. 2010) tandis que d'autres observent une augmentation de la perméabilité chez ces patients (Teixeira et al. 2012). Une étude plus récente suggère que les patients obèses présenteraient de légers défauts

de la barrière intestinale, expliquant ainsi les différences observées dans la littérature. En effet, à partir de biopsies de jéjunum prélevées lors d'interventions chirurgicales, il a été montré que la perméabilité *ex vivo* n'était augmentée chez les sujets obèses qu'avec l'utilisation d'un traceur couplé à un fluorochrome d'une taille de 0,4 kDa, et non avec des traceurs de taille supérieure de 4 kDa ou 10 kDa. Cette altération de la barrière était notamment associée à une diminution de l'expression de l'occludine chez les patients atteints d'obésité sévère. De plus, les auteurs ont montré qu'une charge lipidique à base de micelles permettait une augmentation de la perméabilité à des molécules de taille plus importante de 4 kDa au niveau du jéjunum de sujets obèses, suggérant ainsi que les lipides pourraient exacerber la perméabilité intestinale (Genser et al. 2018).

2) L'AMPK, une protéine kinase aux effets pléiotropes

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire présente chez tous les eucaryotes. Le rôle canonique de l'AMPK est d'assurer le maintien du statut énergétique des cellules. En effet, cette protéine est particulièrement sensible aux variations d'énergie dans la cellule : en cas de stress énergétique entraînant la diminution de l'ATP et l'augmentation de l'AMP, l'AMPK est activée et va ensuite stimuler des voies cataboliques et inhiber des voies anaboliques, ce qui permet de restaurer la balance énergétique de la cellule. L'AMPK est également capable de réguler le statut énergétique à l'échelle de l'organisme, notamment de par son rôle dans la régulation de la prise alimentaire. La découverte de cibles activées ou inhibées par l'AMPK en absence de variations du statut énergétique a permis d'élargir ses fonctions. De nombreuses études s'intéressent maintenant au rôle de l'AMPK dans le cancer, l'autophagie, l'inflammation, ou encore dans l'intégrité des cellules épithéliales. Etant donné la diversité de ses fonctions au sein de l'organisme, l'AMPK peut être considérée comme une cible potentielle pour prévenir ou limiter de nombreuses pathologies. De plus en plus d'activateurs sont développés à des fins thérapeutiques. Dans cette deuxième partie, nous nous intéresserons à la structure de l'AMPK, ses différents modes de régulation, ses principales fonctions, et aux modes d'action des activateurs et inhibiteurs.

2.1) La découverte d'une enzyme clé du métabolisme

L'AMPK a été découverte à la fin des années 1970. Une première étude chez le rat a permis la caractérisation d'une enzyme hépatique capable de phosphoryler et d'inhiber l'hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase impliquée dans la synthèse du cholestérol (Bove and Hegardt 1978). Une seconde étude, également menée chez le rat, a mis en évidence la présence d'une autre kinase hépatique phosphorylant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), et inhibant ainsi la synthèse d'acides gras (Hardie et al. 1986). C'est en 1987 que le groupe de Grahame Hardie démontre que ces deux kinases précédemment identifiées dans la littérature, toutes deux régulées par l'AMP et par des processus de phosphorylation, constituaient en fait la même protéine (Carling et al. 1987). Cette protéine fut par la suite nommée AMPK du fait de son activation allostérique par l'AMP. Des expériences de clonage de l'ADN codant pour l'AMPK du muscle squelettique humain ont permis de mieux caractériser ses fonctions (Beri et al. 1994). L'AMPK est une protéine ubiquitaire présente dans les cellules eucaryotes de la plupart des organismes du règne animal. Des homologues de l'AMPK existent également chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il s'agit du « sucrose non-fermenting 1 » (SNF1) (Hong et al. 2003), et chez les plantes, le « SNF1-related protein kinase » (SnRK1) (Margalha et al. 2016). L'AMPK est de nos jours principalement connue pour être un senseur de l'état énergétique des cellules, mais elle possède également d'autres fonctions non métaboliques que nous détaillerons au cours de cette deuxième partie.

2.2) La structure hétérotrimérique de l'AMPK

L'AMPK est formée par un complexe hétérotrimérique, composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ . La structure de l'AMPK ainsi que les interactions entre les sous-unités ont été étudiées dans les années 2000 grâce à l'isolement des différents domaines. Chez les vertébrés, chaque sous-unité existe sous plusieurs isoformes, chacune étant codée par un gène unique (Fig. 8). Les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont codées par les gènes *PRKAA1* et *PRKAA2*, les isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ par *PRKAB1* et *PRKAB2*, et les isoformes $\gamma 1$, $\gamma 2$, et $\gamma 3$ par *PRKAG1*, *PRKAG2*, et *PRKAG3*. Ces sept

isoformes peuvent en théorie former jusqu'à douze complexes hétérotrimériques différents. Selon les espèces, les types cellulaires, la localisation subcellulaire, différents complexes d'AMPK peuvent être observés, chaque complexe ayant des fonctions et des propriétés régulatrices propres (Ross et al. 2016). Nous détaillerons cet aspect dans la suite de ce paragraphe.

La sous-unité α est composée du domaine kinase catalytique, la boucle α -KD, situé en région N-terminale. C'est à ce niveau que se trouve la thréonine-172 (Thr172) qui peut être phosphorylée par des kinases, ce qui permet d'augmenter de manière importante l'activation de l'AMPK. Les deux kinases décrites dans la littérature comme étant capables de phosphoryler l'AMPK sont le suppresseur de tumeur « Liver kinase B1 » (LKB1) (Woods et al. 2003) et la « Calmodulin-dependent protein kinase kinase β » (CaMKK β) (Hawley et al. 2005). Une troisième kinase a également été identifiée, la « TGF- β activated kinase 1 » (TAK1) (Xie et al. 2006), toutefois cette kinase semble phosphoryler l'AMPK dans des conditions particulières (Neumann 2018). Le domaine kinase est suivi d'un domaine d'auto-inhibition (α -AID) capable d'interagir avec ce dernier et de le maintenir dans une forme inactive en absence d'AMP. Ensuite, il existe un domaine α -linker intervenant dans la régulation allostérique de l'AMPK. En effet, lorsque l'AMPK est activée par la liaison de l'AMP à la sous-unité γ (interaction que nous détaillerons dans la suite de ce paragraphe), le domaine α -linker pourrait également se lier à la sous-unité γ entraînant la dissociation de l' α -AID avec le domaine kinase, permettant ainsi de maintenir l'AMPK dans une forme active (Xin et al. 2013). Le domaine C terminal (α -CTD) constitue un domaine de liaison avec la sous-unité β et possède une boucle ST, riche en sérine/thréonine, dont la phosphorylation par d'autres kinases entraîne l'inhibition de l'AMPK. Ce domaine terminal comprend également une séquence d'exportation nucléaire (NES).

La sous-unité β possède un site de myristoylation en position N-terminale impliqué dans des processus de relocalisation de l'AMPK. Deux études ont montré que la myristoylation de cette sous-unité était impliquée, d'une part, dans la localisation de l'AMPK à la membrane des mitochondries défectueuses pour leur élimination (Liang et al. 2015), et d'autre part, dans la localisation de l'AMPK au lysosome favorisant la phosphorylation de la Thr172 et ainsi son activation (Zhang et al. 2014). Ensuite, la sous-unité présente un domaine de liaison avec le glycogène (β -GBD). La fixation du

glycogène à ce domaine permet à l'AMPK d'interagir avec des cibles spécifiques du métabolisme du glycogène telles que la glycogène synthase et la glycogène phosphorylase impliquées respectivement dans la glycogénogénèse et la glycogénolyse (Polekhina et al. 2003). Par ailleurs, il existe un site d'autophosphorylation de la Ser-108 au niveau du β -GBD qui joue un rôle important pour l'effet de certains activateurs de l'AMPK. En effet, il existe un site de fixation de certains activateurs directs de l'AMPK, localisé entre le β -GBD et la boucle α -KD, et la phosphorylation de la Ser-108 est requise pour leur effet sur l'activation allostérique de l'AMPK (Sanders et al. 2007). Nous détaillerons l'importance de ce site particulier dans la suite de ce chapitre. La région C-terminale contient un site d'interaction (β -SID) permettant de lier le α -CTD à la région N-terminale de la sous-unité γ et assurant ainsi un bon assemblage du complexe hétérotrimérique.

La sous-unité γ possède un domaine de liaison avec la sous-unité β en région N-terminale, puis présente une répétition de quatre motifs cystathionine β synthase (CBS), qui constituent des sites de liaison des nucléotides ATP, ADP, et AMP. La liaison de ces nucléotides aux motifs CBS permet de moduler l'activité de l'AMPK puisque l'AMP et l'ADP favorisent l'activation de l'AMPK, alors que l'ATP entraîne l'inhibition de l'AMPK (Scott et al. 2004). Les motifs CBS1 et CBS3 sont capables de lier les trois nucléotides, le CBS4 lie uniquement l'AMP, et le CBS2 n'est lié à aucun des nucléotides. La liaison de l'AMP permet l'activation allostérique de l'AMPK, facilite la phosphorylation de la Thr172 par LKB1, et empêche sa déphosphorylation par des phosphatases, tandis que la liaison de l'ADP empêche juste la déphosphorylation (Xiao et al. 2011). Comme expliqué précédemment dans le paragraphe, lorsque l'AMP se fixe au motif CBS, le domaine α -linker se lie à la sous-unité γ et empêche l' α -AID d'exercer son rôle d'inhibition. Inversement, lorsque l'ATP se lie au motif CBS, le domaine α -linker se détache de la sous-unité γ et l' α -AID adopte une nouvelle conformation induisant la perte d'activation de l'AMPK.

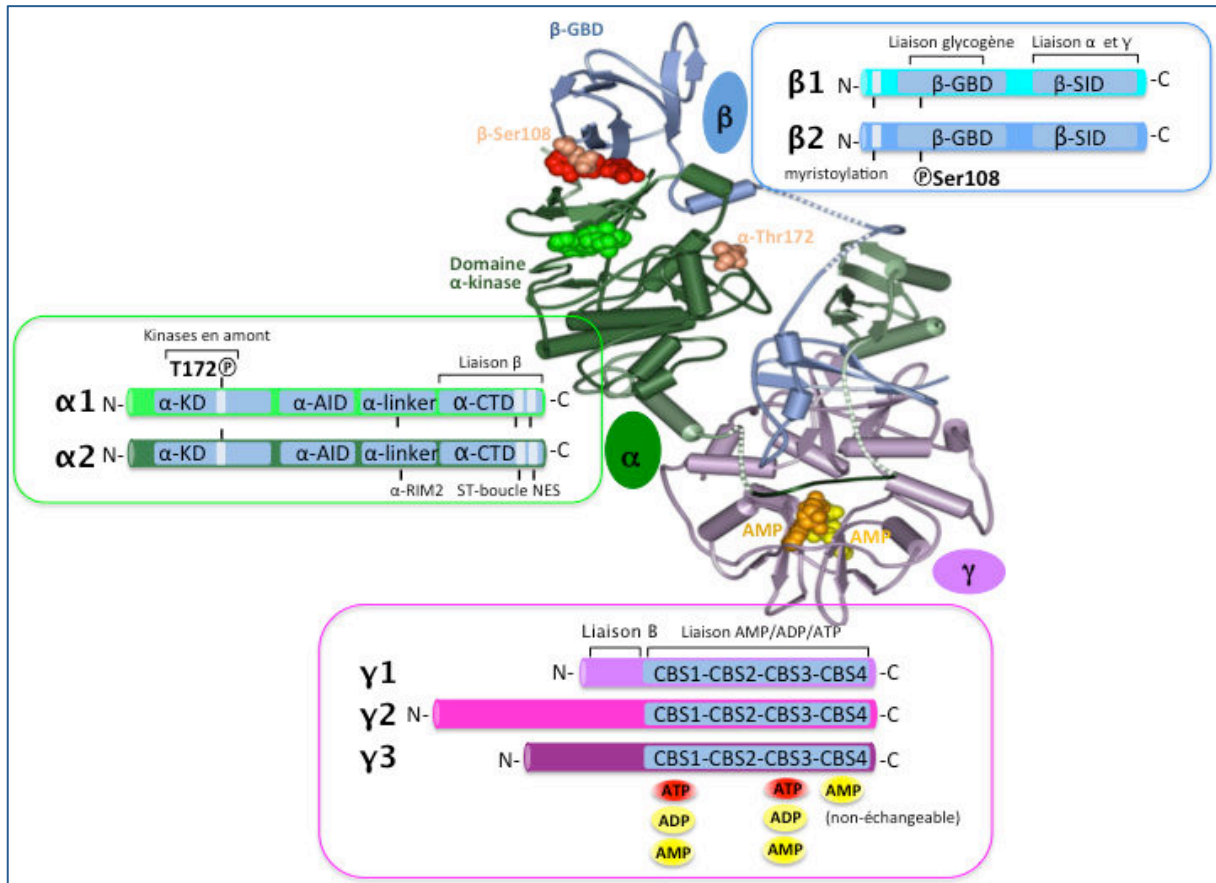


Figure 8 : Les trois sous-unités de l'AMPK et leurs différentes isoformes.

La structure cristallographique de l'AMPK (Xiao et al. 2013) présente une sous-unité α (vert), une sous-unité β (bleu) et une sous-unité γ (rose), des sites de phosphorylation α -Thr172 et β -Ser108 (marron), un domaine α -kinase (vert), et deux molécules d'AMP fixées à la sous-unité γ . La sous-unité α présente deux isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$; elle est composée d'un domaine kinase (α -KD), d'un domaine d'auto-inhibition (α -AID), et d'un domaine C terminal (α -CTD). La sous-unité β présente deux isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$; elle est composée d'un site de myristoylation, d'un domaine de liaison avec le glycogène (β -GBD), et d'un site d'interaction avec les sous-unités α et γ (β -SID). La sous-unité γ présente trois isoformes $\gamma 1$, $\gamma 2$, et $\gamma 3$; elle est composée de quatre motifs cystathionine β synthase (CBS) où les CBS1 et CBS3 peuvent être liés à l'AMP, l'ADP, et l'ATP, et le CBS4 à l'AMP. RIM : « regulatory-subunit-interacting motif, ST-boucle : boucle riche en sérine/thréonine, NES : séquence d'exportation nucléaire. (D'après (Olivier et al. 2018)).

L'ensemble des isoformes des sous-unités de l'AMPK permet potentiellement la formation de douze complexes hétérotrimériques. Chaque complexe d'AMPK est unique, la prépondérance de ces complexes dépend de l'espèce et du tissu, et leur localisation

subcellulaire leur confère une fonction propre. A titre d'exemple, nous comparerons dans ce paragraphe, les complexes d'AMPK présents au niveau du muscle squelettique, du foie, et du macrophage chez l'homme et la souris (Fig. 9).

Au niveau du muscle squelettique chez l'homme et la souris, des expériences de co-immunoprécipitation, suivies par des expériences de Western blot utilisant des anticorps dirigés contre les différentes isoformes des sous-unités de l'AMPK ont permis de mettre en évidence les complexes d'AMPK majoritaires chez ces espèces. Chez l'homme, trois complexes hétérotrimériques majoritaires ont été identifiés : $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$, $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$, et $\alpha 1/\beta 2/\gamma 1$, le complexe $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$ étant le plus abondant (Wojtaszewski et al. 2005). De manière surprenante, il a été montré que lors d'un exercice physique de haute intensité, seul le complexe $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ était phosphorylé, et de ce fait activé, bien que ce ne soit pas le complexe majoritaire (Birk and Wojtaszewski 2006). Dans la mesure où l'activité du muscle squelettique dépend des disponibilités en glucose et en glycogène, les auteurs ont émis l'hypothèse que le complexe $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ était davantage sensible au métabolisme du glycogène, suggérant ainsi une réponse différente des complexes d'AMPK au stress énergétique. Chez la souris, le complexe majoritaire retrouvé dans le muscle soléaire et le muscle long extenseur est identique à celui de l'homme (Treebak et al. 2009). Concernant l'étude des complexes d'AMPK dans le macrophage et le foie chez l'homme et la souris, l'abondance relative des isoformes des sous-unités de l'AMPK a pu être déterminée par différentes méthodologies permettant alors d'envisager les complexes majoritaires ; toutefois, la présence des différents complexes n'a pas été démontrée dans ces deux cas. Dans le macrophage, l'homme et la souris pourraient présenter le même complexe prédominant, il s'agit du complexe $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ (Kanellis et al. 2006) (Galic et al. 2011) (Obba et al. 2015). Cependant, il existe des différences entre ces deux espèces au niveau hépatique. En effet, une étude s'est intéressée aux différentes isoformes des sous-unités présentes dans le foie chez la souris et l'homme. Les auteurs ont montré que trois complexes étaient possibles chez la souris : $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$, $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$, et $\alpha 1/\beta 1/\gamma 2$, et que le complexe majoritaire chez l'homme pourrait être le suivant $\alpha 1/\beta 2/\gamma 1$ (Stephene et al. 2011). Ces données ont récemment été validées par notre équipe (Boudaba et al. 2018). Par ailleurs, des expériences de protéomique ont également permis de mettre en évidence des différences au niveau de l'expression des isoformes de l'AMPK chez l'homme, le rat, et le chien (Wu et al. 2013). Dans l'intestin, les complexes prédominants de l'AMPK sont encore inconnus. Toutefois,

notre équipe a pu montrer la présence des isoformes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, et $\gamma 2$ au sein de l'épithélium intestinal de souris (données non publiées), et un autre groupe travaillant sur les cellules intestinales humaines Caco-2 a montré la présence de toutes les isoformes dans ces cellules (Harmel et al. 2014).

La diversité des formes d'AMPK apparaît comme tissu dépendant et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. Le développement de médicaments ciblant spécifiquement certaines formes de l'AMPK permettrait ainsi un traitement localisé dans certaines pathologies. Cependant, les divergences observées entre espèces présentent un aspect limitant pour les études précliniques.

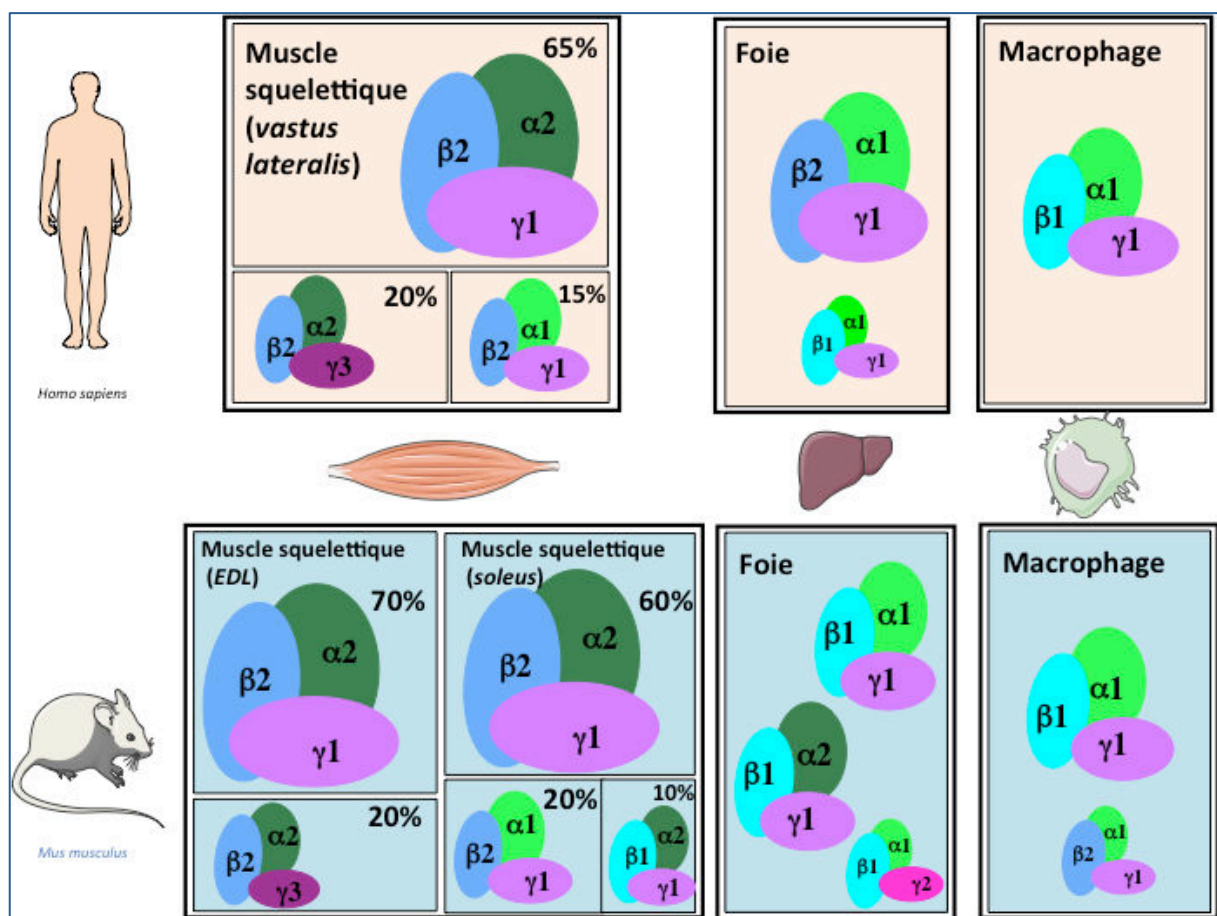


Figure 9 : Comparaison des différents complexes d'AMPK présents dans le muscle squelettique, le foie, et le macrophage chez l'homme et la souris.

Les complexes d'AMPK prédominants dans le muscle ont été déterminés par des expériences d'immunoprécipitation. Dans le macrophage et le foie, l'étude de l'abondance des isoformes des sous-unités de l'AMPK a permis d'envisager les complexes possibles. (D'après (Olivier et al. 2018)).

2.3) L'AMPK : de sa régulation à ses multiples fonctions

L'AMPK est souvent décrite comme un senseur de l'état énergétique des cellules. Cependant des études récentes ont mis en évidence d'autres rôles de l'AMPK, notamment dans la croissance cellulaire, la différenciation, l'autophagie, ou encore la polarité cellulaire. L'AMPK est particulièrement sensible au statut métabolique de la cellule et réagit aux stimuli affectant la cellule, ce qui lui permet d'enclencher des voies de signalisation et d'assurer l'ensemble de ses fonctions. Dans cette partie, nous nous intéresserons d'abord à la régulation physiologique de l'AMPK, puis nous décrirons quelques-uns de ses rôles majeurs.

2.3.1) La régulation de l'AMPK

En phase de repos, lorsque la cellule n'est soumise à aucune contrainte particulière, l'AMPK présente une activité basale relativement faible. L'activation de l'AMPK survient en réponse à des situations physiologiques où la cellule subit un stress. Les deux voies permettant d'activer l'AMPK sont l'activation allostérique et l'activation par la phosphorylation de la Thr172, qui multiplie son activité basale respectivement par dix et par mille (Gowans et al. 2013). Plusieurs mécanismes sont à l'origine de l'activation de l'AMPK. Dans ce paragraphe nous nous intéresserons aux régulateurs physiologiques intervenant dans ce processus. Il existe également des molécules naturelles et synthétiques capables de réguler l'activité de l'AMPK, nous détaillerons ces mécanismes dans un autre chapitre.

2.3.1.a) Régulation par les nucléotides

Comme nous l'avons décrit dans la partie précédente portant sur la structure de l'AMPK, la sous-unité régulatrice γ présente les motifs CBS qui sont des sites de fixation des nucléotides AMP, ADP, et ATP. La régulation de l'activité de l'AMPK dépend fortement de la quantité de ces nucléotides au sein de la cellule, et notamment des variations des rapports ADP/ATP et AMP/ATP. L'ATPase, l'ATP synthase et l'adenylate kinase font partie des enzymes clés contrôlant l'homéostasie énergétique de la cellule. Elles catalysent les réactions d'interconversion suivantes : $ATP \rightarrow ADP + P_i$, $ADP +$

$P_i \rightarrow ATP$, et $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$. En condition basale, l'ATP synthase permet de maintenir un rapport ADP/ATP de 1/10. Cependant, en cas de stress énergétique, lorsque l'activité de l'ATPase est plus importante que celle de l'ATP synthase, l'adenylate kinase va entraîner la synthèse d'ATP et d'AMP, et les rapports ADP/ATP et AMP/ATP sont alors augmentés. D'après la réaction catalysée par l'adenylate kinase, le rapport AMP/ATP varie comme le carré du rapport ADP/ATP. Ainsi, une augmentation d'un rapport dix du rapport ADP/ATP correspond à une augmentation d'un rapport cent du rapport AMP/ATP, ce qui implique que le nucléotide variant le plus en réponse à un stress énergétique est l'AMP (Hardie and Hawley 2001). Divers phénomènes sont à l'origine d'un stress énergétique, et donc de l'inhibition de la production d'ATP ou de l'accélération de la consommation d'ATP; nous pouvons citer la restriction calorique, l'ischémie ou encore l'exercice physique. Suite à une diminution de l'ATP, l'augmentation de l'AMP et de l'ADP vont jouer un rôle clé dans l'activation de l'AMPK en intervenant à différents niveaux, ce qui permettra à l'AMPK d'agir sur plusieurs voies de signalisation et de rétablir la balance énergétique de la cellule. Tout d'abord, l'AMP va se fixer sur les motifs CBS1, CBS3, et/ou CBS4, et remplace notamment l'ATP initialement fixé sur les motifs CBS1 et CBS3 en phase de repos. La fixation de l'AMP entraîne des changements de conformation de l'AMPK, et induit son activation allostérique, favorise la phosphorylation de la Thr172 par la kinase LKB1, et empêche également sa déphosphorylation. Comme nous l'avions mentionné dans la partie précédente, lorsque l'AMP se lie au motif CBS3, cela permettrait la liaison de l' α -linker à ce domaine entraînant une rotation de l' α -AID et l'empêchant ainsi d'inhiber l'activité de l'AMPK (Xin et al. 2013) (Fig. 10). Ces changements de conformation permettraient donc d'expliquer l'activation allostérique de l'AMPK. De manière similaire, la liaison de l' α -linker au CBS3 entraînerait une conformation de l'AMPK qui maintiendrait la Thr172 phosphorylée dans une poche située entre les sous-unités α et γ , la protégeant des processus de déphosphorylation par des phosphatases. Une première étude menée sur les cellules rénales Cos7 a permis de montrer que la fixation de l'AMP aux motifs CBS entraînait la phosphorylation de l'AMPK par les kinases LKB1 et CaMKK β , seulement lorsque la sous-unité β était myristoylée (Oakhill et al. 2010). Cependant, une autre étude menée à partir de foie de rat purifié a montré que l'AMP était uniquement capable de favoriser la phosphorylation de l'AMPK par LKB1 (Gowans et al. 2013). Les données indiquant que la fixation de l'AMP sur l'AMPK pourrait favoriser la phosphorylation de

l'AMPK par la CaMKK β sont encore contradictoires. Concernant les autres nucléotides de la cellule, l'ADP et l'ATP peuvent se fixer sur les motifs CBS1 et CBS3. L'ADP, de même que l'AMP, est également capable d'inhiber la déphosphorylation de la Thr172, le potentiel de l'AMP étant dix fois plus puissant. Cependant l'ADP ne permet pas l'activation allostérique de l'AMPK (Gowans et al. 2013). A l'inverse, l'ATP, en se fixant sur les motifs CBS1 et CBS3, présente un rôle opposé à ceux de l'AMP et de l'ADP, et permet à l'AMPK de rester dans une conformation inactive (Chen et al. 2012).

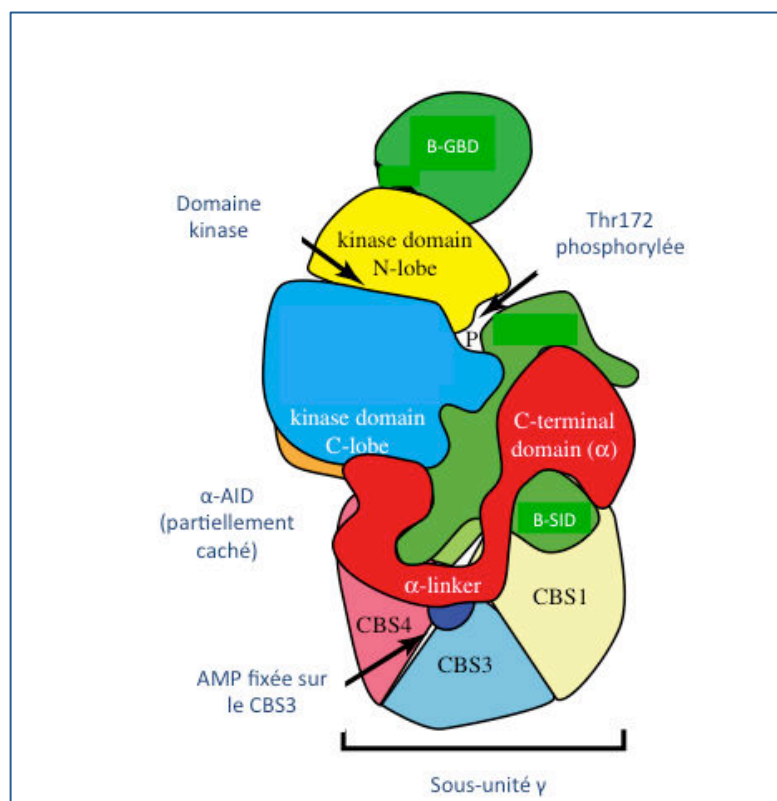


Figure 10 : *Changements de disposition des domaines de l'AMPK lorsque l'AMP se fixe au CBS3.*

Modèle de l'AMPK basé sur la structure cristallographique du complexe humain $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ présentant la phosphorylation de la Thr172. Cette orientation permet de visualiser le domaine kinase, l' α -linker, l' α -CTD de la sous-unité α , le β -GBD et β -SID de la sous-unité β , et les domaines CBS1, CBS3, et CBS4 de la sous-unité γ . (D'après (Hardie 2018)).

2.3.1.b) Activation par phosphorylation

Bien que les effets de l'activation allostérique de l'AMPK soient non négligeables, la phosphorylation de la Thr172 entraîne une activation maximale. Comme introduit précédemment, les deux kinases principales capables de phosphoryler l'AMPK sont LKB1 et la CaMKK β . La phosphorylation de l'AMPK par ces deux kinases s'effectue selon des contextes différents : LKB1 en réponse à des modifications énergétiques, et la CaMKK β suite à l'augmentation du calcium intracellulaire. L'identité de ces deux kinases a été détectée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* grâce à l'étude de la kinase Snf1, homologue de l'AMPK. Dans ce modèle, les auteurs ont montré que les trois kinases Tos3p, Pak1p, et Elm1p permettaient la phosphorylation de Snf1. Ces trois kinases sont indispensables au bon fonctionnement de Snf1, puisque des mutations de ces kinases altèrent l'activité kinase de Snf1. L'étude du domaine catalytique de Tos3p, Pak1p, et Elm1p a mis en évidence une étroite similarité avec LKB1 et les kinases de la famille CaMKK, présentes chez les mammifères. Une expérience préliminaire conduite dans cette même étude a permis de confirmer la phosphorylation de l'AMPK par LKB1 *in vitro* (Hong et al. 2003).

LKB1

LKB1 est une sérine/thréonine kinase définie comme étant un suppresseur de tumeur. Cette protéine a initialement été associée au syndrome de Peutz-Jeghers, caractérisé par une prédisposition à développer des polypes intestinaux et des tumeurs dans d'autres tissus. En effet, des mutations du gène *LKB1*, entraînant une inactivation de la protéine, sont retrouvées chez les patients atteints de ce syndrome (Hemminki et al. 1998). Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation de LKB1 chez des souris était létale durant la gestation. Ces souris présentent des anomalies au niveau vasculaire avec notamment une dérégulation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Ylikorkala et al. 2001). L'activité de LKB1 dépend de son association avec la protéine Ste20-related adaptor (STRAD), et la fixation de la mouse protein 25 (MO25) à ce complexe favorise sa stabilisation et augmente l'activité kinase de LKB1 (Boudeau et al. 2003). L'association de LKB1 avec STRAD et MO25 est notamment nécessaire pour la phosphorylation de l'AMPK sur la Thr172 (Hawley et al. 2003). Le lien entre LKB1 et l'AMPK a été étudié dans plusieurs types cellulaires. Par exemple, une étude s'est

intéressée aux conséquences de l'expression d'une forme inactive de LKB1 dans les cellules CCL13, cellules épithéliales de foie d'origine humaine n'exprimant pas LKB1, par rapport à l'expression d'une forme sauvage. Suite à deux types de stimuli censés activer l'AMPK, un stress hyperosmotique et l'utilisation de peroxyde d'hydrogène, l'inactivation de LKB1 diminue très fortement l'activité de l'AMPK (Woods et al. 2003). LKB1 apparaît comme étant constitutivement active (Woods et al. 2003), cependant comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, la fixation de l'AMP à la sous-unité γ de l'AMPK entraîne des changements de conformation de la protéine favorisant ainsi la phosphorylation de la Thr172 par LKB1 (Gowans et al. 2013).

CaMKK β

La CaMKK β a été décrite comme la deuxième kinase capable de phosphoryler la Thr172 de l'AMPK, mais indépendamment des variations de quantités de nucléotides dans la cellule. La possibilité que la CaMKK puisse activer l'AMPK a été évoquée dès l'année 1995. En effet, suite à une inactivation de l'AMPK avec des phosphatases, il a été montré que la CaMKK, en présence de la Ca²⁺/Calmoduline, était capable de légèrement augmenter son activité (Hawley et al. 1995). Par la suite, d'autres groupes ont prouvé que LKB1 était la principale kinase activatrice de l'AMPK et se sont donc concentrés sur son mode d'action. Cependant, la présence d'une faible activité de l'AMPK dans certains types de cellules invalidées pour LKB1 a laissé penser que d'autres kinases pouvaient également être capables de phosphoryler la Thr172, et cela a déclenché un regain d'intérêt pour l'étude de la CaMKK. Cette hypothèse a été confirmée dans une étude réalisée sur des cellules MEFs invalidées pour LKB1. En effet, dans ces cellules, suite à un traitement par des phosphatases, il a été montré une diminution de la phosphorylation de la Thr172. Cela indique donc que la phosphorylation de la Thr172 de l'AMPK en condition basale dépend d'une kinase autre que LKB1. De plus, cette étude a mis en évidence le rôle de la CaMKK dans ce mécanisme de phosphorylation. Dans des cellules HeLa dépourvues de LKB1, l'utilisation des ionophores A23187 et ionomycine, induisant une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, entraîne l'activation de l'activité de l'AMPK et la phosphorylation de la Thr172, sans observation de changement du rapport ATP/ADP. Dans ces mêmes cellules, le STO-609, connu pour être un inhibiteur de la CaMKK, empêche l'effet des ionophores sur la phosphorylation de la Thr172, prouvant alors l'implication de la CaMKK dans le mécanisme d'activation de l'AMPK. La CaMKK est

présente sous deux isoformes α et β . Bien que ces deux isoformes soient capables d'activer l'AMPK, la CaMKK β semble être la forme principale dans ce mécanisme (Hawley et al. 2005). Parallèlement à cette étude, un autre groupe a également prouvé que la CaMKK β constituait, avec LKB1, une seconde kinase capable de phosphoryler l'AMPK. En effet, les auteurs ont montré que la CaMKK β augmentait l'activité de l'AMPK en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire tandis que son inhibition pharmacologique ou par l'utilisation de siRNA réduisait son activité (Woods et al. 2005). L'importance de la CaMKK β dans la régulation de l'AMPK a notamment été montrée dans le cadre de processus non métaboliques. En effet, des études ont montré que l'activation de l'AMPK par la CaMKK β permettait d'atténuer la contraction du muscle lisse en inhibant la « myosin light-chain kinase » (MLCK) (Horman et al. 2008). Dans des cellules épithéliales rénales MDCK, l'activation de l'AMPK en réponse à un choc hyperosmotique a été mise en évidence, et il a notamment été montré que cette activation était dépendante d'une augmentation du calcium intracellulaire, et de fait de la CaMKK β (Miranda et al. 2010).

TAK1

Une troisième kinase capable de réguler l'AMPK a également été décrite dans la littérature, il s'agit de TAK1. TAK1 est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des « mitogen-activated protein kinase kinase kinase » (MAP3K). Quelques études ont mis en évidence le lien entre l'AMPK et TAK1. Tout d'abord, l'inhibition de TAK1 au niveau cardiaque chez des souris affecte l'activité de l'AMPK. Afin de valider la régulation de l'AMPK par TAK1, des expériences *in vitro* ont été réalisées sur des myocytes pour évaluer l'effet d'un dominant négatif de TAK1. Le dominant négatif entraîne une diminution de l'activité de l'AMPK, et empêche notamment l'activation de LKB1 par ses protéines partenaires STRAD et MO25 (Xie et al. 2006). Au niveau hépatique, une autre étude a suggéré le lien entre TAK1 et la tumorigénèse en montrant que l'absence de TAK1 diminuerait l'activité de l'AMPK et favoriserait l'activation du mTOR complex 1 (mTORC1) (Inokuchi-Shimizu et al. 2014). De plus, il a été montré que TAK1 était requise pour l'induction de l'autophagie dans des cellules cancéreuses par l'AMPK (Herrero-Martin et al. 2009). *In vitro*, il a été confirmé que TAK1 était bien capable de phosphoryler l'AMPK (Scholz et al. 2010). D'autres études sont malgré tout

nécessaires pour préciser les fonctions de TAK1. Il semblerait toutefois qu'il s'agisse bien d'une kinase activatrice de l'AMPK mais dans des conditions bien particulières (Neumann 2018).

2.3.1.c) Activation par la privation de glucose

Indépendamment des variations en nucléotides impliquées dans la voie énergétique activatrice de l'AMPK, une autre voie d'activation de l'AMPK via la quantité de glucose dans la cellule a été décrite récemment. Le groupe de Sheng-Cai Lin a tout d'abord mis en évidence l'importance de la formation du complexe AXIN-AMPK-LKB1 pour l'activation de l'AMPK. Les auteurs ont notamment montré dans des hépatocytes que la privation de glucose favorisait la liaison entre l'AXIN et l'AMPK, et que cela stimulait la phosphorylation de l'AMPK par LKB1, et ce de manière plus importante lorsque l'AMPK était myristoylée sur sa sous-unité β (Zhang et al. 2013). Dans une seconde étude, ces mêmes auteurs ont prouvé que le complexe AXIN-AMPK-LKB1 était en fait associé à d'autres protéines pour former un « super complexe » à la surface du lysosome. Le complexe Ragulator/Rag, localisé à la membrane du lysosome, joue un rôle important dans la prolifération et la croissance cellulaire dans la mesure où il régule le mTORC1 en réponse aux acides aminés. Ce complexe est également associé à la pompe à proton v-ATPase, qui permet de fournir de l'énergie au lysosome. En cas de forte quantité de glucose dans la cellule, mTORC1 est recruté à la membrane du lysosome, ce qui permet ensuite son activation. De manière intéressante, ce groupe a trouvé que le complexe v-ATPase-Ragulator/Rag était également important pour l'activation de l'AMPK. Grâce à la manipulation génétique des différents composants de ce super complexe dans des cellules MEFs, les auteurs ont pu démontrer qu'en cas de privation de glucose, le complexe AXIN-LKB1 est amené à la membrane du lysosome pour s'associer avec le complexe v-ATPase-Ragulator/Rag. La myristoylation de l'AMPK permet son ancrage à la surface du lysosome ; ainsi, une fois le super complexe formé, LKB1 peut ensuite phosphoryler la Thr172 (Zhang et al. 2014). Plus récemment, une collaboration entre les groupes de Sheng-Cai Lin et de Grahame Hardie a permis de décrire plus finement ce mécanisme d'activation de l'AMPK en réponse à une privation de glucose. Un autre régulateur physiologique de l'AMPK, sensible aux quantités de glucose dans la cellule, a été mis en évidence, il s'agit de l'aldolase. L'aldolase est une

enzyme impliquée dans la glycolyse, elle catalyse le clivage du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Lorsque la cellule présente une faible quantité de glucose, le FBP est également peu présent ; dans ce cas l'aldolase est sous forme libre, et cela induit la formation du complexe AXIN-AMPK-LKB1. En effet, l'ajout de FBP à des cellules MEFs en situation de privation de glucose induit une dissociation des complexes AXIN-LKB1 et v-ATPase-Ragulator/Rag, et abolit ainsi l'activité de l'AMPK. Plus récemment, il a été montré que l'aldolase inoccupée était capable de se lier et d'inhiber le canal calcique « transient receptor potential » V du réticulum endoplasmique (TRPV) ; ce mécanisme permet ensuite au v-ATPase de se lier au TRPV, entraînant le recrutement du complexe AXIN-LKB1 au lysosome et l'activation de l'AMPK (Li et al. 2019). De manière générale, les auteurs supposent que ce mécanisme d'activation de l'AMPK au lysosome surviendrait de manière précoce à la suite d'une privation en glucose, avant que les niveaux de nucléotides de la cellule soient impactés, comme en cas de privation prolongée (Zhang et al. 2017). La régulation de l'activité de l'AMPK par l'aldolase et le FBP est résumée dans la figure 11.

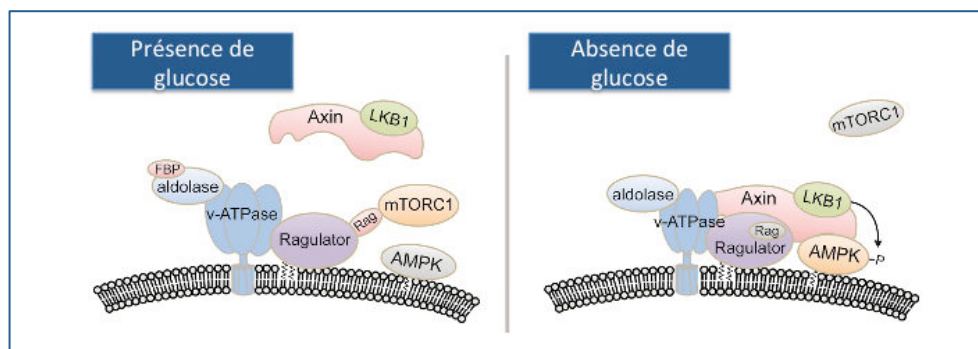


Figure 11 : Activation de l'AMPK à la surface du lysosome en réponse aux variations de glucose via le super complexe v-ATPase-Ragulator/Rag-AXIN-LKB1.

En présence de glucose, l'aldolase est occupée par le FBP, et le complexe v-ATPase-Ragulator/Rag permet le recrutement de mTORC1 à la membrane du lysosome. En absence de glucose, l'aldolase est inoccupée ce qui entraîne des changements dans son interaction avec le complexe v-ATPase-Ragulator/Rag ; mTORC1 se dissocie de ce complexe, et la formation du super complexe v-ATPase-Ragulator/Rag-AXIN-LKB1 est alors possible. Dans cette condition, LKB1 est donc capable de phosphoryler l'AMPK. (D'après (Lin and Hardie 2018)).

2.3.1.d) L'inhibition de l'AMPK

L'inactivation de l'AMPK survient lors de la déphosphorylation de la Thr172 par des phosphatases. Deux types de phosphatases ont été identifiés grâce à des expériences menées sur de l'AMPK purifiée à partir de foie de rat, ce sont les protéines PP2C et PP2A (Davies et al. 1995). Comme nous l'avons décrit précédemment dans ce paragraphe, l'AMP et l'ADP agissent comme des antagonistes de ces phosphatases en jouant sur la conformation de l'AMPK, ce qui protège l'AMPK de la déphosphorylation. Des études plus récentes ont mis en évidence d'autres phosphatases capables de déphosphoryler la Thr172 de l'AMPK. En effet, une étude a montré que l'inactivation de la protéine phosphatase magnésium-dépendante Ppm1E par siRNA induisait une augmentation de la phosphorylation de la Thr172 dans les cellules embryonnaires humaines de rein 293 (HEK293) (Voss et al. 2011). Ensuite, dans les cellules murines pancréatiques MIN6, l'augmentation de glucose induit la déphosphorylation de la Thr172 de l'AMPK, cependant l'inactivation des isoformes des protéines phosphatases PP1 α et PP1 β par siRNA entraîne une diminution de ce processus de déphosphorylation (Garcia-Haro et al. 2010). Toutefois, de manière générale, d'autres études sont nécessaires pour identifier les phosphatases capables d'agir sur la Thr172, et notamment leur action physiologique *in vivo*.

De plus, il existe des kinases capables d'inhiber l'AMPK via la phosphorylation de la boucle ST. Cette boucle est localisée au niveau de la sous-unité α , et il s'agit d'un site particulièrement riche en résidus sérines et thréonines. Il a notamment été montré que la phosphorylation de cette boucle entraînait son interaction avec le domaine kinase de l'AMPK, ce qui empêche ensuite la phosphorylation de la Thr172 (Hawley et al. 2014). De manière intéressante, il a été mis en évidence que dans le contexte de l'ischémie cardiaque l'insuline agit comme un antagoniste de l'AMPK. L'inhibition de l'AMPK dans cette situation particulière aurait plutôt un effet cardioprotecteur car cela favorise la diminution de l'oxydation des acides gras. Une étude a notamment étudié l'implication de la « protéine kinase B » (PKB) ou Akt dans ce mécanisme, laquelle intervient dans la voie de signalisation de l'insuline. En effet, les auteurs ont montré que lors d'un épisode d'ischémie, la perfusion de cœurs de rats avec de l'insuline induisait la phosphorylation des résidus Ser485/491 situés sur les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK par PKB, et que cela avait pour conséquence la diminution de la phosphorylation de la Thr172 et donc de

l'activation de l'AMPK (Horman et al. 2006). Par ailleurs, il a été montré que GSK3 était également capable de réguler négativement l'AMPK. En effet, GSK3 peut se fixer à la sous-unité β de l'AMPK et induire la phosphorylation de la Thr479 de la sous-unité α au niveau de la boucle ST, ce qui rend la boucle activatrice de l'AMPK accessible aux différentes phosphatases (Suzuki et al. 2013).

L'ensemble des mécanismes intervenant dans la régulation de l'activité de l'AMPK est résumé dans le schéma bilan ci-dessous (Fig. 12).

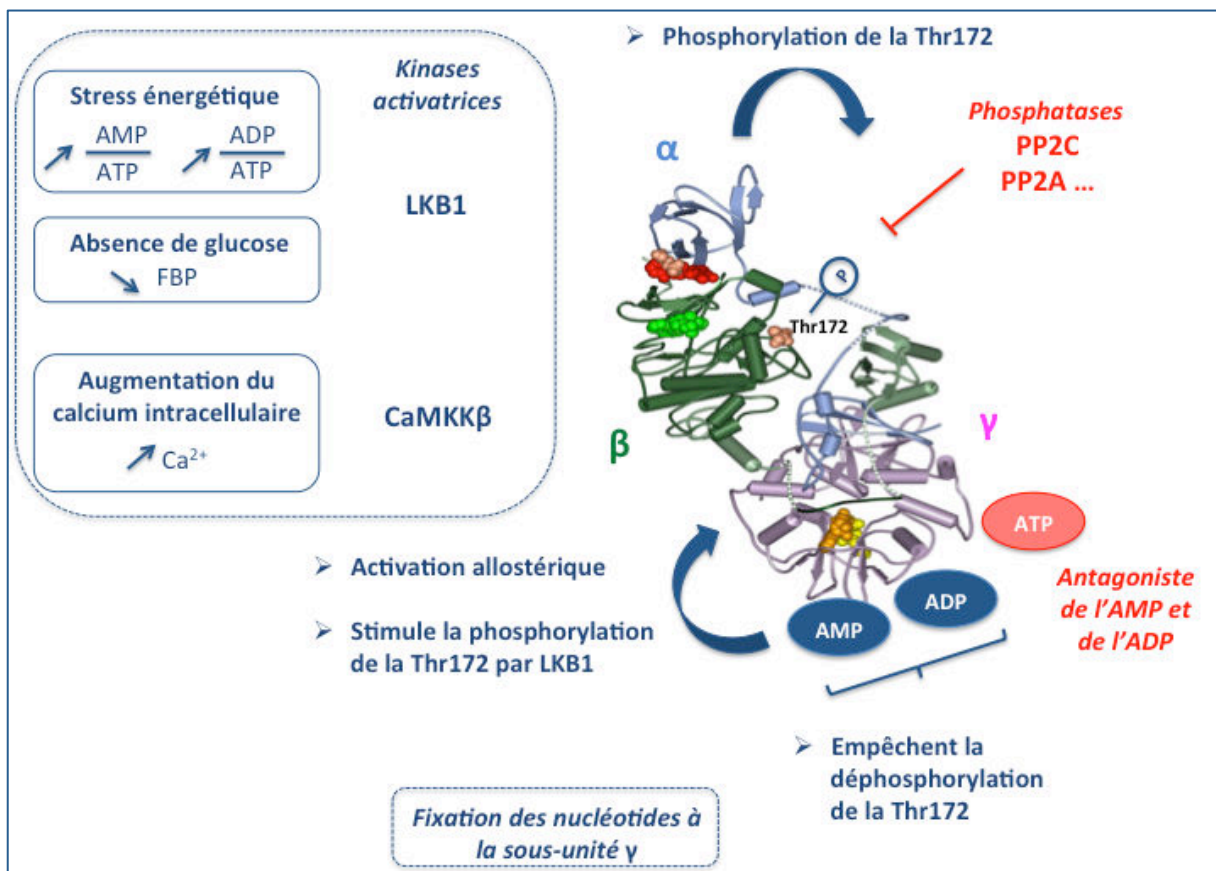


Figure 12 : La régulation physiologique de l'AMPK dans la cellule.

L'AMP en se fixant sur la sous-unité γ permet l'activation allostérique de l'AMPK, stimule sa phosphorylation par LKB1, et la protège de la déphosphorylation. L'ADP se fixe également sur la sous-unité γ mais empêche uniquement la déphosphorylation de la Thr172. L'ATP agit comme un antagoniste de l'AMP et de l'ADP. Les deux kinases activatrices de l'AMPK sont LKB1 et la CaMKK β , elles agissent respectivement en réponse à un stress énergétique ou en absence de glucose, et en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire. Des phosphatases, comme par exemple PP2C et PP2A, induisent la déphosphorylation de la Thr172.

2.3.1.e) Une régulation différente de l'AMPK selon sa localisation subcellulaire

Comme nous l'avons décrit dans la sous-partie précédente, il existe plusieurs complexes possibles de l'AMPK, étant donné que chaque sous-unité présente plusieurs isoformes. Nous avons notamment précisé de manière globale les différences de complexes observées entre les tissus mais également entre les espèces. Cependant, même à l'échelle de la cellule, différents complexes existent selon la localisation subcellulaire. Au sein de la cellule, on parle ainsi de « pools » d'AMPK situés dans différents compartiments. Il a par exemple été montré que l'isoforme $\alpha 2$ est préférentiellement retrouvée dans le noyau par rapport à l'isoforme $\alpha 1$, suggérant ainsi une implication de l'isoforme $\alpha 2$ dans la régulation des gènes. De plus, cette isoforme est plus sensible à la régulation par l'AMP, à la fois pour son activation allostérique mais également pour son activation par LKB1 (Salt et al. 1998). La diversité des complexes d'AMPK ainsi que la diversité de ses cibles au sein de la cellule suggèrent l'existence d'une fine régulation de l'AMPK selon sa localisation subcellulaire et la nature des stimuli reçus par la cellule.

La localisation et l'activité des pools d'AMPK dans différents compartiments de la cellule ont été démontrées grâce à l'utilisation d'outils moléculaires basés sur le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), dont le signal peut être mesuré en microscopie. Deux types principaux de sondes agissant comme des biosenseurs de l'AMPK ont été développés. La sonde de première génération AMPKAR permet de visualiser l'activité de l'AMPK dans le cytoplasme ou dans le noyau. Par la suite, l'utilisation d'une sonde plus performante, la sonde ABKAR, a permis une visualisation plus fine de l'activité de l'AMPK dans la membrane plasmique et dans les organites de la cellule, à savoir l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le lysosome, et le noyau. Il a notamment été observé que l'AMPK pouvait agir sur ses substrats au niveau de la membrane des organites (Miyamoto et al. 2015).

Etant donné qu'il existe plusieurs régulateurs physiologiques de l'AMPK (l'AMP, le calcium intracellulaire, et le FBP) et que plusieurs pools d'AMPK sont présents dans la cellule, il est pertinent de s'interroger sur les niveaux de régulation dans les différents compartiments cellulaires. Le groupe de Sheng-Cai Lin a mis en évidence que les pools d'AMPK pouvaient être activés de manière différentielle en fonction du statut métabolique de la cellule, ce qui permet de stimuler ou d'inhiber des voies de

signalisation distinctes. De manière générale, en réponse à un stress énergétique, l'AMPK est activée dans le cytosol ou à la membrane de certains organites, tandis que l'augmentation de calcium intracellulaire favorise l'activité de l'AMPK dans le noyau. En cas de faible stress énergétique induisant seulement une diminution de FBP, l'AMPK tend à être activée au lysosome via le complexe AXIN-LKB1. Lors d'un stress plus important entraînant cette fois-ci une légère augmentation de l'AMP entre 30 et 60 μM , l'AMPK est activée dans le cytosol, toujours via le complexe AXIN-LKB1. Enfin, en réponse à une quantité importante de l'AMP supérieure à 100 μM dans la cellule, l'AMPK est préférentiellement active au niveau de la membrane mitochondriale, indépendamment de l'AXIN. Les auteurs ont également proposé un modèle hiérarchique pour la phosphorylation des substrats de l'AMPK. En réponse à un faible stress énergétique, l'AMPK pourrait phosphoryler et inhiber l'isoforme ACC1, principalement impliqué dans les voies anaboliques, tandis qu'un fort stress énergétique entraînerait la phosphorylation de l'ACC2, et ainsi l'activation des voies cataboliques. Au niveau nucléaire, l'activation de l'AMPK serait davantage impliquée dans la régulation des gènes (Fig. 13) (Zong et al. 2019).

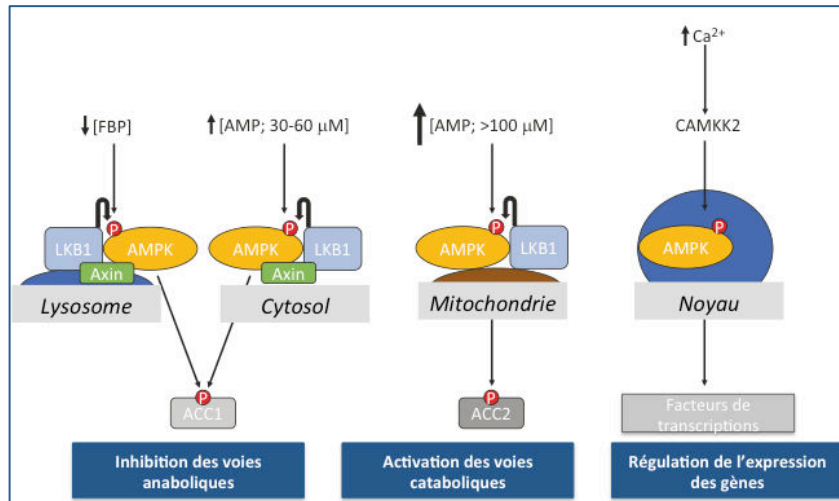


Figure 13 : Hypothèses sur l'activation des différents pools d'AMPK de la cellule.

Selon son état de stress, la cellule pourrait réguler différentes voies de signalisation. En absence de glucose, l'AMPK serait activée au lysosome, et lors d'une faible augmentation de l'AMP, l'AMPK serait plutôt activée dans le cytosol; ces deux activations induiraient l'inhibition des voies anaboliques. Lors d'une importante augmentation de l'AMP, l'AMPK pourrait être activée au niveau mitochondrial et induire l'activation des voies cataboliques. Enfin, l'augmentation du calcium intracellulaire permettrait l'activation de l'AMPK dans le noyau, suggérant un rôle potentiel dans la régulation des gènes. (D'après (Carling 2019)).

2.3.2) Les différentes fonctions de l'AMPK

Historiquement, l'AMPK a été caractérisée comme un senseur de l'état énergétique des cellules, et ainsi les nombreux substrats de phosphorylation identifiés interviennent dans la régulation de processus métaboliques. La découverte de nouvelles cibles de l'AMPK a permis de mettre en évidence d'autres fonctions pour cette kinase dans des processus non métaboliques. Dans ce paragraphe, nous décrirons les différentes méthodes qui ont permis d'identifier de nouveaux substrats de l'AMPK, et nous détaillerons certaines fonctions de l'AMPK dans les voies métaboliques et non métaboliques.

2.3.2.a) Identification des cibles de l'AMPK

A partir de l'étude du site de phosphorylation de l'ACC, l'une des premières cibles de l'AMPK à avoir été décrite (Hardie et al. 1986), les résidus spécifiques situés en amont et en aval de la sérine phosphorylée, appelée site phospho-accepteur P, ont été caractérisés. L'analyse de la phosphorylation par l'AMPK d'un ensemble de peptides synthétiques, basés sur la séquence de phosphorylation de l'ACC, a ensuite permis de définir le motif général de reconnaissance suivant : $\phi X(B,X)XX(\text{Ser/Thr})XXX\phi$, où ϕ représente un résidu hydrophobe (méthionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, ou valine), B un résidu basique (généralement l'arginine), et X un résidu quelconque (Dale et al. 1995). Une autre étude a permis d'affiner l'interaction entre le domaine kinase de l'AMPK et son substrat, à partir d'un peptide composé du site de phosphorylation de l'ACC et comportant 34 résidus autour de la Ser79. Les auteurs ont notamment mis en évidence la présence d'une spirale amphipathique, entre les positions P-16 et P-5, qui permettrait de faciliter l'interaction de la kinase avec son substrat, bien qu'elle ne soit pas observable au niveau d'autres substrats connus de l'AMPK (Scott et al. 2002). D'autres études ont également déterminé le motif de reconnaissance de l'AMPK au moyen d'approches différentes, sans tenir compte des sites de phosphorylation déjà connus de certains substrats, ce qui constituait des biais. En effet, une librairie de peptides a été testée en présence d'ATP radiomarqué. L'analyse de la quantité de peptides phosphorylés par du phosphate radiomarqué a mis en évidence la sélectivité de l'AMPK pour certains peptides, permettant ainsi de définir un motif de reconnaissance optimal (Gwinn et al. 2008). Une autre étude a employé une approche basée sur l'utilisation d'une AMPK modifiée au niveau de son site catalytique et capable d'accepter l'ATP γ -thiophosphate. A partir des protéines thiophosphorylées, les peptides thiophosphorylés ont été isolés, et les sites de phosphorylation de l'AMPK ont été identifiés par spectrométrie de masse (Schaffer et al. 2015). Cette technique a notamment été utilisée dans différents contextes cellulaires et a permis l'identification de substrats spécifiques de l'AMPK dans des cellules cancéreuses (Schaffer et al. 2015) et des hépatocytes (Ducommun et al. 2019). La connaissance de ce motif a ainsi permis la découverte de nombreuses cibles de l'AMPK, et par la même occasion de nouvelles fonctions de l'AMPK. Plusieurs études, dont nous pouvons citer quelques exemples, ont notamment découvert des nouvelles cibles par des approches de phosphoprotéomique

grâce à l'utilisation du motif consensus. Une première étude de phosphoprotéomique globale réalisée au cours de l'exercice a permis de valider huit cibles de l'AMPK et de révéler une nouvelle cible impliquée dans la respiration mitochondriale (Hoffman et al. 2015). Une autre approche de phosphoprotéomique globale récente a également mis en évidence une nouvelle cible de l'AMPK ayant un rôle dans la fission mitochondriale (Chen et al. 2019). Enfin, une étude a identifié cinquante-sept cibles potentielles de l'AMPK grâce à une analyse phosphoprotéomique à partir d'hépatocytes de souris traités avec le 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) et le composé A769662, deux activateurs de l'AMPK ; les cibles spécifiques de l'AMPK ont été identifiées grâce à la comparaison avec des hépatocytes invalidés pour l'AMPK. Les protéines phosphorylées ont été immunoprécipitées avec un anticorps particulier capable de reconnaître le motif suivant LxRxxpS/pT, L et R correspondant respectivement à la leucine et l'arginine et x étant n'importe quel acide aminé afin de détecter les cibles directes de l'AMPK ; les cibles potentielles ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse et analyse bioinformatique (Ducommun et al. 2015). Pour mettre en évidence des cibles directes de l'AMPK, il est dorénavant possible d'utiliser directement des approches bioinformatiques basées sur la connaissance du motif consensus de phosphorylation de l'AMPK (Marin et al. 2015) ou d'étudier des bases de données de protéines grâce à des sites internet spécialisés dans la prédiction de motifs, tels que Scansite (Obenauer et al. 2003). Actuellement, une soixantaine de cibles de l'AMPK ont été validées (Hardie et al. 2016). La figure ci-dessous présente une construction du motif de phosphorylation de l'AMPK à partir de soixante-quatre sites de phosphorylation connus de l'AMPK (Fig. 14).

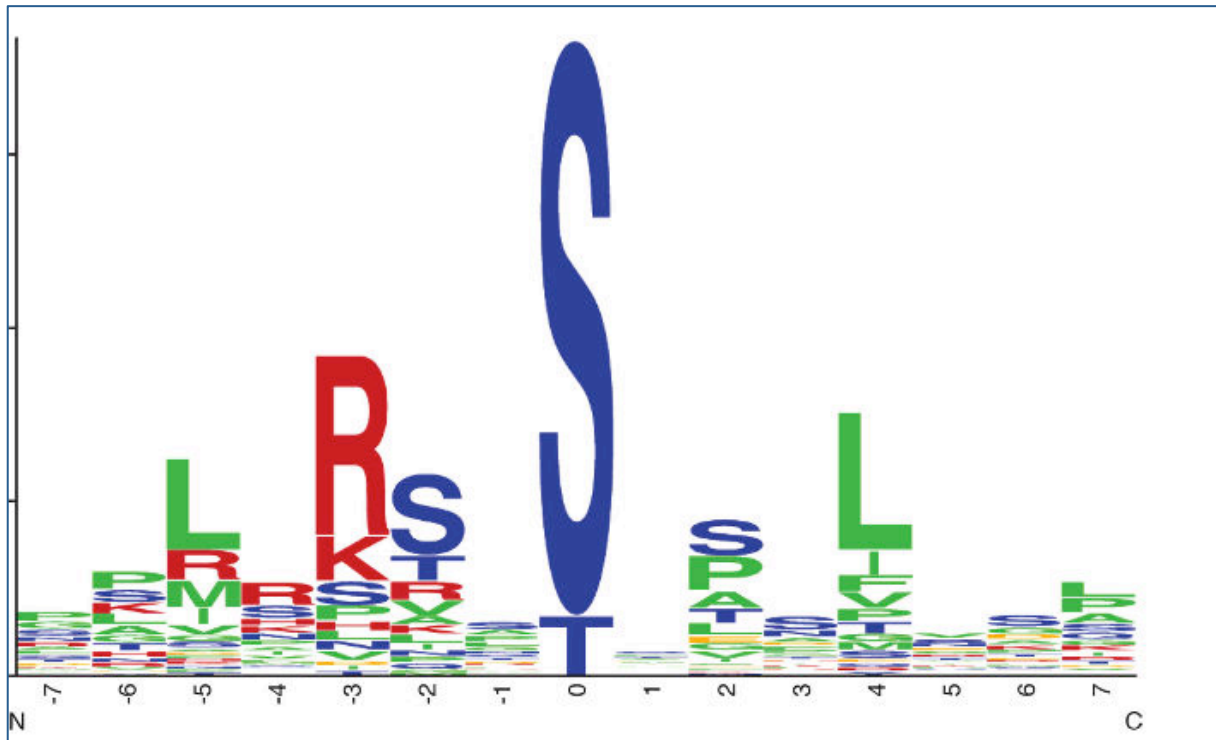


Figure 14 : Motif de phosphorylation de l'AMPK de P-7 à P+7.

Ce motif a été construit à partir de 64 cibles connues de l'AMPK avec l'application WebLogo. La taille des acides aminés est proportionnelle à leur fréquence d'apparition au niveau des sites de phosphorylation. Les acides aminés hydrophobes sont représentés en vert, les acides en orange, les basiques en rouge, et les polaires neutres en bleu. (D'après (Hardie et al. 2016)).

2.3.2.b) Fonctions métaboliques de l'AMPK

De nombreuses cibles de l'AMPK sont impliquées dans le métabolisme énergétique. En effet, un des rôles clés de l'AMPK consiste à orienter le métabolisme de l'anabolisme vers le catabolisme dans le but de restaurer les quantités d'ATP au niveau de la cellule en cas de stress énergétique. De nombreuses fonctions de l'AMPK ont ainsi été étudiées dans les organes tels que le foie, le tissu adipeux, et le muscle squelettique, lesquels sont particulièrement impliqués dans la consommation et la production d'énergie. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons aux effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique à l'échelle de la cellule, mais également à l'échelle de l'organisme entier pour le contrôle de la prise alimentaire.

Inhibition des voies anaboliques

Pour limiter les dépenses énergétiques de la cellule, l'AMPK est capable de stopper les processus anaboliques consommateurs d'ATP. Tout d'abord, l'AMPK intervient au niveau des systèmes de stockage de la cellule, et permet notamment la diminution de la synthèse des lipides et du glycogène. Son action sur la synthèse des lipides peut se faire par une action directe sur des enzymes clés du métabolisme lipidique. Comme nous l'avons évoqué au début de cette partie, l'AMPK a été découverte comme étant l'enzyme responsable de l'inactivation de l'ACC et de l'HMG-CoA reductase (Carling et al. 1987), elle participe ainsi à l'inhibition de la synthèse des acides gras et du cholestérol. En effet, l'ACC intervient dans la première étape de synthèse des acides gras en convertissant l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Plus précisément, l'ACC présente deux isoformes : l'ACC1 principalement localisé dans les tissus lipogéniques tels que le foie et le tissu adipeux, et l'ACC2 se trouvant plutôt au niveau du cœur et du muscle squelettique. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que l'ACC2 est notamment associé à la membrane mitochondriale, et la production de malonyl-CoA à ce niveau inhibe la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1), enzyme générant la palmitoylcarnitine qui est essentielle pour la β -oxydation mitochondriale des acides gras et la production d'énergie. Ainsi, le malonyl-CoA produit par l'ACC2 inhibe l'oxydation des acides gras, tandis que le malonyl-CoA produit par l'ACC1 favorise la synthèse des acides gras dans le cytoplasme ; l'AMPK est capable de phosphoryler les deux isoformes ACC1 et ACC2 (Fig. 15) (Abu-Elheiga et al. 2000).

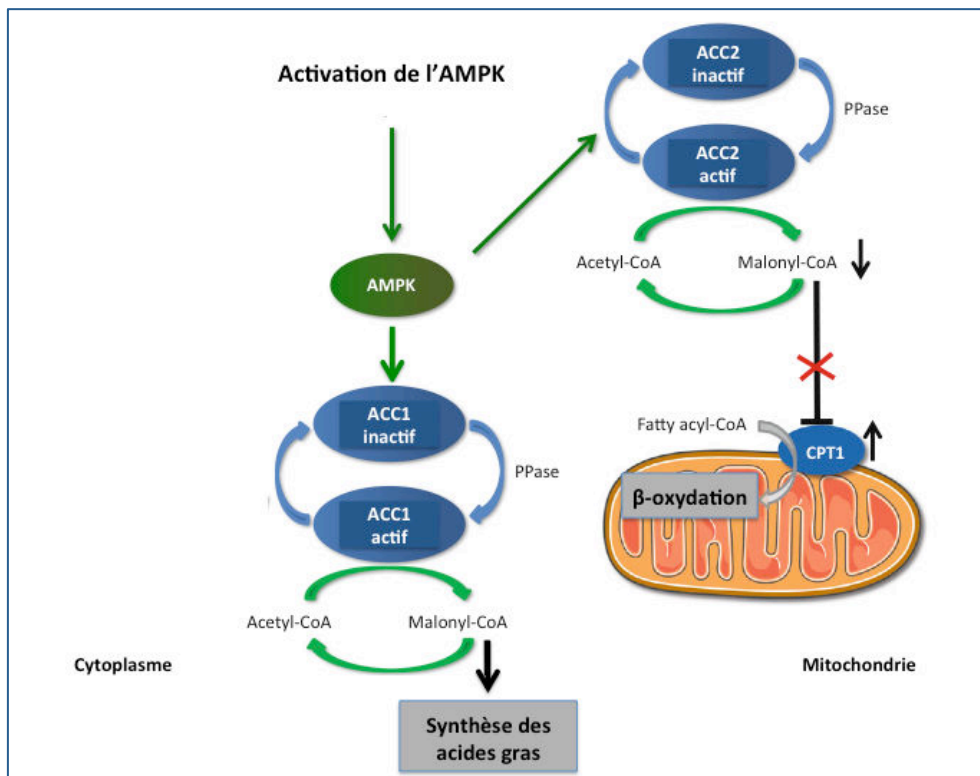


Figure 15 : L'AMPK inhibe les deux isoformes de l'ACC.

L'AMPK inactive l'ACC1 et l'ACC2, impliqués respectivement dans la synthèse des acides gras et l'inhibition de la β -oxydation des acides gras. PPase : Phosphatase. (D'après (Angin et al. 2016)).

Par ailleurs, l'HMG-CoA réductase est impliquée dans la voie du mévalonate, lequel est à l'origine de la production de cholestérol et des terpénoïdes. Des modèles de souris génétiquement modifiées permettant l'expression de l'ACC et l'HMG-CoA réductase modifiés au niveau de leur site de phosphorylation par l'AMPK par la technique de « knock-in » ont permis de valider ces protéines comme des cibles de l'AMPK *in vivo* et de définir leur rôle physiologique (Fullerton et al. 2013, Loh et al. 2019). L'AMPK est également capable de phosphoryler et d'inactiver l'isoforme mitochondriale de la *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), enzyme qui participe à la synthèse des phospholipides et des triglycérides. A plus long terme, l'AMPK régule l'expression des gènes lipogéniques en inhibant certains facteurs de transcription. En effet, il a été montré dans des hépatocytes que la phosphorylation du facteur de transcription « sterol-response element-binding protein-1c » (SREBP-1c) par l'AMPK empêche son clivage protéolytique, puis sa translocation vers le noyau, et de fait l'expression de ses gènes cibles impliqués dans la lipogénèse (Li et al. 2011). L'ACC et l'HMG-CoA réductase

font notamment partie de ces gènes cibles. Par ailleurs, il a également été montré *in vitro* qu'un autre facteur de transcription assurant l'expression de gènes lipogéniques en réponse au glucose, le « carbohydrate-responsive element-binding protein » (ChREBP), pouvait être phosphorylé par l'AMPK, inhibant ainsi sa liaison à l'ADN (Kawaguchi et al. 2002). Cependant, la régulation de SREBP-1c et de ChREBP par l'AMPK n'a pas été mise en évidence *in vivo*. Au niveau du métabolisme glucidique, lorsque le glucose pénètre dans la cellule, il est converti en glucose-6-phosphate (G6P) qui peut ensuite être métabolisé dans le processus de glycolyse et participer à la production d'ATP, ou bien être stocké sous forme de glycogène. En agissant sur plusieurs enzymes, l'AMPK favorise l'intégration du G6P dans la voie de la glycolyse. En effet, l'activation pharmacologique de l'AMPK dans le foie et le muscle squelettique entraîne la phosphorylation de la glycogène synthase (GS), induisant ainsi son inactivation (Jorgensen et al. 2004, Bultot et al. 2012). De plus, il a également été montré que l'AMPK pouvait inhiber l'activité de la glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1). Cette enzyme est impliquée dans la voie de la biosynthèse des hexosamines à partir du fructose-6-phosphate (F6P) permettant la production de l'UDP-GlcNAC qui intervient dans les réactions d'O-GlcNac glycosylation des protéines (Zibrova et al. 2017). Cette inhibition contribue donc à diriger de manière indirecte le G6P vers la glycolyse. Au niveau cardiaque, il a notamment été montré que l'inhibition de l'O-GlcNacylation de certaines protéines par l'AMPK via son action sur GFAT protégeait de l'hypertrophie cardiaque (Gelinas et al. 2018). Parallèlement à son action sur le métabolisme des lipides et des glucides, l'AMPK agit également sur la croissance et la prolifération cellulaire. En cas de stress énergétique, l'AMPK restreint la synthèse de protéines et d'acides nucléiques, qui est une réaction très coûteuse en énergie. Le complexe mTORC1 est un acteur majeur de la synthèse protéique, qui est sensible aux disponibilités en nutriments et en acides aminés de la cellule, et dont l'activité est négativement régulée par l'AMPK. Dans le cadre de cette voie de signalisation, mTORC1 intervient notamment dans la régulation de la traduction des ARNm via la phosphorylation des deux protéines « ribosomal S6 kinase » (S6K) et « eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1 (4EBP1). Or, il a été montré que l'activation de la protéine « tuberous sclerosis complex 2 » (TSC2) par l'AMPK permettait de faciliter son action inhibitrice sur la phosphorylation de S6K et 4EBP1 (Inoki et al. 2003). Par la suite, un autre substrat de l'AMPK intervenant dans la régulation de l'activité de mTORC1 a été mis en évidence à la suite de l'observation du

maintien de l'activité de l'AMPK en cas de stress énergétique dans des cellules invalidées pour TSC2. Par des approches de protéomique, une étude a démontré qu'un des partenaires de liaison de mTORC1, raptor, était directement phosphorylé par l'AMPK, entraînant alors sa liaison avec la protéine 14-3-3, ce qui inhibe mTORC1 (Gwinn et al. 2008). En plus d'inhiber la voie mTOR, l'AMPK entraîne l'activation de l'« eukaryotic elongation factor 2 kinase » (eEF2K). Une fois activée, l'eEF2K phosphoryle sa cible eEF2, ce qui l'empêche de se lier au ribosome, cela stoppe de manière réversible l'étape d'élongation de la synthèse protéique (Johanns et al. 2017). En cas de stress énergétique altérant la croissance cellulaire, la synthèse des ARN ribosomiques, constituants majeurs des ribosomes, est également diminuée. L'AMPK joue à nouveau un rôle à ce niveau puisqu'elle entraîne la phosphorylation du facteur de transcription TIF-IA, ce qui l'empêche d'assurer son rôle dans la formation du complexe d'initiation de la transcription de l'ADN ribosomique (Hoppe et al. 2009).

Activation des voies cataboliques

Parallèlement à l'inhibition des voies anaboliques, l'AMPK stimule les voies cataboliques qui assurent la production d'ATP. Pour régénérer rapidement les niveaux d'énergie dans la cellule, l'AMPK favorise l'utilisation du glucose et des acides gras comme carburants en facilitant leur absorption. Au niveau du muscle squelettique, de manière similaire à l'insuline et à la contraction musculaire, l'activation de l'AMPK augmente l'absorption du glucose en assurant la translocation du transporteur de glucose 4 (GLUT4) à la membrane plasmique (Kurth-Kraczek et al. 1999, Kjobsted et al. 2018). Il a notamment été montré que l'AMPK phosphorylait et inhibait les protéines « TBC1 domain family member 1 » (TBC1D1) et AS160, substrat de l'Akt de 160 kDa, qui sont à l'origine de la séquestration de GLUT4 au niveau de l'appareil de Golgi. L'inhibition de TBC1D1 et de l'AS160 entraîne leur liaison à la protéine 14-3-3, ce qui permet leur dissociation de GLUT4, et ainsi la translocation de ce dernier à la membrane plasmique (Taylor et al. 2008) (Fig. 16).

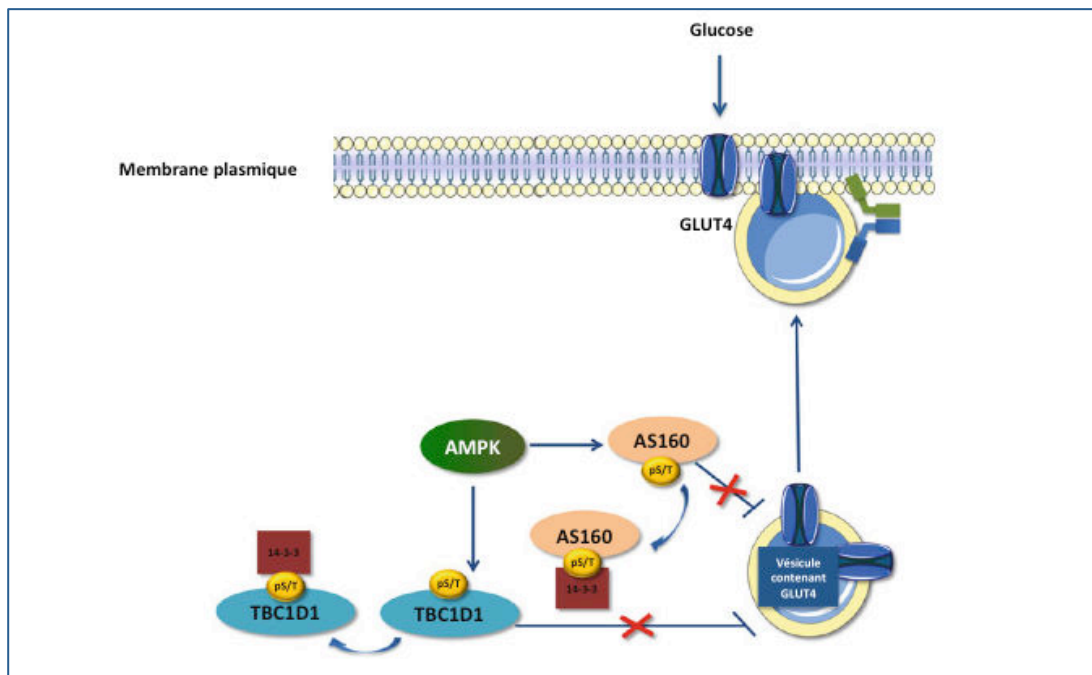


Figure 16 : L'AMPK facilite l'absorption du glucose dans le muscle.

La phosphorylation de l'AS160 et de TBC1D1 par l'AMPK entraîne la translocation de GLUT4 à la membrane, favorisant ainsi l'absorption de glucose. (D'après (Angin et al. 2016)).

Dans d'autres types cellulaires, autres que dans le muscle, le foie et le tissu adipeux, il a été montré que l'AMPK permettait la translocation de GLUT1 à la membrane plasmique via la phosphorylation, suivie de la dégradation, de la protéine « thioredoxin-interacting protein » (TXNIP), qui se lie à GLUT1 et induit son internalisation en réponse à l'augmentation de glucose intracellulaire (Wu et al. 2013). En ce qui concerne l'absorption des acides gras, le rôle de l'AMPK a été mis en évidence dans les cardiomyocytes. Par un processus similaire à son action sur la translocation de GLUT4, l'activation de l'AMPK facilite la translocation du transporteur des acides gras CD36 à la membrane plasmique via la phosphorylation de l'AS160, qui maintient CD36 dans le cytoplasme (Luiken et al. 2003, Samovski et al. 2012). En plus de faciliter leur absorption au sein de la cellule, l'AMPK favorise également l'utilisation du glucose et des acides gras pour produire de l'énergie. Dans certains types de cellules, comme les cellules cardiaques et les monocytes, l'AMPK est capable de stimuler la glycolyse en phosphorylant la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK2), ce qui permet ensuite la conversion du fructose-6-phosphate en fructose-2,6-bisphosphate (Marsin et al. 2000, Marsin et al.

2002). L'oxydation des acides gras est également augmentée par l'activation de l'AMPK (Boudaba et al. 2018). En effet, comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, l'inhibition de l'ACC par l'AMPK empêche la synthèse de malonyl-CoA, qui est un inhibiteur de l'absorption des acides gras au niveau mitochondrial et de fait limite leur oxydation (Abu-Elheiga et al. 2000). De plus, il a été montré que la « A kinase anchor protein 1 » (AKAP1), qui intervient dans la régulation de la fusion mitochondriale, est un substrat de l'AMPK. La mutation de son site de phosphorylation inhibe l'oxydation mitochondriale des acides gras (Hoffman et al. 2015). Ainsi, via le contrôle de la fonction mitochondriale, l'AMPK régule également l'oxydation des acides gras.

Régulation de la fonction mitochondriale

Une des fonctions principales de la mitochondrie est de fournir l'énergie nécessaire à la cellule pour l'accomplissement de ses fonctions. Le maintien de la fonction mitochondriale est donc indispensable pour l'homéostasie de la cellule. L'AMPK intervient dans la régulation de ces organites puisque, d'une part, elle augmente à fois leur biosynthèse, et d'autre part, elle permet leur renouvellement et leur destruction par mitophagie.

En réponse à un stress énergétique causé dans le muscle squelettique, une étude a mis en évidence le rôle critique de l'activation de l'AMPK sur la biosynthèse mitochondriale (Zong et al. 2002). Le co-activateur transcriptionnel « peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha » (PGC1 α) joue un rôle important dans l'initiation de la biosynthèse mitochondriale dans la mesure où il active l'expression des gènes codant pour les protéines mitochondriales. Il a été montré que PGC1 α constitue une cible directe de l'AMPK, et que son activation est requise pour que l'AMPK puisse exercer son rôle bénéfique sur le contenu mitochondrial et sur ses fonctions respiratoires (Zong et al. 2002, Jager et al. 2007, Foretz et al. 2010).

Pour maintenir une réserve de mitochondries saines au sein de la cellule, les mitochondries défectueuses ou dégradées sont éliminées par le processus de mitophagie. Les mitochondries sont particulièrement sensibles aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que l'ion superoxyde O_2^- , sous-produit de la réaction de phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire. En cas de dysfonctions, les parties endommagées de la mitochondrie sont séparées de celle-ci grâce à la fragmentation

mitochondriale, appelée également fission mitochondriale, puis sont dégradées et recyclées au niveau du lysosome. L'AMPK agit, d'une part, sur l'initiation de la fission mitochondriale en phosphorylant le « mitochondrial fission factor » (MFF) (Toyama et al. 2016) et, d'autre part, directement sur la mitophagie en activant « unc-51-like autophagy activating kinase 1 » (ULK1) (Egan et al. 2011, Zhu et al. 2014), lequel est important pour la maturation du phagosome qui est ensuite envoyé au lysosome.

Régulation du métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme

Outre son rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique de la cellule, l'AMPK pourrait également contrôler le métabolisme énergétique à l'échelle de l'organisme via son action sur l'hypothalamus, acteur majeur de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Des expériences *in vivo* menées chez le rat ont suggéré un rôle de l'AMPK dans le contrôle de l'alimentation, son activité dans l'hypothalamus variant selon les quantités d'hormones régulées par le statut nutritionnel. En particulier, la leptine, hormone anorexigène, diminue l'activité de l'AMPK, tandis que la ghréline, hormone oréxigène, augmente son activité. De plus, l'injection de l'activateur pharmacologique de l'AMPK, l'AICAR, au niveau hypothalamique augmente la prise alimentaire (Andersson et al. 2004). Des études se sont donc intéressées plus précisément à la fonction de l'AMPK au niveau des neurones régulant l'appétit, situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus : les neurones oréxigènes à « Neuropeptide Y et agouti-related protein » (NPY/AgRP) et les neurones anorexigènes à pro-opiomélanocortine (POMC). Des souris invalidées pour l'AMPK dans les neurones NPY/AgRP et POMC étaient toujours sensibles à la leptine par rapport à la réduction de l'apport alimentaire, suggérant alors que l'AMPK n'intervenait pas au niveau du noyau arqué (Claret et al. 2007). Une étude plus récente a mis en évidence que l'AMPK jouait plutôt un rôle au niveau des neurones présynaptiques, situés en amont des neurones NPY/AgRP et POMC. Les auteurs ont notamment montré qu'en condition de jeûne, la ghréline entraînait l'activation de l'AMPK par la CaMKK β , en agissant sur les récepteurs « growth hormone secretagogue receptor type 1 » (GHSR1) qui causent une augmentation du calcium intracellulaire. Bien que les cibles directes de l'AMPK ne soient pas encore identifiées dans cette voie de signalisation, son activation permettrait la libération des neurotransmetteurs activateurs des neurones NPY/AgRP. La production

des peptides oréxigènes par ces neurones activés stimulent ainsi la prise alimentaire et inhibent, de manière consécutive, les neurones POMC (Yang et al. 2011).

2.3.2.c) Fonctions non métaboliques de l'AMPK

L'AMPK possède de nombreuses autres fonctions en dehors du métabolisme. Dans cette sous-partie, nous ne fournirons pas de liste exhaustive de toutes les cibles non métaboliques de l'AMPK mais nous décrirons, à titre d'exemples, quelques-unes de ses fonctions dans le développement et la différenciation cellulaires, l'autophagie, la méchanotransduction et l'inflammation. Durant ces dix dernières années, le rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées a également été décrit dans plusieurs modèles cellulaires, nous nous intéresserons plus précisément à cette fonction dans la dernière partie de ce chapitre introductif.

Le développement cellulaire

Tout d'abord, l'AMPK contrôle des processus liés au développement des cellules. Il est d'ailleurs intéressant de constater que dans certains cas, l'AMPK régule de manière indirecte des processus demandeurs en énergie en agissant sur des cibles non métaboliques. Dans des cellules de carcinome hépatique, il a été montré qu'un traitement avec de l'AICAR diminuait fortement la croissance cellulaire et bloquait notamment la division cellulaire en phase S, phase qui correspond à la duplication de l'ADN. Cette diminution était associée à une augmentation de la protéine p53, impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. L'étude a démontré que l'AMPK participait à la régulation de la division cellulaire, et plus particulièrement de la synthèse d'ADN, en phosphorylant p53 qui par son accumulation dans la cellule bloque la croissance (Imamura et al. 2001). Par la suite, une étude a également démontré que l'AMPK était capable de stopper le cycle cellulaire via la phosphorylation de la p53, et que cela permettait notamment la survie cellulaire en cas d'absence de glucose (Jones et al. 2005).

L'autophagie

L'AMPK stimule les processus d'autophagie et participe de manière indirecte au maintien de l'activité et de la viabilité cellulaire en cas de besoin énergétique. En effet, l'autophagie cellulaire consiste en la dégradation des composants cytoplasmiques non indispensables, ces composants sont stockés dans des vésicules, appelées autophagosomes, pour ensuite être dégradés dans le lysosome; les produits issus de cette dégradation peuvent alors être réutilisés par la cellule pour produire de l'énergie. Cette activation de l'autophagie par l'AMPK est possible grâce à la phosphorylation des protéines ULK 1 et 2 (ULK1/2) qui sont par ailleurs inactivées par la voie mTOR (Behrends et al. 2010, Kim et al. 2011).

La différenciation cellulaire et l'épigénétique

Un lien entre AMPK et différenciation cellulaire a également été décrit. En effet, au niveau de l'épithélium intestinal, il a été montré que l'AMPK permettait de stimuler le facteur de transcription « caudal type homeobox 2 » (CDX2), impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales et notamment dans leur lignage. Ce mécanisme pourrait partiellement s'expliquer par la modification d'histones au niveau du promoteur *Cdx2* (Sun et al. 2017). Concernant ce dernier point, il est intéressant de noter que l'AMPK est capable d'agir au niveau épigénétique. Plus généralement, pour réguler la transcription de certains gènes, l'AMPK peut en effet phosphoryler des histones de manière directe ou indirecte, et intervient dans leurs modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, O-GlcNAcylation, ribosylation). Elle régule également la méthylation de l'ADN en agissant sur des ADN méthyltransférases (Gongol et al. 2018).

La mécanotransduction

Lorsque les cellules sont soumises à des stress mécaniques, tels que la compression, la tension ou encore le cisaillement, elles sont capables de mettre en œuvre des processus de remodelage du cytosquelette et de renforcer l'adhésion cellulaire pour conserver leur intégrité. Cette réponse aux stimuli mécaniques de l'environnement se nomme la mécanotransduction. La relation entre le métabolisme énergétique et le maintien de l'intégrité cellulaire semble logique dans la mesure où le

remaniement des filaments d'actine nécessite la consommation d'ATP. En réponse à des forces exercées sur les cellules, la protéine transmembranaire E-cadhérine, généralement associée aux caténines, induit des voies de signalisation qui entraînent l'activation de l'AMPK via LKB1 (Bays et al. 2017). Cependant, il a été suggéré que l'AMPK pouvait agir sur des cibles n'étant pas forcément liées à la production d'énergie. En effet, l'AMPK semble agir sur des cibles qui interviennent dans la régulation de la GTPase RhoA, agissant elle-même sur la « myosin light chain » (MLC) qui contrôle les réarrangements du cytosquelette. L'AMPK participerait ainsi à une cascade de réactions entraînant d'abord la phosphorylation de la vinculine par l'intermédiaire de la protéine Abl, ce qui permettrait ensuite l'activation de RhoA et de sa cible ROCK, et de manière successive, la phosphorylation de MLC. Une fois phosphorylée, la MLC assure une augmentation de la contractilité cellulaire. La facilitation de l'absorption de glucose par l'AMPK permettrait également de fournir de l'ATP pour le remodelage (Fig. 17) (Salvi and DeMali 2018).

Dans d'autres contextes, à l'inverse, il a été montré que l'AMPK permettait de diminuer la phosphorylation de MLC. Au niveau du muscle squelettique lisse, il a été montré que l'AMPK régule l'organisation du cytosquelette via son action MLCK, laquelle régule la MLC. En effet, suite à l'activation de l'AMPK par des vasoconstricteurs dans des cellules primaires de muscle squelettique lisse de rat, il a été démontré que l'AMPK pouvait phosphoryler MLCK et induire son inhibition, ce qui avait pour conséquence de diminuer la phosphorylation de MLC et de fait la contraction musculaire (Horman et al. 2008). Au niveau intestinal, de manière intéressante, il a été montré qu'en phase post-prandiale, la leptine pouvait agir sur la voie RhoA/ROCK et induire une augmentation de la perméabilité intestinale (Le Drean et al. 2014). Le lien entre la leptine et l'AMPK a été mis en évidence dans le muscle squelettique ; en effet, il a été montré que la leptine stimulait l'oxydation des acides gras dans le muscle via l'activation de l'AMPK (Minokoshi et al. 2002). Cependant le mécanisme par lequel la leptine activerait l'AMPK dans ces conditions n'a pas été élucidé. Connaissant ces deux mécanismes de la leptine, et dans la mesure où l'AMPK semble également impliquée dans la voie RhoA/ROCK, il a été suggéré que la leptine pourrait activer l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales, qui par la suite agirait d'une part, sur le métabolisme énergétique et d'autre part, sur la barrière épithéliale mais probablement dans le sens du renforcement de la barrière pour induire un réarrangement du cytosquelette en

réponse à l'augmentation de la perméabilité induite par la leptine (Le Drean and Segain 2014).

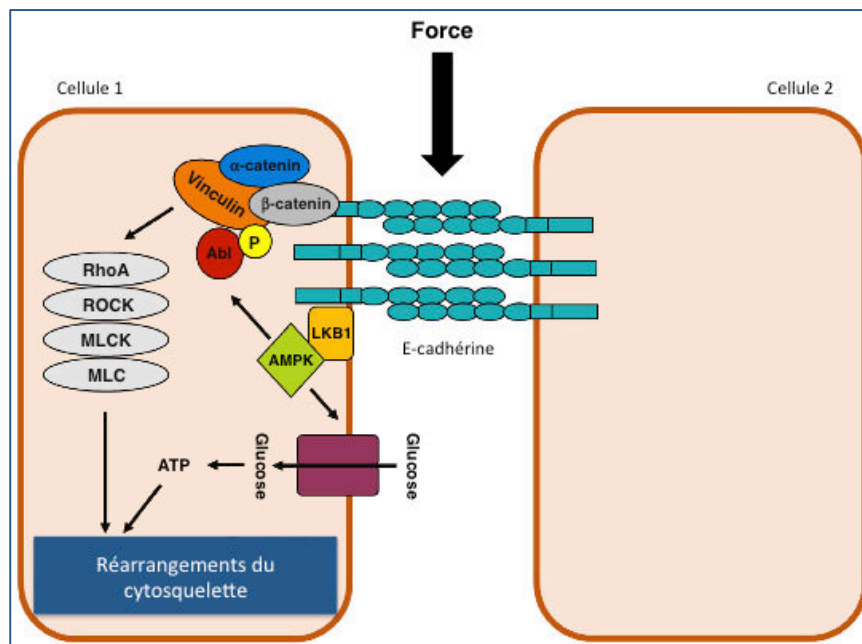


Figure 17 : Réarrangements du cytosquelette induits par l'AMPK.

Une force mécanique exercée sur l'E-cadhérine entraîne l'activation de l'AMPK par LKB1. Son activation permet, d'une part, le contrôle de RhoA et de MLC et, d'autre part, l'absorption de glucose, entraînant ainsi des réarrangements du cytosquelette. (D'après (Salvi and DeMali 2018)).

L'inflammation

Durant les dix dernières années, des études se sont intéressées à un nouveau rôle de l'AMPK dans la régulation des processus pro-inflammatoires. L'AMPK intervient dans plusieurs voies telles que « nuclear factor-kappa B » (NF- κ B), « Janus kinase-signal transducer and activation of transcription » (JAK-STAT), ou encore dans la production de ROS. Le rôle anti-inflammatoire de l'AMPK, et notamment via son isoforme β 1, a été mis en évidence chez la souris. En effet, des souris invalidées pour la sous-unité β 1 de l'AMPK présentent une diminution de l'activité de l'AMPK dans le macrophage associée à une augmentation de marqueurs d'inflammation. La transplantation de moelle osseuse à partir de souris invalidées pour la sous-unité β 1 de l'AMPK dans des souris contrôles soumises à un régime hyperlipidique entraîne une augmentation de l'infiltration de macrophages avec un profil inflammatoire dans le tissu adipeux, par rapport à des

souris transplantées avec de la moelle osseuse contrôle (Galic et al. 2011). L'effet anti-inflammatoire de l'AMPK dans le macrophage a été confirmé dans une autre étude où il a été démontré que la stimulation des macrophages avec des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, entraînait l'activation de l'AMPK, tandis que leur stimulation avec une molécule pro-inflammatoire comme le LPS diminuait l'activation de l'AMPK. Au niveau mécanistique, les auteurs suggèrent que l'AMPK dans le macrophage serait à l'origine de l'activation de l'Akt, induisant ainsi l'inactivation de GSK3 β et l'activation du « c-AMP response element-binding protein » (CREB), ce qui résulte en la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Ce mécanisme permettrait l'orientation du macrophage vers une fonction anti-inflammatoire (Sag et al. 2008).

L'ensemble des cibles métaboliques et non métaboliques de l'AMPK évoquées dans cette sous-partie est résumé dans la figure bilan ci-dessous (Fig. 18).

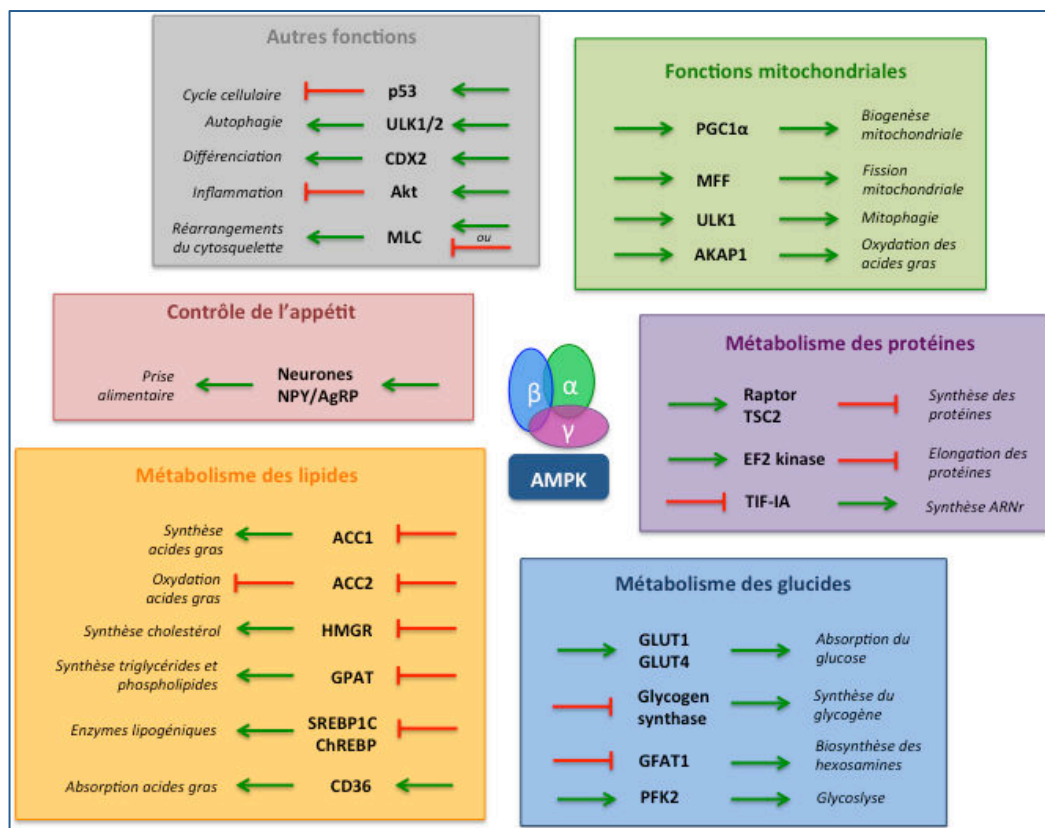


Figure 18 : Fonctions métaboliques et non métaboliques de l'AMPK.

Bilan des rôles de l'AMPK dans le métabolisme des lipides, le métabolisme des glucides, le métabolisme des protéines, les fonctions mitochondriales, le contrôle de l'appétit, le développement cellulaire, l'inflammation, et la méchanotransduction. Les flèches vertes indiquent une activation, et les barres rouges une inhibition.

2.4) L'AMPK, une cible thérapeutique

Grâce à son rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie énergétique de la cellule, et notamment à ses capacités d'inhiber les voies anaboliques pour stimuler les voies cataboliques, l'AMPK apparaît comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2. Ainsi, depuis les années 2000, de nombreuses recherches sont effectuées dans le but de développer des activateurs pharmacologiques de l'AMPK. Outre sa fonction de régulateur du métabolisme énergétique, comme nous l'avons décrit dans la partie précédente, l'AMPK présente de nombreuses autres fonctions au sein de la cellule. De ce fait, plusieurs études s'intéressent maintenant au potentiel thérapeutique de l'AMPK dans le traitement du cancer et des maladies cardiaques ; plus récemment, son rôle a été étudié dans les troubles neuromusculaires (Dial et al. 2018), les maladies rénales (Lee et al. 2018), la douleur chronique (Megat and Price 2018), ou encore dans les interactions hôte-pathogène (Mesquita et al. 2016). La problématique actuelle consiste à développer des molécules synthétiques et trouver des molécules naturelles capables de cibler des tissus et des isoformes spécifiques de l'AMPK pour affiner les traitements et éviter les effets indésirables. Dans cette sous-partie, nous nous intéresserons aux différents types d'activateurs et d'inhibiteurs de l'AMPK, et nous justifierons la pertinence de cibler l'AMPK dans certaines pathologies.

2.4.1) Les différents types d'activateurs de l'AMPK

Les activateurs indirects

- Molécule synthétique

L'AICAR est le premier activateur pharmacologique de l'AMPK à avoir été décrit dans le cadre d'un brevet datant de 1993. Une fois que l'AICAR a traversé la membrane plasmique de la cellule, il est converti en 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside monophosphate (ZMP), lequel présente une structure chimique très similaire à l'AMP (Fig. 19) et agit comme un mimétique de ce dernier. Sa capacité à activer l'AMPK a d'abord été démontrée au niveau hépatique chez le rat. Sa fonction a été confirmée dans une autre étude où il a notamment été montré dans des hépatocytes

et des adipocytes de rat que le ZMP pouvait mimer les effets de l'AMP sur l'AMPK, à savoir l'activation allostérique et sa capacité à favoriser sa phosphorylation par des kinases en amont telles que LKB1. De plus, l'accumulation de ZMP intracellulaire permettait bien la phosphorylation d'un substrat connu de l'AMPK, l'HMGR (Corton et al. 1995). L'identification de l'AICAR comme activateur pharmacologique de l'AMPK a été une découverte importante dans la mesure où il semblait spécifique, et n'induisait pas de variations dans les quantités de nucléotides de la cellule, par rapport à d'autres modes d'activation entraînant une diminution de l'ATP, comme l'action du fructose ou le choc thermique. Toutefois, la similitude de structure avec l'AMP laissait penser que les autres enzymes sensibles à l'AMP pourraient également être des cibles du ZMP. L'AICAR a été très couramment utilisé durant une dizaine d'années dans des modèles *in vitro* et *in vivo* pour la mise en évidence de cibles et de nouvelles fonctions de l'AMPK. Cependant, la spécificité de l'AICAR a été remise en cause (Guigas et al. 2009, Hasenour et al. 2014), notamment par l'utilisation de modèles de souris invalidées pour l'AMPK au niveau hépatique. En effet, à de fortes doses l'AICAR est capable d'affecter certaines fonctions cellulaires et d'inhiber la respiration mitochondriale indépendamment de l'AMPK (Guigas et al. 2007). De plus, il a été montré que l'AICAR pouvait également activer d'autres kinases dépendantes de l'AMP, autres que l'AMPK (Hunter et al. 2018).

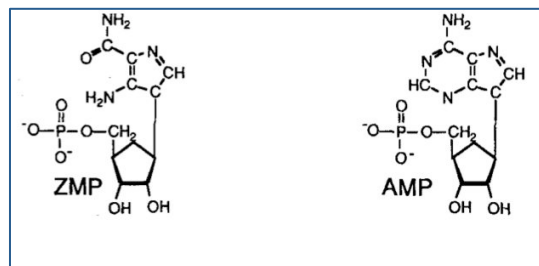


Figure 19 : Comparaison des structures chimiques du ZMP et de l'AMP.

(D'après (Corton et al. 1995)).

- Molécules naturelles dérivées des plantes

D'autres molécules capables d'activer l'AMPK par un mécanisme distinct de celui de l'AICAR ont été identifiées. Ces molécules agissent via l'inhibition de la fonction mitochondriale, réduisant ainsi sa production d'ATP, ce qui a pour conséquence d'augmenter les rapports ADP/ATP et AMP/ATP et donc d'activer l'AMPK. Au niveau thérapeutique, et plus particulièrement dans le cadre des maladies métaboliques, il

semble très intéressant de pouvoir activer l'AMPK, de par son rôle important dans le métabolisme énergétique. La metformine est le médicament utilisé en première intention pour soigner le diabète de type 2, notamment grâce à ses propriétés hypoglycémiantes. Appartenant à la famille des biguanides, la metformine provient du lilas français qui a couramment été utilisé au cours des siècles comme plante remède contre diverses pathologies. Son mode d'action a longtemps été méconnu, et reste encore controversé avec de multiples mécanismes d'action proposés (Foretz et al. 2019). C'est en 2000 qu'il a été montré que la metformine exerçait son rôle anti-diabétique en inhibant le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui induit une réduction de la respiration mitochondriale et donc de la production d'ATP (Owen et al. 2000). En 2001, une étude a publié un résultat majeur mettant en évidence l'activation de l'AMPK par la metformine *in vitro* dans des hépatocytes de rat et *in vivo* chez le rat (Zhou et al. 2001). L'activation indirecte de l'AMPK par l'inhibition de la respiration mitochondriale et l'augmentation de l'AMP par la metformine a été confirmée dans un modèle de cellules mutées au niveau de la sous-unité γ . En effet, dans ces cellules insensibles à l'AMP, la metformine ne pouvait pas activer l'AMPK (Hawley et al. 2010). L'effet thérapeutique de la metformine dépend de son transport dans la cellule grâce aux transporteurs organiques de cations OCT1 qui sont principalement exprimés dans le foie (Shu et al. 2007). Ainsi, un des rôles principaux de la metformine consiste à diminuer la production hépatique de glucose. Ce rôle a couramment été attribué à l'AMPK dans la littérature. Cependant notre équipe a démontré en 2010, grâce à l'utilisation d'un modèle de souris invalidées pour l'AMPK au niveau hépatique, que la metformine régulait la production hépatique de glucose par un mécanisme AMPK-indépendant. En effet, l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique par la metformine semble liée à la diminution du statut énergétique du foie (Foretz et al. 2010). Toutefois, une étude a montré que, grâce à sa capacité à réduire le stockage des lipides via l'inhibition de l'ACC, l'activation de l'AMPK par la metformine participait à la diminution de la résistance à l'insuline dans le foie de souris soumises à un régime hyperlipidique (Fullerton et al. 2013). De plus, il a récemment été montré que la metformine pouvait également agir au niveau du duodénum pour réguler la diminution de la production hépatique de glucose par l'intermédiaire de l'axe intestin-cerveau. Les auteurs ont notamment mis en évidence l'importance de l'AMPK dans ce mécanisme puisque l'invalidation de l'AMPK dans le duodénum de rats soumis à un régime hyperlipidique

inhibe l'effet de la metformine sur la production de glucose. Cette étude suggère que l'activation de l'AMPK par la metformine au niveau intestinal entraînerait la production de GLP-1 par les cellules L entéroendocrines, permettant ainsi la diminution de la production hépatique de glucose via l'axe neuronal intestin-cerveau (Duca et al. 2015).

De nombreux autres composés issus des plantes, traditionnellement employés dans la médecine asiatique, peuvent également activer l'AMPK. Comme la metformine et d'autres médicaments utilisés pour le traitement du diabète tels que la canagliflozine (Hawley et al. 2005), certains d'entre eux inhibent le complexe I de la chaîne respiratoire. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la berbérine, l'arctigénine, la galégine, ou encore la phlorétine. Pour les plantes, ces molécules constituent un mécanisme de défense contre l'infection par des pathogènes (Grahame Hardie 2016). Le resvératrol, polyphénol que l'on retrouve dans certains fruits comme le raisin, est également considéré comme un activateur indirect de l'AMPK. Le resvératrol est une molécule couramment étudiée, elle est principalement connue pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Une étude menée chez des humains obèses a mis en évidence ses effets bénéfiques sur le métabolisme, mimant la restriction calorique, effets qui sont associés à une augmentation de l'activité de l'AMPK dans le muscle (Timmers et al. 2011). Son mécanisme d'action a été confirmé dans des cellules invalidées pour la sous-unité γ de l'AMPK (Hawley et al. 2010). De même que les autres molécules citées précédemment, le resvératrol altère aussi la fonction mitochondriale mais par l'inhibition de l'ATP synthase mitochondriale et non par l'inhibition du complexe I, ce qui augmente également la quantité d'AMP dans la cellule et donc l'activation de l'AMPK (Hawley et al. 2010).

Cependant, l'utilisation d'activateurs indirects de l'AMPK semble limitée. D'une part, certains de leurs effets peuvent être AMPK-indépendants et entraîner par exemple l'activation de kinases également sensibles à l'AMP et, d'autre part, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale peut induire une acidose lactique et être toxique pour la cellule. En conséquence, le développement d'activateurs spécifiques de l'AMPK agissant directement sur la kinase a suscité un intérêt grandissant.

Les activateurs directs

- Les composés $\beta 1$ sélectifs

C'est en 2006 que les laboratoires Abbott identifient pour la première fois, parmi plus de 700 000 composés testés sur de l'AMPK purifiée à partir de foie de rat, une molécule appartenant à la famille des thienopyridones capable d'activer de manière directe l'AMPK ; il s'agit du composé A-769662, optimisé à partir du composé A-592107. Suite à ce résultat, il apparaissait donc possible d'activer l'AMPK avec des composés autres que les nucléotides (Guigas et al. 2009). Cette étude a notamment montré que l'A-769662 devait probablement se fixer sur un site différent de l'AMP, car en présence d'une quantité saturante d'AMP dans la cellule, l'A-769662 pouvait toujours entraîner l'activation de l'AMPK (Cool et al. 2006). Cette hypothèse a été démontrée ultérieurement grâce à l'utilisation d'un mutant $\gamma 2$ de l'AMPK insensible à l'AMP (Hawley et al. 2010). Similairement à l'AMP, l'A-769662 active l'AMPK de manière allostérique et empêche la déphosphorylation de la Thr172 (Sanders et al. 2007). Grâce à des études cristallographiques de la structure hétérotrimérique de l'AMPK associée à l'A-769662, un nouveau site de liaison allostérique a été mis en évidence. Ce site particulier se présente sous la forme d'une poche entre le domaine de liaison au glycogène β -GBD et le domaine catalytique α -KD de l'AMPK (Xiao et al. 2013) (Fig. 20). A ce jour, aucun ligand endogène capable de se lier à cette poche n'a été identifié, et ce site a alors été nommé « Allosteric drug and metabolite site » (ADaM). Cependant, il a été montré que l'A-769662 ne pouvait se lier qu'aux complexes d'AMPK comportant l'isoforme $\beta 1$. En effet, dans des hépatocytes obtenus à partir de souris invalidées pour l'isoforme $\beta 1$ de l'AMPK, l'A-769662 est incapable de stimuler l'activation de l'AMPK (Scott et al. 2008) ; ainsi l'A-769662 est considéré comme un activateur $\beta 1$ sélectif. Ce résultat conforte l'idée qu'il est donc possible de générer des activateurs permettant de cibler des complexes particuliers de l'AMPK dans des tissus spécifiques, ce qui est très intéressant d'un point de vue thérapeutique. Chez l'homme, bien que la sous-unité $\beta 1$ soit présente dans le foie, la sous-unité $\beta 2$ y est plus fortement exprimée, ce qui peut être limitant pour l'utilisation de l'A-769662. Cependant, chez la souris, c'est la sous-unité $\beta 1$ qui est principalement exprimée dans le foie. De nombreuses études ont donc investigué dans des modèles murins les effets bénéfiques de l'A-769662 au niveau hépatique. Son rôle dans la stéatose hépatique a notamment été démontré (Cool et al.

2006, Boudaba et al. 2018), nous détaillerons ces aspects thérapeutiques à la fin de cette sous-partie. L'A-769662 a également été utilisé pour favoriser l'activation de l'AMPK dans le macrophage dans la mesure où la sous-unité β_1 y est majoritairement exprimée chez la souris et l'homme. En effet, dans un modèle pathologique d'arthrite inflammatoire chez la souris, l'activation de l'AMPK avec l'A-769662 favorise ses fonctions anti-inflammatoires, notamment en diminuant l'infiltration des cellules inflammatoires, la sécrétion d'IL-6, et la voie NF- κ B dans l'articulation. Le macrophage étant le principal effecteur dans l'arthrite inflammatoire, une partie des effets de l'A-769662 pourrait être expliquée par l'activation de l'AMPK dans ce dernier, ce qui supprimerait sa réponse inflammatoire (Guma et al. 2015).

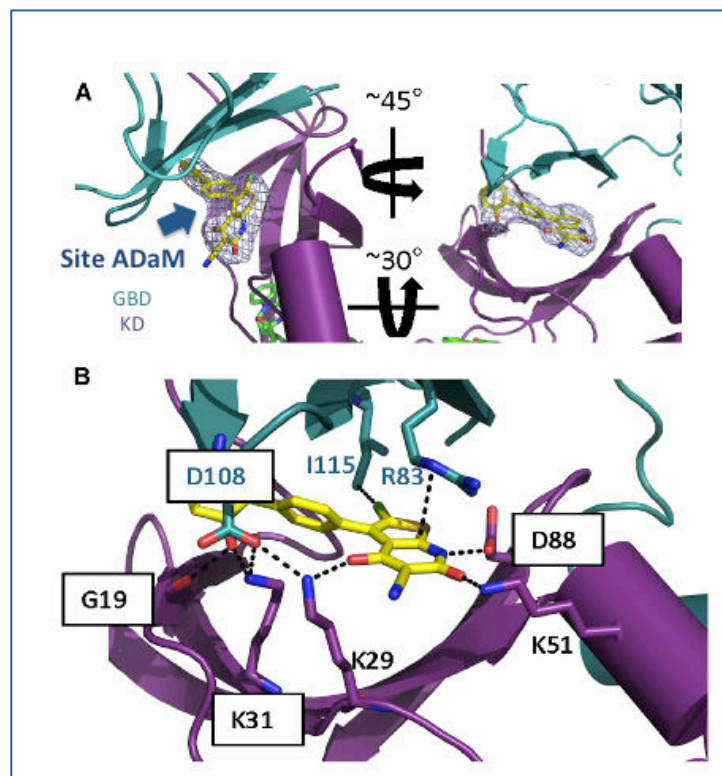


Figure 20 : Fixation du composé A-769662 sur le site ADaM de l'AMPK.

Etude cristallographique du complexe $\alpha_1\beta_1\gamma_1$. (A) Le composé A-769662 se fixe sur une poche située entre le domaine GBD de la sous-unité β et le domaine kinase (KD) de la sous-unité α . (B) Zoom sur le site allostérique indiquant l'interaction protéine-ligand. (D'après (Calabrese et al. 2014)).

Par la suite, d'autres laboratoires ont développé des activateurs pharmacologiques de l'AMPK tels que le MT 63-78, le PF-06409577, et le PF-249. Similairement à l'A-769662, ces composés se fixent sur le site ADaM, ils favorisent l'activation allostérique de l'AMPK et empêchent la déphosphorylation de la Thr172 ; ils sont également $\beta 1$ sélectifs. Le MT 63-78 a notamment été employé dans des études sur le cancer de la prostate. Il a été montré dans un modèle de souris présentant une xénogreffe de tumeur de la prostate, que le MT 63-78 augmentait l'activation de l'AMPK dans les zones tumorales, entraînant ainsi une diminution de la synthèse de lipides et de la croissance tumorale (Zadra et al. 2014). Les composés PF-06409577 et PF-249 ont été testés chez le rat et améliorent la néphropathie diabétique, cependant leur spécificité pour l'AMPK dans cette étude n'a pas été démontrée par l'utilisation de modèle génétique (Salatto et al. 2017).

- Les composés $\beta 1/\beta 2$ sélectifs

Parmi la liste de molécules pharmacologiques décrites (Giordanetto and Karis 2012) comme étant des activateurs de l'AMPK capables de se fixer sur le site ADaM, certaines ne présentent pas de spécificité pour la sous-unité β , et peuvent donc activer les complexes hétérotrimériques de l'AMPK contenant les isoformes $\beta 1$ ou $\beta 2$. Le composé 991 fait partie de la classe des benzimidazoles, il s'agit d'un activateur puissant de l'AMPK puisqu'il est cinq à dix fois plus efficace que l'A-769662 (Xiao et al. 2013). De plus, étant donné qu'il ne présente pas de sélectivité pour l'isoforme β , il apparaît comme un activateur plus polyvalent que l'A-769662. En effet, dans le muscle squelettique de rat, où l'isoforme $\beta 2$ prédomine comme chez l'homme, l'activation de l'AMPK par le 991 augmente l'absorption de glucose et l'oxydation des acides gras (Lai et al. 2014), tandis que l'A-769662 est incapable d'induire ces effets métaboliques dans ce tissu. Dans des hépatocytes de souris, le 991 stimule également l'oxydation des acides gras et diminue ainsi l'accumulation de lipides hépatiques (Boudaba et al. 2018). Cependant, le 991 n'a jamais été utilisé dans études *in vivo*. Les composés PF-739 et MK-8722, tous deux dérivés de la classe des benzimidazoles, ont davantage été étudiés chez l'animal pour leurs propriétés thérapeutiques contre le diabète de type 2. En effet, il a été montré que le PF-739 et le MK-8722 permettaient de diminuer le glucose plasmatique via leur action sur le muscle squelettique chez des souris diabétiques et des primates non humains (Cokorinos et al. 2017, Myers et al. 2017).

- Activation via la fixation sur la sous-unité γ

Par ailleurs, il existe des activateurs directs de l'AMPK qui ne se fixent pas sur le site ADaM. Le composé C2 a été identifié comme un activateur de l'AMPK parmi une liste de 1200 molécules agissant comme des mimétiques de l'AMP (Gomez-Galeno et al. 2010). L'analyse cristallographique de l'AMPK fixée au C2 a permis de mettre en évidence un site de liaison sur la sous-unité γ , distinct des sites de liaison des nucléotides (Langendorf et al. 2016). Plus précisément, le C2 active de manière allostérique les complexes d'AMPK comportant l'isoforme $\alpha 1$, et les protège de la déphosphorylation ; son effet allostérique est réduit sur les complexes comportant l'isoforme $\alpha 2$ et il ne présente aucun effet sur la déphosphorylation (Hunter et al. 2014). Cependant, afin de pouvoir activer l'AMPK dans la cellule, ce composé doit être administré sous la forme d'un pro-médicament qui pénètre plus facilement dans la cellule, il s'agit du composé C13 (Gomez-Galeno et al. 2010). Au niveau fonctionnel, il a été montré que le C13 permettait de réduire la lipogenèse dans un modèle d'hyperlipidémie chez la souris (Gomez-Galeno et al. 2010), et ce au niveau hépatique (Hunter et al. 2014).

- Activation via la fixation sur un site inconnu

Enfin, pour certains composés décrits dans la littérature et d'un intérêt thérapeutique prometteur, le site de fixation sur l'AMPK est encore méconnu à ce jour. C'est notamment le cas du composé O304, découvert par la société suédoise Betagenon (<http://betagenon.se/>), qui est un activateur direct de l'AMPK à avoir été testé dans plusieurs phases d'étude clinique chez l'homme. L'O304 empêche la déphosphorylation de la Thr172 et son mode d'action est dépendant de la présence de la kinase LKB1. Cependant, il ne peut pas induire l'activation allostérique de l'AMPK. L'administration de l'O304 peut se faire par voie orale ; il possède une demi-vie relativement longue, ce qui constitue un atout thérapeutique. Ses effets bénéfiques ont été mis en évidence dans le cadre du diabète de type 2 et dans l'amélioration des problèmes cardiovasculaires associés au diabète (Steneberg et al. 2018), mais également pour limiter la douleur (Das et al. 2019).

Les structures chimiques des différents activateurs de l'AMPK cités dans cette partie sont représentées ci-dessous (Fig. 21).

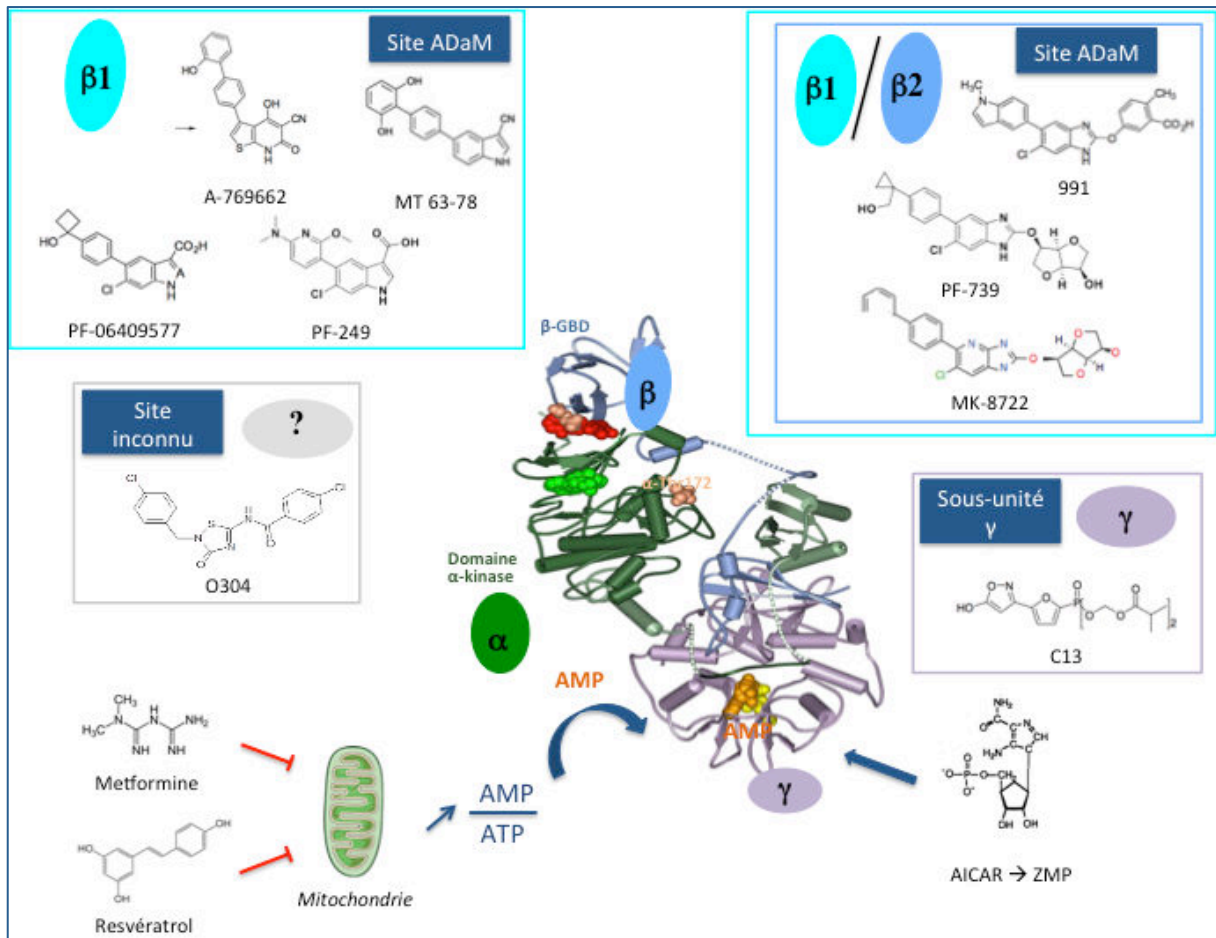


Figure 21 : Structures chimiques des activateurs de l'AMPK.

Les activateurs directs se liant au site ADaM sont l'A-769662, le MT 63-78, le PF-06409577, le PF-249 ($\beta 1$ sélectif), et le PF-739, le MK-8722, le 991 ($\beta 1/\beta 2$). Le C13 et l'O304 sont également des activateurs directs et se lient respectivement à la sous-unité γ et à un site inconnu. L'AICAR sous la forme du ZMP se fixe également à la sous-unité γ . La metformine et le resvératrol sont des activateurs indirects, ils inhibent la fonction mitochondriale et induisent l'augmentation du rapport AMP/ATP. (D'après (Olivier et al. 2018)).

2.4.2) Les inhibiteurs de l'AMPK

Dans le cas de certaines pathologies comme le cancer, l'inhibition de l'AMPK pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques. La dorsomorphine, également appelée

composé C, a été très couramment utilisée dans la littérature comme inhibiteur de l'AMPK, agissant notamment comme un compétiteur de l'ATP. Cependant, une étude s'est intéressée à la spécificité d'un ensemble d'inhibiteurs de protéines kinases et a démontré que le composé C inhibait un certain nombre d'autres kinases de manière équivalente à l'AMPK (Bain et al. 2007, Vogt et al. 2011). Ainsi, le composé C n'est pas spécifique de l'AMPK, et les résultats d'études utilisant cet inhibiteur doivent être analysés avec précaution. D'autres inhibiteurs de l'AMPK ont récemment été décrits dans la littérature, mais à ce jour ils ont été peu étudiés. Le composé MT47-100 présente un double rôle puisqu'il assure l'activation allostérique des complexes d'AMPK avec l'isoforme $\beta 1$ tandis qu'il inhibe les complexes avec l'isoforme $\beta 2$. Son potentiel thérapeutique a notamment été étudié dans le pancréas. Les cellules des îlots pancréatiques possèdent les deux isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ de l'AMPK, et l'isoforme $\beta 2$ semble réguler de manière négative la sécrétion d'insuline. Une étude a ainsi démontré que l'inhibition des complexes d'AMPK comportant l'isoforme $\beta 2$ par le MT47-100 permettait d'augmenter la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques en réponse au glucose (Scott et al. 2015). Plus récemment, un nouvel inhibiteur a été caractérisé, il s'agit du SBI-020695. Il apparaît comme étant quarante fois plus efficace que le composé C et davantage spécifique pour l'inhibition de l'AMPK (Fig. 22) (Dite et al. 2018). D'autres études doivent être menées pour évaluer son potentiel thérapeutique.

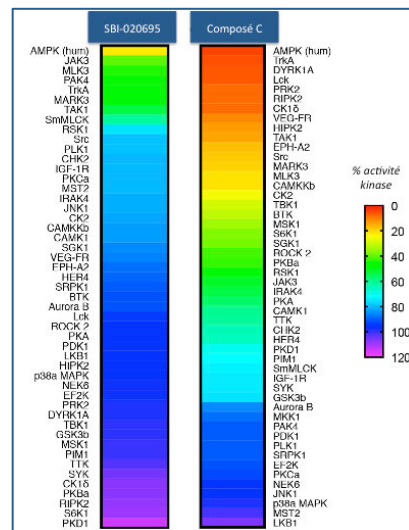


Figure 22 : Comparaison des protéines kinases inhibées par le SBI-020695 et le composé C.

(D'après (Dite et al. 2018)).

2.4.3) L'intérêt de cibler l'AMPK dans certaines pathologies

Dans cette sous-partie, nous nous intéressons à quelques pathologies où l'AMPK présente un potentiel thérapeutique. Dans les maladies métaboliques et cardiovasculaires, l'activation de l'AMPK permettrait une diminution des symptômes, cependant nous discuterons la bivalence de l'AMPK dans le cas du cancer.

Diabète de type 2 et obésité

Le diabète de type 2 est défini par une hyperglycémie chronique, causée par une baisse de la sensibilité des cellules à l'insuline, appelée insulino-résistance. L'obésité, caractérisée par une quantité de graisses importante dans les tissus métaboliques, est souvent associée au diabète de type 2. Certaines études ont montré chez des patients obèses présentant une insulino-résistance que l'activité de l'AMPK était diminuée dans certains tissus, comme le tissu adipeux ou le muscle squelettique, tandis que cette activité pouvait être rétablie grâce à l'exercice physique et la restriction calorique (Ruderman et al. 2013). Ainsi, l'activation pharmacologique de l'AMPK dans le syndrome métabolique semble pertinente.

L'utilisation du composé PF-739, activateur non sélectif de l'AMPK, a permis de mettre en évidence le potentiel thérapeutique de l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique pour limiter le diabète de type 2, et en particulier l'augmentation de la glycémie. Il s'agit de la preuve de concept vingt ans après l'hypothèse selon laquelle l'AMPK musculaire pourrait être utilisée comme cible thérapeutique pour le diabète (Winder and Hardie 1999). En effet, chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique et présentant une insulino-résistance, l'administration du PF-739 en dose aiguë diminue le glucose plasmatique. Cette étude a notamment démontré que ces effets sur la régulation de la glycémie étaient dus à l'augmentation de l'absorption de glucose par les tissus périphériques, sans pour autant affecter la production hépatique de glucose. Dans la mesure où le traitement avec le PF-739 augmentait l'activité de l'AMPK dans le muscle et le foie, les auteurs se sont intéressés au rôle précis de l'AMPK dans ces tissus pour expliquer la diminution de l'hyperglycémie. Pour cela, des modèles génétiques ont été utilisés. Tout d'abord, chez des souris invalidées pour l'AMPK au niveau hépatique, le PF-739 diminuait toujours le glucose plasmatique de manière

similaire aux souris contrôles, indiquant ainsi que dans le cadre de ce traitement, l'AMPK hépatique n'avait pas d'effet sur l'amélioration de la tolérance au glucose. En revanche, l'effet du PF-739 sur la diminution du glucose plasmatique chez des souris invalidées pour l'AMPK au niveau du muscle squelettique était diminué. De manière intéressante, ces souris présentaient une compensation de l'absence d'AMPK dans le muscle, avec notamment une augmentation de l'absorption de glucose dans le cœur et le tissu adipeux. Ainsi, le PF-739 induit une diminution de l'hyperglycémie via l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique et la stimulation de l'absorption de glucose dans ce tissu. Il a également été montré qu'un traitement chronique de trente-deux jours avec le PF-739 avait un effet bénéfique, d'une part, sur la diminution du glucose et de l'insuline plasmatiques et, d'autre part, sur la réduction de la masse grasse. Afin de confirmer le potentiel thérapeutique du PF-739, celui-ci a été testé chez des mammifères supérieurs tels que les primates non humains. Chez ces animaux non diabétiques, les auteurs ont démontré que le PF-739 permettait également de diminuer le glucose plasmatique (Cokorinos et al. 2017). Ainsi, cette étude suggère fortement que l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique permettrait de traiter l'hyperglycémie dans le diabète de type 2. De même, une autre étude a montré que le composé MK-8722 permettait d'améliorer l'homéostasie glucidique, et en particulier la résistance à l'insuline, grâce à l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique. Ces propriétés ont notamment été démontrées dans des modèles de souris diabétiques *db/db* et de primates non humains diabétiques. Toutefois, ce composé présente des effets secondaires en induisant une hypertrophie cardiaque (Myers et al. 2017).

Le composé O304 semble également prometteur dans le traitement du diabète de type 2 et de l'obésité. Ce composé présente de nombreuses fonctions bénéfiques à l'échelle de l'organisme. En effet, au niveau systémique, l'O304 protège de l'hyperglycémie et améliore la résistance à l'insuline chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique et présentant une insulino-résistance. Grâce à son rôle sur la régulation de la glycémie, l'O304 réduit le stress des cellules β pancréatiques et la formation de plaques amyloïdes au sein de celles-ci. Parallèlement à ces effets, le poids des souris sous régime hyperlipidique traitées avec l'O304 est diminué. Les auteurs de l'étude suggèrent que la perte de poids pourrait être expliquée par une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité métabolique des tissus adipeux blanc et brun. Concernant ce dernier point, une étude plus récente a montré que l'activation génétique

globale de l'AMPK chez la souris protégeait de l'obésité induite par un régime hyperlipidique via l'augmentation de la dépense énergétique, et que cela était associé à l'activation de la thermogenèse dans le tissu adipeux blanc (Pollard et al. 2019). Le diabète de type 2 peut être associé à des complications cardiovasculaires. Or, il a été montré que l'O304 permettait également d'améliorer la fonction microvasculaire chez les souris obèses diabétiques. Comme énoncé dans le précédent paragraphe, l'O304 a été testé en étude clinique. Les études toxicologiques chez le rat et le chien ont été validées, la phase I également, et la phase IIa de vingt-huit jours a été menée chez des patients atteints de diabète de type 2 et sous traitement metformine. De manière très intéressante, cette étude a mis en évidence les propriétés bénéfiques de l'O304 sur l'amélioration de la glycémie et de la résistance à l'insuline chez ces patients. De plus, la fonction microvasculaire et la pression sanguine étaient également améliorées. Un autre fait important est que l'O304 n'entraîne pas d'hypertrophie cardiaque, comme cela peut être observé avec l'utilisation d'autres activateurs de l'AMPK. Ainsi, l'O304 semble constituer un bon traitement pour le diabète de type 2 tout en limitant les complications cardiaques. Cependant, toutes ces fonctions bénéfiques de l'O304 ne sont pas forcément AMPK-dépendantes. Chez la souris, il a été montré que l'O304 active l'AMPK dans le muscle squelettique, ce qui est associé à une augmentation de l'absorption de glucose, mais l'absence d'utilisation de modèles génétiques adaptés ne permet pas de conclure quant aux mécanismes AMPK-dépendant.

La stéatose hépatique

Une des pathologies hépatiques les plus courantes à l'heure actuelle est la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD). Elle est caractérisée par une stéatose hépatique, à savoir une accumulation de lipides dans le foie. Souvent associée à l'obésité, le NAFLD peut précéder la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) et le carcinome hépatocellulaire. A ce jour, il n'existe pas encore de traitement ciblé pour le NAFLD. Grâce à son action sur l'ACC et l'inhibition de la synthèse des acides gras, l'AMPK constitue une cible thérapeutique pour limiter la stéatose hépatique. De nombreuses études se sont donc intéressées à l'activation de l'AMPK dans le foie grâce à l'utilisation d'activateurs pharmacologiques ou par des modèles génétiques.

Tout d'abord, une étude a montré que la phosphorylation de l'ACC par l'AMPK était essentielle à l'action bénéfique de la metformine sur la diminution de la quantité de lipides hépatiques. En effet, pour tester l'importance de l'inhibition de l'ACC au niveau hépatique, des souris knock-in pour les sites de phosphorylation de l'AMPK sur les deux isoformes de l'ACC ont été générées (ACC DKI), rendant ainsi l'ACC insensible à la phosphorylation par l'AMPK. Sous régime contrôle, les souris ACC DKI présentent une hyperglycémie et sont insulino-résistantes. Plus précisément, elles possèdent une quantité excessive de lipides dans le foie associée à une fibrose, ce qui induit chez ces souris le NAFLD. De manière concordante avec ces résultats, dans les hépatocytes issus des souris ACC DKI la lipogenèse *de novo* est augmentée tandis que l'oxydation des acides gras est diminuée. Lorsque ces souris sont soumises à un régime hyperlipidique, un traitement à la metformine n'a aucun effet métabolique tandis qu'il diminue la lipogenèse, améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline chez les souris contrôles (Fullerton et al. 2013).

Par la suite, dans un modèle transgénique de stéatose hépatique chez la souris, il a été montré que le composé A-769662 permettait de réduire l'accumulation de lipides au niveau hépatique. En effet, l'A-769662 permet, d'une part, l'augmentation de l'oxydation des acides gras et, d'autre part, inhibe la synthèse lipidique *de novo*. Ces effets sont bien AMPK-dépendants car ils sont abolis dans un modèle de souris invalidées pour l'AMPK dans le foie soumises à un régime hyperlipidique, contrairement aux souris contrôles (Boudaba et al. 2018). Il a également été montré que le composé PF-06409577 permettait de réduire la quantité de cholestérol et de lipides hépatiques via l'activation de l'AMPK hépatique dans des modèles de rongeurs et de primates non humains (Esquejo et al. 2018).

L'utilisation de modèles génétiques chez la souris présentant une activation de l'AMPK dans le foie a permis de confirmer le potentiel thérapeutique de l'AMPK pour le traitement de la stéatose hépatique. Une première étude a montré qu'une activation constitutive de l'AMPK dans le foie protégeait de la stéatose dans le cadre d'un régime riche en fructose via l'inhibition de la lipogenèse *de novo* (Woods et al. 2017). Dans un autre contexte d'obésité induite par un régime hyperlipidique, l'activation hépatique inductible de l'AMPK diminue également la quantité de lipides hépatiques, ainsi que l'inflammation et la fibrose (Garcia et al. 2019).

Ischémie-reperfusion cardiaque

Le lien entre l'activité de l'AMPK et l'ischémie-reperfusion cardiaque a été établi en 1995. Suite à une ischémie myocardique, lorsque les apports en oxygène sont interrompus en cas de défauts d'irrigation sanguine, la reperfusion peut être délétère car l'apport brutal de l'oxygène et les réactions de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînent la production de ROS. Or, la reperfusion est associée à une augmentation de l'oxydation des acides gras où l'AMPK joue un rôle important. En effet, pendant la phase de reperfusion, l'AMPK est activée et induit l'inhibition de l'ACC, de ce fait la production de malonyl-CoA est diminuée et cela permet une augmentation de l'oxydation des acides gras, ce qui peut être néfaste pour le cœur (Kudo et al. 1995). Cependant, une étude plus récente a démontré le rôle cardioprotecteur de l'AMPK lors de l'ischémie-reperfusion. En effet, des souris invalidées pour l'AMPK dans le cœur sont plus sensibles à l'ischémie-reperfusion et présentent notamment des défauts dans l'absorption de glucose, la glycolyse, l'oxydation des acides gras, et une moindre récupération de la contractilité (Russell et al. 2004). L'utilisation de l'activateur A-769662 dans ces conditions a permis de confirmer que l'activation de l'AMPK était bénéfique pour limiter les lésions cardiaques. Des cœurs de souris traités avec l'A-769662 présentent une meilleure récupération de la fonction contractile et moins de nécrose suite à un épisode ischémique. L'activation de l'AMPK permet notamment l'inactivation de la protéine eEF2, impliquée dans la synthèse protéique, et l'activation de l'« endothelial nitric oxide synthase » (eNOS). Ces effets de l'A-769662 sont perdus chez des souris invalidées pour l'AMPK au niveau cardiaque, confirmant ainsi des mécanismes AMPK-dépendants (Kim et al. 2011).

Le cancer

Comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, le suppresseur de tumeur LKB1 est capable de phosphoryler la Thr172 de l'AMPK et, par ailleurs, l'AMPK inhibe la croissance cellulaire. Ces premiers éléments laissent penser que l'AMPK aurait des propriétés anti-tumorales, cependant son rôle est bivalent selon l'état d'avancement des tumeurs. Tout d'abord, des études ont démontré le rôle anti-tumoral de l'AMPK. L'utilisation de souris transgéniques pour le gène *c-Myc*, qui favorise le développement

des lymphomes, et invalidées pour l'isoforme $\alpha 1$ a permis de mettre en évidence que ces souris présentaient une augmentation de la tumorigenèse. De plus, les auteurs de cette étude ont montré que l'absence d'AMPK dans les cellules cancéreuses favorisait l'effet Warburg, ce qui correspond à des taux de glycolyse très importants dans ces cellules, leur permettant ainsi de se développer rapidement (Faubert et al. 2013). La perte de l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK induit également un développement plus rapide des lymphomes à cellules T ; il a notamment été montré que la phenformine protégeait du développement du cancer par un mécanisme AMPK-dépendant (Vara-Ciruelos et al. 2019). Une autre étude a également démontré que des souris invalidées pour la sous-unité $\beta 1$ développaient des lymphomes plus précocement que les souris contrôles (Houde et al. 2017).

Malgré ces premiers résultats, d'autres études suggèrent que l'AMPK pourrait avoir un rôle pro-tumoral, notamment lorsque la maladie est déjà installée. En effet, en cas de stress métabolique, l'activation de l'AMPK dans les cellules cancéreuses assure le maintien du « Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate » (NADP) sous sa forme réduite NADPH, ce qui permet la survie des cellules (Jeon et al. 2012). Une autre étude a mis en évidence le rôle de l'AMPK dans la croissance tumorale. Dans un modèle de cancer pulmonaire chez la souris, exprimant le mutant K-Ras, l'inactivation des deux isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ entraîne une diminution de la taille des tumeurs (Eichner et al. 2019).

Etant donné les multiples fonctions de l'AMPK, de nombreux activateurs ont été identifiés durant ces dix dernières années pour traiter diverses pathologies. Les défis actuels consistent à développer des molécules ciblant des complexes hétérotrimériques particuliers de l'AMPK et des tissus spécifiques, et à combiner plusieurs activateurs (Ford et al. 2015, Langendorf et al. 2016). Des laboratoires travaillent actuellement sur le potentiel de nanoparticules pour activer l'AMPK dans des cellules bien précises. De plus, la combinaison de plusieurs activateurs de l'AMPK permet de potentialiser leurs effets. A titre d'exemple, l'A-769662 favorise la protection cardiaque lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion, cependant il ne peut activer que les complexes d'AMPK comportant l'isoforme $\beta 1$. Lorsqu'il est combiné avec d'autres activateurs tels que la metformine, qui a un effet plus global sur l'activation de l'AMPK via l'augmentation de l'AMP, cela permet une action synergique de ces deux activateurs et assure une

meilleure protection des cardiomyocytes (Timmermans et al. 2014). D'autres combinaisons d'activateurs, n'entraînant pas nécessairement la phosphorylation de la Thr172, pourraient avoir un intérêt thérapeutique, notamment dans le cas de pathologies induisant une perte ou une dérégulation de LKB1 comme dans certains cancers. En effet, la combinaison de l'A-769662 et de l'AMP permet une activation allostérique de l'AMPK indépendamment de la phosphorylation de la Thr172 (Scott et al. 2014).

Les fonctions thérapeutiques de l'AMPK évoquées dans ce paragraphe sont résumées dans la figure ci-dessous (Fig. 23).

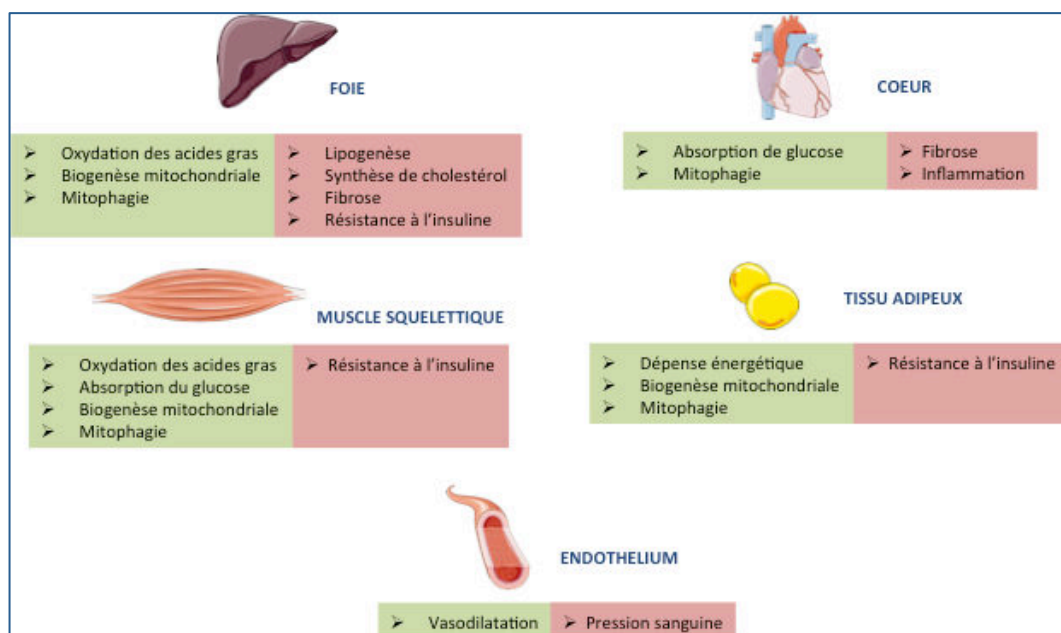


Figure 23 : Rôles de l'AMPK dans le foie, le coeur, le muscle squelettique, le tissu adipeux, et l'endothélium.

Les effets augmentés par l'AMPK sont indiqués en vert, et les effets diminués en rouge. (D'après (Steinberg and Carling 2019)).

3) Le rôle de l'AMPK dans la fonction barrière

Les cellules épithéliales forment des barrières physiques au sein de l'organisme, le protégeant ainsi de l'environnement extérieur. Cette fonction barrière est assurée par

le réseau des protéines de jonction, jonctions serrées et jonctions adhérentes, qui permettent de lier les cellules entre-elles et de maintenir leur polarité. L'altération des barrières épithéliales peut être associée à diverses pathologies telles que l'inflammation intestinale, le cancer, les infections, ou encore les maladies rénales. Plusieurs éléments laissent penser que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans le maintien de la fonction barrière. D'une part, un stress énergétique entraînant une déplétion d'ATP entraîne la désorganisation des jonctions serrées et perturbe l'épithélium (Canfield et al. 1991) ; or les voies de signalisation de l'AMPK sont activées en réponse à l'augmentation du rapport AMP/ATP. Des études ont mis en évidence l'importance de l'activité de l'AMPK régulée par la kinase LKB1 dans le phénotype de polarisation cellulaire (Forcet et al. 2005, Lee et al. 2007). L'AMPK se trouve donc à l'interface entre la régulation de l'homéostasie énergétique cellulaire et le maintien de la polarité. C'est en 2006 et 2007 que deux laboratoires démontrent l'implication de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées en réponse à une altération de la barrière épithéliale (Zhang et al. 2006, Zheng and Cantley 2007). Dans cette dernière partie, nous nous intéresserons à la découverte de la fonction structurale de l'AMPK dans l'épithélium rénal, puis nous décrirons ce rôle au sein d'autres épithélia, et enfin nous détaillerons de manière plus générale le rôle de l'AMPK dans l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale.

3.1) Découverte du rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées

Le rôle de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées a été décrit pour la première fois en 2006 par le laboratoire de Michael Caplan dans les cellules rénales MDCK (Zhang et al. 2006), puis confirmé par le laboratoire de Lewis Cantley (Zheng and Cantley 2007). Cette découverte fait suite à une étude qui suggérait l'implication de l'AMPK dans la polarisation cellulaire. En effet, dans cette étude, il a été montré qu'une mutation de la région C-terminale de LKB1, n'affectant pas son activité kinase, induisait des défauts de polarisation dans des cellules épithéliales intestinales et dans des astrocytes, lesquels étaient associés à une diminution de l'activité de l'AMPK (Forcet et al. 2005). Une autre étude avait également montré des défauts de polarité cellulaire dans des drosophiles invalidées pour LKB1 qui étaient restaurés en réponse à l'activation constitutive de l'AMPK (Lee et al. 2007).

Les jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales dépendent de la présence du calcium extracellulaire. En effet, l'incubation des cellules MDCK dans un milieu sans calcium induit une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) tandis que la réintroduction du calcium extracellulaire restaure la TEER (Cereijido et al. 1978). Ces changements de résistance sont notamment associés à une délocalisation des protéines des jonctions serrées de la membrane vers le cytoplasme en cas d'absence de calcium, et inversement en cas d'ajout de calcium. Pour évaluer l'importance de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées, le groupe de Michael Caplan a procédé à des expériences de « calcium switch » sur les cellules MDCK, consistant à incuber les cellules dans un milieu sans calcium puis à les ré-incuber dans un milieu classique contenant du calcium. Cette expérience permet ainsi de mimer les phénomènes de déstabilisation et de réassemblage des jonctions serrées. Nous détaillerons en particulier les résultats de cette étude. Dans un contexte de calcium switch, les auteurs ont montré que l'ajout de calcium extracellulaire était associé à une augmentation de l'activité de l'AMPK, cette activité n'étant pas induite par des variations de concentration en ATP. L'utilisation de l'activateur pharmacologique de l'AMPK, l'AICAR, lors de l'ajout de calcium dans une expérience de calcium switch favorise le réassemblage des jonctions serrées. En effet, cette étude met en évidence que la présence d'AICAR induit une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité paracellulaire. De plus, l'AICAR entraîne également une relocalisation plus rapide de la protéine ZO-1 à la membrane plasmique (Fig. 24). Dans le but de démontrer le caractère AMPK-dépendant de ce mécanisme, les auteurs ont travaillé sur des cellules MDCK exprimant une kinase inactive, par un effet dominant négatif, sous le contrôle de la doxycycline. Ils ont par la suite montré qu'en réponse à un calcium switch, le réassemblage des jonctions serrées était inhibé dans ces cellules, observé par un défaut dans l'établissement de la TEER, une augmentation de la perméabilité, et un retard dans la relocalisation de ZO-1 à la membrane plasmique. Cette étude suggère que le mécanisme d'action de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées pourrait impliquer la voie mTOR. En effet, le traitement des cellules exprimant le dominant négatif de l'AMPK avec la rapamycine, molécule inhibant mTOR, permet de rétablir le délai dans le réassemblage des jonctions serrées précédemment observé dans ces cellules (Zhang et al. 2006). Une autre étude publiée ultérieurement par ce même groupe a permis de mettre en évidence l'action de l'AMPK sur le complexe nectine-

afadine des jonctions adhérentes par un mécanisme indépendant du calcium. Cette étude montre que lorsque les cellules MDCK sont incubées dans un milieu sans calcium, l'activation de l'AMPK par l'AICAR favorise le réassemblage des jonctions serrées, il s'agit alors d'un mécanisme indépendant du calcium. Cependant, l'inactivation de l'afadine dans les cellules empêche ce réassemblage. Les auteurs ont ensuite démontré, d'une part, que l'afadine était une cible directe de l'AMPK et, d'autre part que la phosphorylation de l'afadine par l'AMPK permettait son association à ZO-1, favorisant ainsi le réassemblage des jonctions serrées (Zhang et al. 2011).

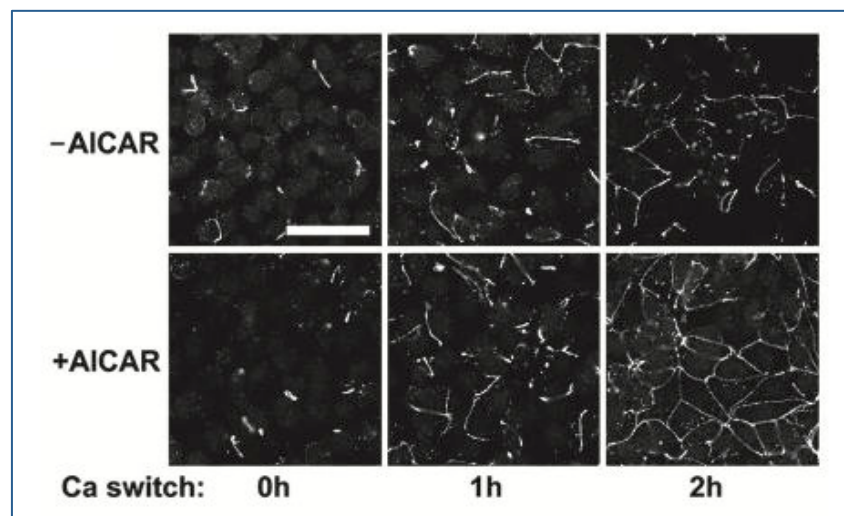


Figure 24 : Immunomarquage montrant la relocalisation de la protéine ZO-1 au cours du calcium switch en absence ou en présence d'AICAR dans les cellules MDCK.

La relocalisation de ZO-1 en réponse au calcium switch est étudiée aux temps 0h, 1h, et 2h en absence ou en présence d'AICAR. (D'après (Zhang et al. 2006)).

Ces résultats sur le rôle de l'AMPK dans les cellules MDCK ont été confirmés dans une étude menée par le laboratoire de Lewis Cantley (Zheng and Cantley 2007). Cette étude a montré de même qu'en réponse à un calcium switch, l'inactivation de l'AMPK, par l'expression d'une kinase inactive pour l'isoforme $\alpha 1$ retardait le réassemblage des jonctions serrées tandis que l'activation de l'AMPK par l'AICAR facilitait ce réassemblage dans les cellules MDCK. Cependant, ces auteurs ont montré que l'activation de l'AMPK dans le contexte du calcium switch dépendait de l'activité de LKB1. En effet, dans des cellules MDCK invalidées pour LKB1, l'activité de l'AMPK est fortement diminuée en réponse au calcium switch.

3.2) L'importance de l'AMPK au niveau des jonctions cellules-cellules dans différents tissus

Suite à la découverte du rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées au sein des cellules rénales, plusieurs études ont mis en évidence cette nouvelle fonction dans d'autres types de barrières en réponse à différents stress des cellules épithéliales ou endothéliales.

La barrière épithéliale pulmonaire

La barrière épithéliale au niveau pulmonaire peut être affectée lors d'une infection bactérienne, laquelle est aggravée en cas d'hyperglycémie. Un groupe s'est intéressé aux effets de la metformine sur l'épithélium pulmonaire dans un contexte combinant une infection au *Staphylococcus aureus* et une hyperglycémie dans des modèles *in vivo* et *in vitro*. Chez des souris diabétiques *db/db*, l'infection au *S. aureus* est plus sévère en comparaison avec des souris contrôles, ces premières souris présentent notamment une perméabilité épithéliale plus importante. Cependant, un pré-traitement à la metformine atténue l'infection et diminue la perméabilité. De manière similaire, sur les cellules H441, des cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine, l'infection au *S. aureus* combinée à une charge en glucose entraîne une diminution de la TEER et une augmentation de la perméabilité, tandis que la metformine restaure la barrière épithéliale. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme pourrait faire intervenir l'AMPK dans la mesure où les effets bénéfiques de la metformine sont inhibés par le composé C, un inhibiteur non sélectif de l'AMPK (Garnett et al. 2013). Dans une autre étude, le même groupe a approfondi le mécanisme d'action de la metformine dans les cellules H441. Lors d'une infection au *S. aureus*, les auteurs ont montré que, outre les défauts de TEER et de perméabilité, les protéines des jonctions serrées ZO-1 et occludine étaient délocalisées. Le traitement avec la metformine permet notamment de rétablir la localisation de l'occludine et induit la phosphorylation de cette dernière. Cependant le PSI, un inhibiteur de la protéine PKC ζ , inhibe la phosphorylation de l'occludine et sa localisation à la membrane plasmique suite au traitement à la metformine, sans pour autant affecter l'activité de l'AMPK. Ainsi les auteurs suggèrent que la metformine, via l'activation de l'AMPK, permettrait la phosphorylation de PKC ζ , qui à son tour

phosphorylerait l'occludine, assurant ainsi la localisation à la membrane (Kalsi et al. 2019).

La barrière hémato-encéphalique

Le rôle de la metformine a également été étudié au niveau de la barrière hémato-encéphalique. En effet, dans des cellules endothéliales de cerveau de rat RBECs, la metformine améliore l'intégrité de la barrière en augmentant la TEER et en diminuant la perméabilité ; ces résultats ont été confirmés avec l'utilisation de l'AICAR. Ces effets bénéfiques sont abolis en présence de l'inhibiteur de l'AMPK, composé C, laissant penser que l'AMPK interviendrait dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique. L'AMPK pourrait ainsi être utilisée comme cible thérapeutique dans le cadre des maladies du système nerveux central, lesquelles sont généralement associées à des altérations de la barrière hémato-encéphalique (Takata et al. 2013).

La barrière endothéliale vasculaire

Lors d'un choc septique, des dysfonctions cardiaques sont observées, notamment au niveau du ventricule gauche, et sont associées à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Chez la souris, ces effets cardiaques sont reproduits suite à un traitement au LPS. Une étude a démontré l'importance de l'AMPK dans la réduction de l'hyperperméabilité vasculaire cardiaque et la protection des jonctions serrées des cellules endothéliales. Tout d'abord, le traitement au LPS chez des souris invalidées pour l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK entraîne des symptômes aggravés. A l'inverse, l'utilisation de l'AICAR dans ce modèle d'endotoxémie induit une diminution de la perméabilité vasculaire chez les souris contrôles, ce qui n'est pas le cas chez les souris déficientes pour l'AMPK, démontrant ainsi un mécanisme AMPK-dépendant. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* dans des cellules endothéliales d'artère coronaire d'origine humaine HCAECs. Lorsque ces cellules sont incubées avec du LPS, un pré-traitement avec de l'AICAR diminue la perméabilité et atténue la déstabilisation de ZO-1, effets abolis dans des cellules invalidées pour l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK (Castanares-Zapatero et al. 2013).

La barrière hépatique

Une étude a suggéré que l'AMPK pourrait participer à la régénération hépatique via son action sur les jonctions serrées des hépatocytes. Chez des rats ayant subi une hépatectomie partielle, un pré-traitement par injection intraveineuse avec des acides gras oméga-3 assure une meilleure régénération du foie, associée à une augmentation de l'expression des protéines occludines, claudine-3, et ZO-1, et de leur localisation à la membrane dans des hépatocytes. Les auteurs ont montré que ces effets bénéfiques sur les protéines des jonctions serrées étaient corrélés à l'activation de la voie LKB1-AMPK, cependant aucun modèle génétique n'a été utilisé pour valider ce mécanisme d'action (Yan et al. 2011).

3.3) L'AMPK et la barrière épithéliale intestinale

De plus en plus d'études s'intéressent aux rôles de l'AMPK sur la santé intestinale. Tout d'abord, l'AMPK semble jouer un rôle à l'interface entre le microbiote et l'hôte. Plusieurs études menées sur les cellules intestinales Caco-2, issues d'un adénocarcinome de côlon humain, ont montré que des acides gras à courte chaîne produits par les bactéries commensales de l'intestin renforçaient l'intégrité de la barrière via l'activation de l'AMPK. De plus, d'autres études suggèrent un rôle plus général de l'AMPK au niveau de l'épithélium intestinal, dans les processus d'absorption et dans la réduction de l'inflammation et de la tumorigenèse. Ainsi, dans cette sous-partie, nous décrivons les différents rôles de l'AMPK dans le maintien de l'homéostasie de la barrière intestinale.

3.3.1) Maintien et réassemblage des jonctions serrées

Le rôle de l'AMPK et les bénéfices de son activation dans le maintien de la barrière épithéliale intestinale ont été étudiés par des approches nutritionnelle, pharmacologique, et génétique.

Activation de l'AMPK par les acides gras à chaîne courte

Les acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate, acétate) sont issus de la fermentation bactérienne des fibres alimentaires non digérées dans le petit intestin. Ils sont bénéfiques pour l'intégrité de la barrière grâce à des effets anti-inflammatoires et à la modulation du stress oxydatif. Suite aux résultats prometteurs de l'implication de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées dans les MDCK, une première étude s'est intéressée aux mécanismes d'action du butyrate sur l'épithélium intestinal des cellules Caco-2, et a notamment investigué son interaction avec les jonctions serrées et l'AMPK. Tout d'abord, en condition basale, les auteurs ont confirmé que le butyrate renforçait la barrière intestinale en augmentant la TEER et en diminuant la perméabilité paracellulaire. De manière intéressante, ces effets du butyrate étaient associés à une augmentation de l'activité de l'AMPK. Suite à une altération de l'épithélium induit par une expérience de calcium switch, le butyrate favorise également le réassemblage des jonctions serrées et assure une relocalisation plus rapide des protéines ZO-1 et occludine à la membrane. Ces effets sont comparables à ceux de l'AICAR et ils sont inhibés en présence du composé C, suggérant l'implication de l'AMPK dans ces processus (Peng et al. 2009). Des résultats similaires sur le rôle bénéfique des acides gras à chaîne courte sur la barrière intestinale ont été obtenus dans d'autres modèles (Gonzalez et al. 2019, Wang et al. 2019). En particulier, dans un contexte de dégradation de l'épithélium induite par l'éthanol, un pré-traitement des cellules Caco-2 avec le butyrate, l'acétate, ou encore le propionate, atténue la désorganisation des jonctions serrées, de l'actine F, ainsi que la génération de ROS. Afin de mettre en évidence un rôle potentiel de l'AMPK dans ce mécanisme, les auteurs ont montré que les effets des acides gras à chaîne courte étaient diminués en présence du composé C, et en effectuant un « small interfering RNA » (siRNA) ciblant l'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK (Elamin et al. 2013). Toutefois, les résultats issus de l'utilisation du composé C sont à analyser avec précaution puisqu'il n'est pas spécifique de l'AMPK (Bain et al. 2007, Vogt et al. 2011, Dite et al. 2018). De plus, un siRNA pour l'isoforme $\alpha 2$ n'induit qu'une invalidation partielle de l'AMPK car les deux isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont exprimées dans les Caco-2 (Harmel et al. 2014, Olivier et al. 2019). Plus récemment, des pistes mécanistiques pour l'action de l'AMPK dans les Caco-2 ont été investiguées. En effet, un traitement des cellules avec le butyrate de sodium favorise le réassemblage des jonctions serrées suite à une expérience de calcium

switch, qui est corrélé à l'activation de l'AMPK. Les auteurs ont notamment mis en évidence une diminution de la phosphorylation de MLC2 suite au traitement, ce qui suggère que l'AMPK pourrait réguler de manière négative la MLCK, cette dernière permettant la phosphorylation de MLC2. De plus, l'activation de l'AMPK dans ce modèle est également associée à l'augmentation de la phosphorylation de PKC β 2 (Miao et al. 2016).

Activation de l'AMPK par des molécules naturelles issues des plantes

Des études récentes ont évalué les effets de composés naturels issus des plantes sur l'activation de l'AMPK et le renforcement de la barrière intestinale dans des modèles *in vivo* et *in vitro* (Xu et al. 2017, Chi et al. 2018, Zhou et al. 2018). Dans les cellules intestinales Caco-2, les théaflavines, qui appartiennent à la famille des polyphénols et essentiellement présentes dans le thé noir, exercent un effet bénéfique sur l'intégrité de la barrière épithéliale. Elles diminuent notamment la perméabilité paracellulaire et augmentent les niveaux d'expression protéique de ZO-1, de l'occludine et de la claudine-1, potentiellement via l'activation de l'AMPK (Park et al. 2015). Chez la souris, il a été montré qu'un régime enrichi avec des framboises rouges, riches en anthocyanosides qui ont des propriétés anti-inflammatoires, permettait d'atténuer la colite induite par le Dextran Sulfate Sodium (DSS). En effet, les auteurs ont montré que ce régime limitait l'inflammation des souris en diminuant la voie NF- κ B et l'expression de cytokines pro-inflammatoires. De plus, ce régime présentait également un effet bénéfique sur les protéines des jonctions serrées, puisqu'il diminuait l'expression de la claudine-2, connue pour réguler de manière positive la perméabilité paracellulaire, et augmentait l'expression de la claudine-3 et de ZO-1 (Bibi et al. 2018). Une étude a également montré que la metformine, connue pour être un activateur indirect de l'AMPK, protégeait la barrière intestinale de souris traitées avec du LPS. Les auteurs ont notamment mis en évidence que la metformine permettait d'une part, la diminution de la voie NF- κ B, et d'autre part, l'augmentation des protéines des jonctions serrées ZO-1, occludine, et claudine-1 (Wu et al. 2018).

Effets de la délétion de l'AMPK intestinale chez la souris

L'importance de l'AMPK dans le maintien de la barrière intestinale a également été évaluée *in vivo* dans un modèle de souris génétiquement modifiées. L'invalidation de l'isoforme $\alpha 1$ spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris induit une altération de la barrière intestinale observée par une augmentation de la perméabilité paracellulaire et une désorganisation de la protéine ZO-1 au sein du jéjunum. Dans le cadre d'une colite induite par le DSS, les souris invalidées pour l'AMPK présentent davantage de défauts au niveau de la barrière intestinale par rapport aux souris contrôles. Les auteurs associent les altérations de la barrière intestinale à un défaut de différenciation des cellules intestinales chez ces souris. En effet, le développement des jonctions serrées s'effectue lors du processus de différenciation, or il a été montré que l'AMPK stimulait l'expression de CDX2, lequel intervient dans la régulation du lignage des cellules épithéliales intestinales (Sun et al. 2017). Dans notre laboratoire, nous avons confirmé ce rôle de l'AMPK chez des souris invalidées pour les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans l'épithélium intestinal, mais plus spécifiquement au niveau du côlon distal. Nous détaillerons ces données dans la partie résultats de ce manuscrit.

Des cibles directes de l'AMPK ?

Toutefois, les cibles directes de l'AMPK dans le processus de renforcement de la barrière intestinale restent encore à élucider. La cinguline et la girdine (GIV), impliquées dans la régulation des jonctions serrées, ont été décrites dans la littérature comme des cibles phosphorylables de l'AMPK (Yano et al. 2013, Ducommun et al. 2015, Aznar et al. 2016). D'une part, la cinguline est localisée au niveau des jonctions serrées et interagit avec ZO-1 et les microtubules. Cette protéine a été découverte comme étant un substrat de l'AMPK par une approche de protéomique menée dans des hépatocytes de souris. Suite à ce résultat, l'expression de la cinguline a été étudiée dans plusieurs lignées cellulaires, et il a notamment été montré que l'activation de l'AMPK par le composé 991 permettait la phosphorylation de la cinguline dans les cellules intestinales Caco-2 (Ducommun et al. 2015). Son rôle a également été démontré dans les cellules épithéliales mammaires de souris Eph4, où il serait dépendant de l'AMPK (Yano et al. 2013) (Fig. 25). D'autre part, la GIV joue un rôle important dans la polarité cellulaire et dans les jonctions intercellulaires dans la mesure où elle est capable de se lier à Par3 et

aux complexes cadhérine-caténine. Une étude a montré que cette protéine présentait le site consensus de phosphorylation par l'AMPK, puis a confirmé la capacité de l'AMPK à phosphoryler la GIV dans les cellules rénales Cos7. Les auteurs ont notamment montré qu'en cas de stress affectant la barrière épithéliale des cellules rénales MDCK, l'AMPK induisait la phosphorylation de la GIV et sa localisation à la membrane plasmique, permettant ainsi de renforcer les jonctions serrées (Aznar et al. 2016). Ainsi, il serait particulièrement intéressant d'étudier les rôles de la cinguline et de la GIV dans le processus de réassemblage des jonctions serrées par l'AMPK au niveau de l'épithélium intestinal.

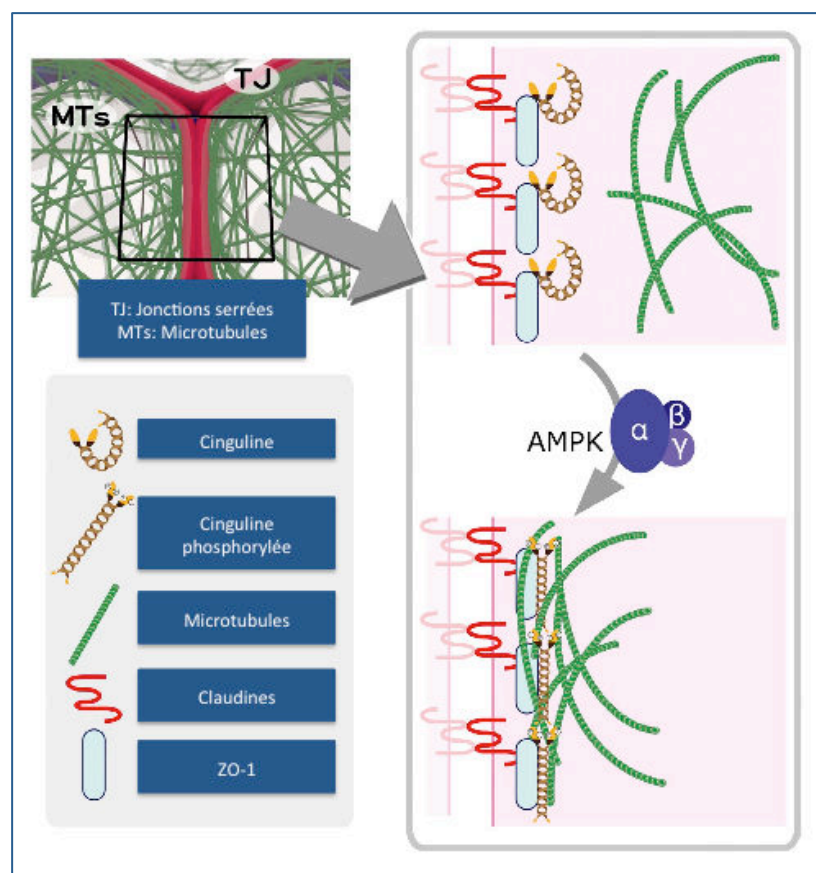


Figure 25 : *L'AMPK favorise l'assemblage des jonctions serrées via la phosphorylation de la cinguline dans les cellules Eph4.*

Une fois phosphorylée, la cinguline permet de relier les protéines des jonctions serrées aux microtubules. (D'après (Yano et al. 2013)).

3.3.2) Polarité cellulaire et tumorigenèse

Plusieurs études ont étudié la relation entre le cancer colorectal et la phosphorylation de l'AMPK (Baba et al. 2010, Khabaz et al. 2019). Toutefois, les liens entre la phosphorylation de l'AMPK et les paramètres clinico-pathologiques ne sont pas encore bien établis.

Des études suggèrent toutefois le rôle anti-tumoral de l'AMPK au niveau intestinal. Nous avons précédemment décrit les résultats sur la régulation positive de CDX2 par l'AMPK (Sun et al. 2017) ; cette étude émet l'hypothèse que l'activation de l'AMPK pourrait inhiber le développement du cancer colorectal. En effet, le facteur de transcription CDX2, que nous avons décrit pour son rôle dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales, présente également une fonction anti-tumorale. L'étude histologique d'échantillons prélevés chez des patients atteints de cancer colorectal ou chez le rat dans un modèle de carcinogenèse a révélé une diminution de l'expression de CDX2 dans les zones tumorales (Ee et al. 1995). Le rôle anti-tumoral de CDX2 a été démontré dans un modèle de souris hétérozygotes pour le gène *Cdx2*. En effet, un traitement avec l'azoxyméthane (AOM), qui est un composé cancérigène, entraîne le développement de tumeurs au niveau du côlon distal chez les souris hétérozygotes tandis qu'aucune tumeur n'est observée chez les souris contrôles (Bonhomme et al. 2003). De même, des souris mutées pour le gène APC, qui développent des tumeurs intestinales de manière spontanée, présentent une diminution de l'expression de CDX2 au sein des polypes situés dans le côlon. Lorsque ces mêmes souris sont également hétérozygotes pour le gène *Cdx2*, elles développent des polypes de taille beaucoup plus importantes par rapport aux souris uniquement mutées pour APC (Aoki et al. 2003).

De plus, le rôle de l'AMPK dans le maintien de la polarité des cellules épithéliales inhiberait le développement de la tumorigenèse, en plus de ses propriétés anti-inflammatoires que nous détaillerons par la suite. Des modèles génétiques ont permis de valider cette fonction. D'une part, des mutations de LKB1 atténuent son action sur l'AMPK et entraîne une altération de la polarité cellulaire, ce qui favorise le développement tumoral (Forcet et al. 2005). D'autre part, l'inactivation de l'AMPK chez la drosophile, laquelle est d'ailleurs létale pour cet organisme, induit de graves altérations de la polarité cellulaire (Lee et al. 2007).

3.3.3) L'inflammation

Comme nous l'avons décrit dans la première partie de ce chapitre introductif, l'AMPK exerce également des fonctions anti-inflammatoires (Salt and Palmer 2012), de ce fait l'AMPK joue un rôle important dans le contexte des maladies inflammatoires de l'intestin.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, sont associées à des altérations de la barrière intestinale. Un modèle de colite chez la souris induite par un traitement au DSS, qui a pour but de mimer les maladies inflammatoires intestinales, a révélé une diminution des niveaux d'activité de l'AMPK au cours du traitement. Partant de ce constat, les auteurs de l'étude ont étudié l'effet de l'activation de l'AMPK par la metformine. Le traitement par la metformine atténue les effets du DSS en diminuant l'inflammation au niveau du côlon et en restaurant les niveaux d'expression des protéines des jonctions ZO-1, claudine-1 et occludine. En présence du composé C, ces effets sont abolis. Ainsi, cette étude suggère que la metformine pourrait exercer ses effets bénéfiques sur la restauration de la barrière intestinale via l'activation de l'AMPK et son action sur les jonctions serrées (Chen et al. 2018). Dans un autre modèle murin de colite induite par le « 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid » (TNBS), le rôle anti-inflammatoire de l'AMPK a été étudié. En effet, chez les souris présentant une colite, un traitement avec l'AICAR atténue la pathologie et diminue notamment la réponse inflammatoire, observée par une moindre infiltration des cellules inflammatoires dans la muqueuse intestinale associée à une diminution des cytokines TNF et « Interferon gamma » (IFN γ). L'AICAR permet également l'inhibition de la voie NF- κ B dans les macrophages. Les auteurs associent les effets de l'AICAR à l'AMPK, toutefois d'autres études sont nécessaires pour confirmer que ces mécanismes sont bien AMPK-dépendants (Bai et al. 2010). Une autre étude a démontré les effets bénéfiques de la metformine sur le renforcement de la barrière intestinale dans des conditions inflammatoires. En effet, la metformine permet *in vivo* de diminuer l'inflammation intestinale chez des souris invalidées pour l'IL10, laquelle est une cytokine anti-inflammatoire, et *in vitro* de réassembler les jonctions serrées dans les cellules Caco-2 suite à l'altération de la barrière épithéliale avec du TNF α . La metformine est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, qui ne sont pas nécessairement

AMPK-dépendants, mais les auteurs de l'étude suggèrent qu'une partie de ses effets dépendent de l'activation de l'AMPK (Xue et al. 2016).

3.3.4) Les fonctions d'absorption

Au delà de ses fonctions structurales au sein de l'épithélium digestif, l'AMPK participe également aux processus d'absorption, rôles caractéristiques des entérocytes. Bien que cette fonction soit peu décrite dans la littérature, quelques études ont mis en évidence un rôle de l'AMPK dans l'absorption de glucose et la sécrétion des ions chlorures.

La stimulation de l'absorption de glucose par l'AMPK a notamment été étudiée dans le muscle, mais l'AMPK semble également réguler les transporteurs des glucides au niveau intestinal. Selon l'état nutritionnel, différents types de transporteurs interviennent dans l'absorption des glucides. En effet, en état pré-prandial, le glucose entre dans la cellule grâce au « co-transporteur sodium-glucose 1 » (SGLT1), tandis que pendant la période prandiale le transporteur GLUT2 devient actif au niveau apical, assurant ainsi une meilleure absorption du glucose et du fructose. Le transporteur GLUT5 permet également le transport du fructose. Lorsque les glucides alimentaires sont entrés dans la cellule, ceux-ci en ressortent via le transporteur GLUT2 localisé au niveau basolatéral (Fig. 26). L'étude du lien entre AMPK et transporteurs de glucides a été réalisée grâce à l'utilisation d'un modèle de souris invalidées pour l'isoforme $\alpha 2$. Chez ces souris, bien que ne présentant pas de défauts majeurs au niveau histologique, les niveaux de GLUT2 et de GLUT5 étaient diminués tandis que les niveaux de SGLT1 étaient augmentés par rapport aux souris contrôles. Cela suggère que l'AMPK pourrait stimuler l'absorption de glucides par GLUT2 et GLUT5, et régulerait de manière négative le transporteur concurrent SGLT1 (Sakar et al. 2009). Une autre étude suggère que l'AICAR et la metformine, via l'activation de l'AMPK, permettraient de stimuler l'absorption intestinale de glucose en augmentant la distribution de GLUT2 au niveau apical, et en diminuant l'expression de SGLT1 (Walker et al. 2005). De plus, l'AMPK semble inhiber la sécrétion des ions chlorures par le canal « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (CFTR) au niveau intestinal. En effet, chez le rat, l'AICAR et la metformine assurent la diminution du flux d'ions chlorures, qui est stimulé de façon excessive en réponse à la toxine cholérique et qui induit des diarrhées

(Walker et al. 2003, Rogers et al. 2013). De plus, il a été montré que le flux d'ions chlorures dépendant de CFTR était augmenté chez des souris invalidées pour l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK (Kongsuphol et al. 2009). Par ailleurs, de manière indirecte, l'AMPK joue également sur les fonctions d'absorption par son action sur le péristaltisme intestinal. Une étude menée chez la drosophile a démontré que l'AMPK jouait un rôle majeur dans son développement en agissant sur l'absorption des nutriments. Des drosophiles invalidées pour l'AMPK présentent des taux de triglycérides très bas associés à une altération de la fonction absorbative. Les auteurs ont notamment montré que ces défauts étaient liés à une altération du péristaltisme intestinal, et suggèrent que l'AMPK pourrait ainsi réguler les muscles viscéraux (Bland et al. 2010).

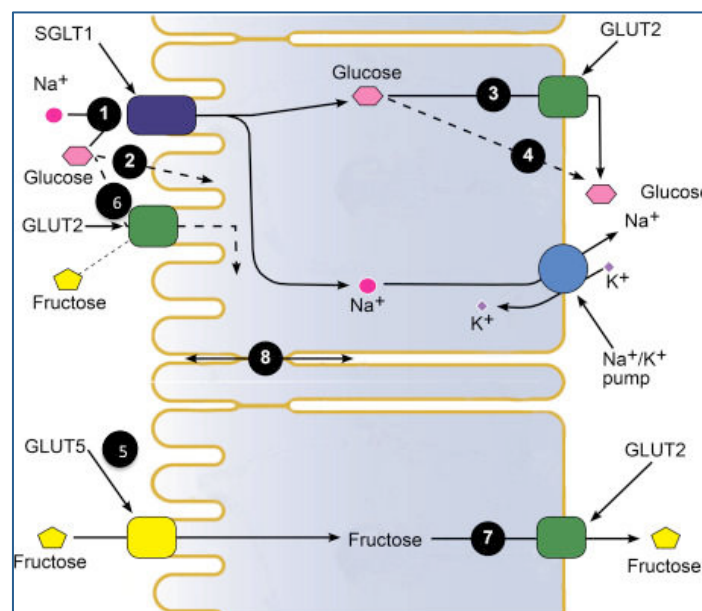


Figure 26 : L'absorption du glucose et du fructose au niveau des entérocytes.

1) Entrée du glucose par le co-transporteur SGLT1, 2) diffusion du glucose à travers la membrane plasmique, 3) sortie du glucose par le transporteur GLUT2, 4) sortie du glucose par diffusion à travers la membrane plasmique, 5) entrée du fructose par le transporteur GLUT5, 6) entrée du fructose par le transporteur GLUT2, 7) sortie du fructose par le transporteur GLUT2, 8) passage des sucres par la voie paracellulaire. (D'après Wright E.M. et al., 2012).

Objectifs

La barrière épithéliale intestinale constitue une barrière physique protégeant l'organisme de l'environnement extérieur. Les cellules épithéliales, organisées en monocouche, sont étroitement liées entre-elles grâce au réseau des protéines intercellulaires ; ce sont notamment les jonctions serrées qui régulent la perméabilité paracellulaire. Des phénomènes d'hyperperméabilité, associés à une déstabilisation des jonctions serrées et à une augmentation de l'inflammation, sont constatés dans certaines maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou l'obésité (Mankertz and Schulzke 2007, Cani et al. 2008, Genser et al. 2018). Ainsi, le renforcement des jonctions serrées apparaît comme une stratégie thérapeutique pour limiter les conséquences pathologiques d'une hyperperméabilité dans ces maladies.

Outre son rôle métabolique dans le maintien de la balance énergétique cellulaire, l'AMPK intervient également dans l'assemblage des jonctions serrées. Cette fonction a été démontrée dans les cellules rénales MDCK (Zhang et al. 2006, Zheng and Cantley 2007), et a ensuite été étudiée dans d'autres épithélia. Quelques études ont notamment montré que certains acides gras à chaîne courte, tels que le butyrate, favorisaient le réassemblage des jonctions serrées via l'activation de l'AMPK dans des cellules épithéliales intestinales (Peng et al. 2009, Elamin et al. 2013). De manière plus générale, l'intérêt d'un ciblage de l'AMPK pour améliorer la santé intestinale est grandissant (Sun and Zhu 2017). Toutefois d'autres études sont nécessaires pour préciser son rôle dans la régulation de la barrière épithéliale intestinale, et valider son potentiel thérapeutique pour restaurer l'intégrité de la barrière dans un contexte pathologique.

Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient 1) de définir le rôle physiopathologique de l'AMPK au niveau de la barrière intestinale, et notamment d'analyser les conséquences de son invalidation dans différents modèles pathologiques, et 2) d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'AMPK en utilisant des activateurs pharmacologiques dans nos différents modèles d'étude.

Pour répondre à ces problématiques, nous avons travaillé sur des modèles *in vitro* et *in vivo* invalidés pour l'AMPK intestinale. Un modèle murin invalidé pour l'AMPK spécifiquement au niveau des cellules épithéliales intestinales avait déjà été obtenu avant le début de ma thèse, et nous avons généré un modèle de cellules intestinales

Caco-2 invalidées pour l'AMPK par la technique CRISPR/Cas9 au cours de ma thèse. Sur ces deux modèles, nous avons induit des altérations de la barrière intestinale. D'une part, chez la souris nous avons travaillé sur des modèles d'obésité et de colite, et sur les cellules Caco-2 nous avons mené des expériences de calcium switch. Afin d'évaluer les effets de l'activation pharmacologique de l'AMPK dans ces modèles, nous avons utilisé la metformine dans le modèle de colite, et le composé 991 dans les cellules intestinales Caco-2.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont présentés en deux parties, l'une portant sur le modèle cellulaire, et l'autre sur le modèle animal. D'une part, les résultats *in vitro* ont permis la publication de deux articles, lesquels sont intégrés au sein de cette partie. Le premier article traite de la méthodologie utilisée pour la génération des cellules Caco-2 invalidées pour l'AMPK par le système CRISPR/Cas9 et a été publié dans *Methods in Molecular Biology* en 2018. Le second article, publié dans *International Journal of Molecular Sciences* en 2019, porte sur le rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées dans les cellules Caco-2. D'autre part, les résultats *in vivo* présentés dans cette partie, portant sur le rôle de l'AMPK dans les modèles d'obésité et de colite, feront l'objet d'une publication future.

De plus, dans le cadre de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à l'écriture d'une revue dans *Biochemical Pharmacology* sur le mode d'action des activateurs directs de l'AMPK. Cette revue est présentée en annexe de ce manuscrit.

Matériels & Méthodes

Les protocoles pour les expériences non publiées dans les articles inclus dans ce manuscrit de thèse sont présentés dans cette section.

Souris

Les protocoles ont été approuvés par le comité éthique de l'expérimentation animale n°034 de l'Université Paris Descartes (CEEA34.BV.157.12 et APAFIS#14911-2017120813494332 v5), et appliqués sous l'autorisation française d'expérimenter sur les vertébrés (75-886) en accord avec les directives européennes. Les expériences ont été menées sur des souris de fond génétique C57BL6J. Les souris invalidées pour l'AMPK au niveau des cellules épithéliales intestinales ont été obtenues par le croisement de souris Villin-Cre ou Villin-Cre-ERT2 (el Marjou et al. 2004) et de souris AMPK $\alpha 1^{fl/fl}/\alpha 2^{fl/fl}$ (Boudaba et al. 2018). Nous avons donc travaillé avec une lignée constitutive et une ligne inductible pour la délétion de l'AMPK intestinale. La délétion de l'AMPK dans la lignée inductible a été induite par alimentation des souriceaux au moment du sevrage avec un régime contenant du citrate de tamoxifène (400 mg/kg) (Ssniff) sur une période de 5 jours, puis par injection en intrapéritonéale (1 mg tamoxifène/souris) 3 jours de suite lorsque les souris étaient âgées de 1 mois.

Régimes

Des souris mâles âgées de 1 à 2 mois ont été nourries avec un régime contrôle (70 kJ% glucides, 20 kJ% protéines, 10 kJ% lipides ; D12450) ou un régime gras (21 kJ% glucides, 19 kJ% protéines, 60 kJ% lipides ; D12492) (Ssniff). Les souris de la lignée constitutive ont été nourries sur une période de 10 semaines, et les souris de la lignée inductible sur une période de 16 semaines.

Traitements au DSS et à la metformine

Nous avons traité des souris femelles âgées de 2 à 3 mois de la lignée constitutive avec du DSS (Thermo Fisher Scientific) dilué dans l'eau de boisson (2,5%) pendant une période de 5 jours, puis les souris ont été abreuvées avec de l'eau uniquement pendant

une période de 4 à 6 jours. Dans le cadre du traitement avec la metformine, après arrêt du traitement DSS, nous avons traité les souris avec de la metformine diluée dans l'eau de boisson (10 mg/mL) pendant une période de 5 jours.

Mesures de perméabilité paracellulaire in vivo et ex vivo

Pour la perméabilité *in vivo*, les souris ont été gavées avec 100 µL d'une solution de carboxyméthylcellulose 0,5% contenant 200 mg/mL de dextran (4 kDa) couplé au TRITC ou au FITC (TDB), et/ou 10 mg/mL d'acide sulfonique (0,4 kDa) couplé au FITC (Thermo Fisher Scientific). A 1h et 4h après le gavage, le sang a été collecté à partir de la queue, et le plasma a été utilisé pour mesurer la quantité de fluorescence, reflet de la perméabilité paracellulaire, à l'aide du lecteur de plaques FLUOstar Omega (BMG Labtech).

La perméabilité *ex vivo* des différents segments de l'intestin (jéjunum, iléon, côlon proximal, et côlon distal) a été analysée en chambres de Ussing (Physiological Instruments) dans l'unité de recherche TENS à Nantes, et au Centre de Recherche des Cordeliers à Paris. Chaque chambre contient 2 mL de milieu de culture (DMEM F12 avec 20 mg/mL de dextran couplé au FITC) maintenus à 37°C avec 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Après 30min d'équilibrage, 200 µL de milieu apical sont remplacés par 200 µL de dextran 4 kDa couplé au FITC. Le niveau de fluorescence dans des aliquots de 150 µL de milieu basolatéral a été mesuré toutes les 30min, sur une période de 3h à l'aide d'un lecteur de plaque Varioskan (Thermo Fisher Scientific).

Mesures des paramètres métaboliques

- Composition corporelle

La composition corporelle (masse grasse et masse maigre) des souris a été évaluée par résonance magnétique nucléaire (RMN) en utilisant le Minispec LF90II (Bruker).

- Test de tolérance au glucose

Après une période de jeûne de 6h, les souris ont été gavées avec une solution de glucose (1 g/kg). La glycémie a été mesurée avec un glucomètre à partir d'échantillons de sang prélevés à la queue aux temps 0min, 20min, 40min, 60min, 80 min, et 100min après gavage au glucose.

- Test de sensibilité à l'insuline

Les souris ont été injectées avec de l'insuline (0,5 U/kg) par voie intrapéritonéale. La glycémie a été mesurée avec un glucomètre à partir d'échantillons de sang prélevés à la queue aux temps 0min, 15min, 30min, 45min, 60min, et 90min après injection d'insuline.

Histologie

Après sacrifice des souris par dislocation cervicale, l'intestin a été récupéré, découpé dans le sens de la longueur, lavé avec du PBS, et roulé de la partie proximale vers la partie distale pour former un « swiss roll ». Les tissus ont ensuite été fixés au formol 10% sur la nuit à 4°C, puis ont été inclus en paraffine. Une coloration hématoxyline/éosine a été réalisée sur des coupes de 3 µm.

Isolement des cellules épithéliales intestinales et de la lamina propria

Après sacrifice des souris par dislocation cervicale, l'intestin a été récupéré et lavé avec de l'HBSS sans Ca²⁺ et Mg²⁺. Les cellules épithéliales intestinales et les cellules de la lamina propria ont été isolées avec le kit Lamina Propria Dissociation (Miltenyi) selon le protocole conseillé par le distributeur.

Préparation des ARNm et RT-PCR quantitative en temps réel

L'ARN total à partir des segments d'intestin de souris a été extrait avec du Trizol (Invitrogen), puis les ADNc ont été synthétisés avec la Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) selon les protocoles conseillés par les distributeurs. Les PCRq ont été effectuées sur un Light Cycler 480 (Roche) à l'aide du kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) selon le protocole conseillé par le distributeur. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés au niveau d'expression de RPS6. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivants :

- IL6
F : 5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3'
R : 5'-AGTCTCCTCTCCGGACTTGT-3'
- TNF α
F : 5'-AGCCCCAGTCTGTATCCTT-3'
R : 5'-CTCCCTTTGCAGAACTCAGG-3'
- IL1 β
F : 5'-GCCTCGTGCTGTCCGACCCATA-3'
R : 5'-TTGAGGCCCAAGGCCACAGGT-3'
- ZO-1

F : 5'-AAGAATATGGTCTTCGATTGG-3'
R : 5'-ATTTTCTGTACAGTACCATTTATCTTC-3'

- Occludine

F : 5'-ATGTCCGGCCGATGCTCTC-3'
R : 5'-TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT-3'

- RPS6

F : 5'-CCAAGCTTATTCAGCGTCTTGTTACTCC-3'
R : 5'-CCCTCGAGTCCTTCATTCTCTTGGC-3'

Etude des populations de cellules immunes dans le côlon et le tissu adipeux

Après sacrifice des souris par dislocation cervicale, le côlon et le tissu adipeux viscéral ont été récupérés. Pour le côlon, la dissociation de la lamina propria a été effectuée selon le protocole décrit précédemment. Les tissus de côlon et le tissu adipeux ont ensuite été incubés avec des solutions de digestion (RPMI, collagénase IV, DNase I pour le côlon, et RPMI, libérase, collagénase D, DNase I). Les tissus digérés ont ensuite été filtrés sur tamis avec du PBS 1X-SNN 3%. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 3 mL de PBS 1X. Les suspensions de cellules ont été soumises à gradient de densité Percoll de 40% et 80%, puis les lymphocytes à l'interface des deux phases ont été récupérés, et resuspendus dans du PBS 1X-SNN 3%. Pour le marquage des cellules, les anticorps suivants ont été utilisés : 24G2, CD45, CD3, CD11b, CD4, CD8, CD19, NKp46, Foxp3, Ly6G, CMH2, CD11c, Ly6C, et F4/80. L'acquisition au cytomètre a été effectuée au CIMI à Paris.

Cette expérience a été menée en collaboration avec Jordane Divoux, CIMI, Paris

Analyse du microbiote

Les fèces des souris ont été récupérées sur des animaux vivants directement à la sortie de l'anus, puis ont été congelées à -80°C. L'extraction de l'ADN à partir des fèces a été effectuée avec le kit ZymoBIOMICS DNA (Zymo) selon le protocole conseillé par le distributeur. L'analyse 16S a ensuite été réalisée par Noémie Daniel et Thibaut Varin à l'université de Laval, Québec.

Western blot

Les tissus ont été homogénéisés au TissueLyser (QIAGEN) avec des billes en présence d'un tampon de lyse contenant du 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,4, 1 mM DTT, 10 % glycérol, et des inhibiteurs de protéase

(Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) et de phosphatase (Pierce phosphatase inhibitor, ThermoFisher). Les homogénats ont été soumis à la sonification, puis les extraits protéiques ont été récupérés après centrifugation. La quantité de protéines a été évaluée avec le kit BCA (Thermo Fisher Scientific). Les protéines (20 µg) ont été séparées par SDS-PAGE dans des gels de polyacrylamide pré-coulés (Biorad), puis les bandes ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (Biorad). La coloration au rouge Ponceau a permis de valider les quantités de protéines déposées. Le blocage de la membrane a été effectué avec du TBS contenant du NP40 0,2% et du lait écrémé en poudre 5% pendant 30min à température ambiante. L'AMPK α totale et phosphorylée (Thr172), et l'ACC totale et phosphorylée (Ser79) ont été révélées par immunomarquage. La beta-actine a été utilisée comme témoin de charge. Les incubations des membranes avec les anticorps primaires (Cell Signaling Technology) et secondaires ont été réalisées selon les procédures classiques, et les signaux ont été détectés par des réactifs chimiluminescents (Thermo Scientific) en utilisant la machine ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Etude du profil des activités kinases avec les puces PamGene

- Préparation des échantillons protéiques

Les cellules Caco-2 ont été cultivées pendant 21 jours sur plaques. Les cellules ont été lavées avec du milieu sans calcium Minimum Essential Medium (SMEM), puis ont été incubées avec du SMEM enrichi en SVF 3% pendant 16h. Une fois le SMEM enlevé, les cellules ont été lavées avec du MEM, puis les cellules ont été incubées avec du MEM avec ou sans 991 (10 µM). Au bout de 30min, les cellules ont été lysées sur glace avec un tampon de lyse contenant 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,4, 1 mM DTT, 10 % glycérol, et des inhibiteurs de protéase (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) et de phosphatase (Pierce phosphatase inhibitor, ThermoFisher). Les lysats ont été centrifugés pendant 15min à 10 000 g à 4°C, puis les échantillons ont été congelés sur carboglace et stockés à -80°C. Les concentrations protéiques ont été évaluées avec le kit BCA (Thermo Fisher Scientific).

- Profil de l'activité des kinases

Le profil a été déterminé en utilisant le système PamGene (PamGene International B.V., Pays-Bas), des puces PamChip sérine/thréonine (STK), et la machine PamStation12. Les puits des puces ont d'abord été incubés avec de la BSA 2% diluée dans de l'eau pendant

30 cycles (15min). Les puits ont ensuite été lavés avec un tampon (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,01% Brij35). Les mélanges réactionnels contenant 0,01 % de BSA dans le tampon de lyse ont été enrichis avec les anticorps anti-phospho Ser/Thr (PamGene International BV), dans un volume de 40 µL avec une quantité protéique de 10 µg par puits. La réaction a été initiée avec de l'ATP (concentration finale 400 µM). Les mélanges ont été déposés sur les puits, puis les échantillons ont été pompés à travers la membrane poreuse pendant 60 cycles (60min). Les puces ont été lavées et incubées avec un anticorps secondaire (polyclonal de porc anti-lapin Immunoglobuline/FITC) pendant 30min. Des images des puits aux temps d'exposition 10, 50, et 200msec ont été prises toutes les 5min avec un système optique combiné au logiciel Evolve (PamGene International BV). L'anticorps secondaire a été enlevé, et les puits ont été lavés et des images ont été prises aux temps d'exposition 20, 50, 100 et 200msec.

Les intensités des signaux de fluorescence, et le profil des kinases ont été analysés avec le logiciel BioNavigator (PamGene International BV).

Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD ou SEM. Les groupes ont été comparés par *t*-test de Student non-apparié bilatéral et par test ANOVA à un facteur pour les comparaisons multiples quand cela était approprié. Les différences entre les groupes étaient considérées comme significatives quand $P < 0,05$.

Résultats

1) Rôle de l'AMPK dans la régulation des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales Caco-2

1.1) Génération des cellules Caco-2 invalidées pour l'AMPK

Le premier article présenté dans cette partie a été publié dans *Methods in Molecular Biology* en 2018 (Grenier et al. 2018).

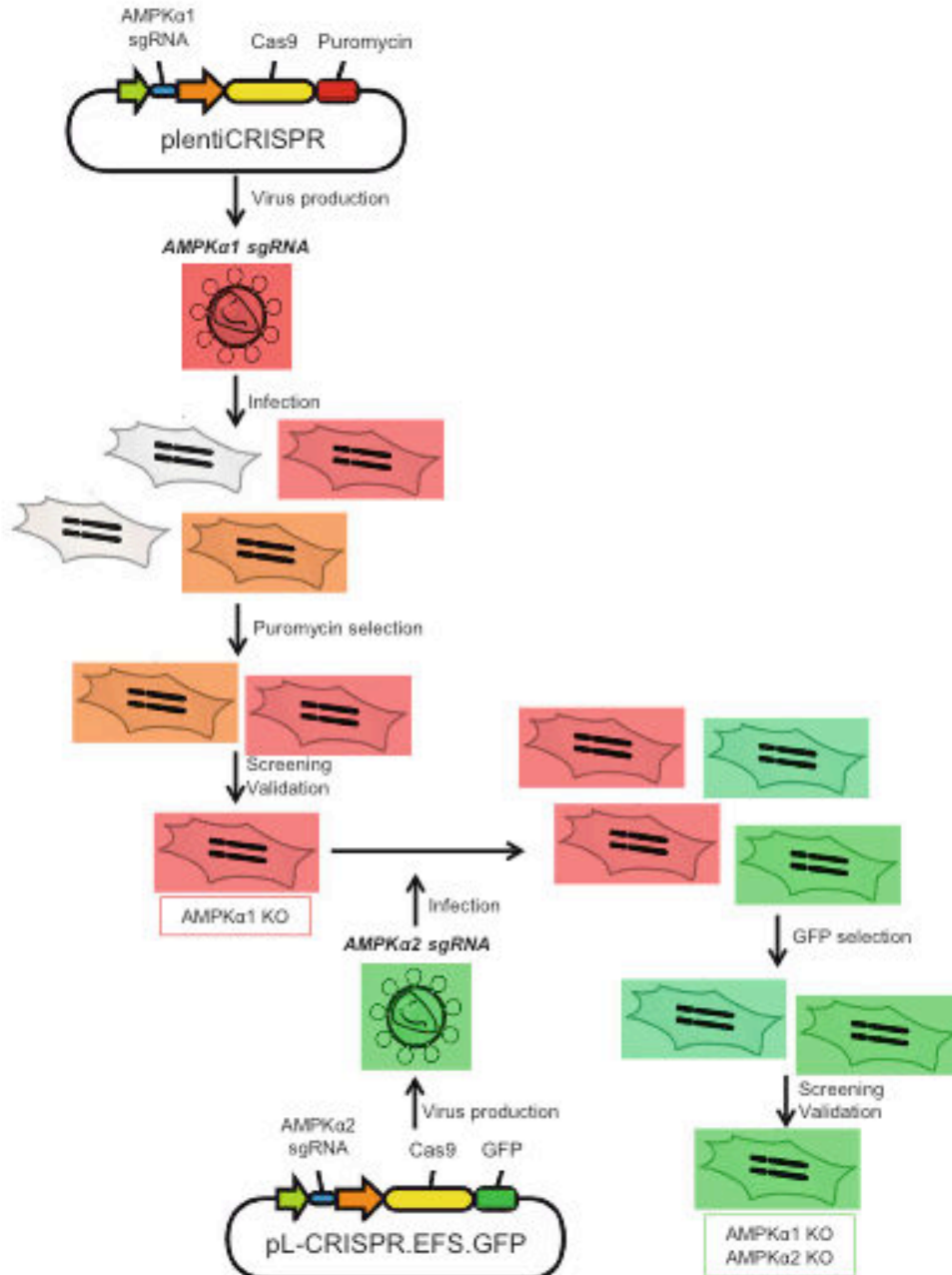
Nous avons généré des cellules Caco-2 invalidées pour l'AMPK par la technologie CRISPR/Cas9 en collaboration avec Jérôme Tamburini et Adrien Grenier, de l'Institut Cochin à Paris. L'article porte sur la méthodologie employée pour modifier les gènes *PRKAA1* et *PRKAA2* de l'AMPK dans différentes lignées cellulaires humaines de leucémie aiguë myéloblastique (AML), MOLM-14 et OCI-AML3, et dans les cellules Caco-2 issues d'un adénocarcinome de côlon humain.

Dans cette sous-partie, nous nous intéresserons uniquement aux différentes étapes de construction du modèle de cellules Caco-2 invalidées pour les gènes *PRKAA1* et *PRKAA2* l'AMPK. La figure 27A résume les grandes étapes de la technologie CRISPR/Cas9 que nous avons suivies pour la génération de nos cellules.

Pour introduire simultanément une invalidation des gènes codant les isoformes $\alpha1$ et $\alpha2$, une approche utilisant un ARN guide (ARNg) commun pour ces deux isoformes a été envisagée. Cependant, aucun clone présentant une absence d'expression pour les deux isoformes $\alpha1$ et $\alpha2$ n'a pu être obtenu, et nous avons donc changé de stratégie. Ainsi, pour chacun des gènes codant respectivement les isoformes $\alpha1$ et $\alpha2$, *PRKAA1* et *PRKAA2*, des ARNg ont été conçus. Les cellules Caco-2 invalidées pour les deux isoformes $\alpha1$ et $\alpha2$ ont été obtenues par une approche séquentielle. En effet, les cellules ont d'abord été infectées avec un lentivirus exprimant un ARNg dirigé contre l'isoforme $\alpha1$ et une cassette de résistance à la puromycine. Après sélection et caractérisation d'un

clone cellulaire invalidé pour l'isoforme $\alpha 1$, une seconde infection a été réalisée avec un lentivirus exprimant un ARNg dirigé contre l'isoforme $\alpha 2$ et une cassette d'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) (Fig. 27B). A l'issue des différentes étapes de sélection, les cellules d'intérêt ont été isolées par clonage. La figure 27C présente la caractérisation de l'invalidation du gène *PRKAA2* pour le clone $\alpha 1/\alpha 2$ KO (AMPK dKO) utilisé dans mes travaux de thèse. Pour identifier les insertions ou délétions générées par la nucléase Cas9, nous avons effectué une analyse par électrophorèse capillaire de la taille de fragments PCR encadrant la séquence ciblée par l'ARNg dirigé contre l'isoforme $\alpha 2$. L'analyse a permis de mettre en évidence pour ce clone une insertion d'une base et une délétion de 2 bases pour chacun des allèles du gène *PRKAA2*. Les tailles des insertions ou délétions ont été confirmées par séquençage. Enfin, nous avons validé l'absence de l'expression de l'AMPK dans ce clone par Western blot. Nous avons également montré que l'incubation des cellules AMPK dKO avec le 991, un activateur direct de l'AMPK, n'entraîne pas la phosphorylation de l'ACC, laquelle est une cible directe de l'AMPK, confirmant la perte d'activité de l'AMPK dans ces cellules (Fig. 27C). Les cellules contrôles (WT) ont également été générées par la technologie CRISPR/Cas9 en utilisant un ARNg contrôle (ARNg scramble) dirigé contre aucune séquence génomique humaine.

La génération de ces cellules WT et AMPK dKO nous a ainsi servi à évaluer le rôle de l'AMPK dans le maintien de la barrière épithéliale dans la suite de notre projet.

A**B**

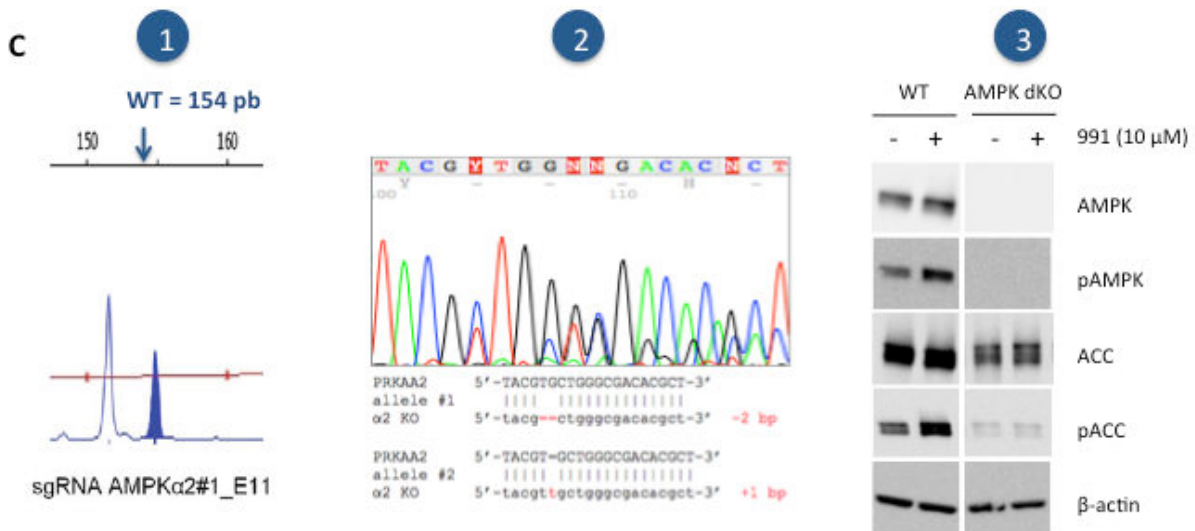


Figure 27 : Les différentes étapes de l'obtention des cellules Caco-2 invalidées pour les isoformes α 1 et α 2 de l'AMPK par la technologie CRISPR/Cas9.

(A) 1) Design des ARN guides ciblant le(s) gène(s) d'intérêt à invalider et clonage dans un plasmide plentiCRISPR. 2) Transfection des plasmides dans les cellules HEK293T et production des particules lentivirales. 3) Infection des cellules cibles avec les particules lentivirales recombinantes. 4) Isolement et sélection des clones (résistance à un antibiotique, tri GFP). 5) Caractérisation des clones (analyse de fragments, séquençage, Western blot, tests fonctionnels). (B) Stratégie séquentielle pour l'obtention des clones invalidés pour les isoformes α 1 et α 2 de l'AMPK. Le plentiCRISPR contenant l'ARNg pour l'isoforme α 1 a permis une sélection basée sur la résistance à la puromycine (étapes en rouge). Le pL-CRISPR.EFS.GFP contenant l'ARNg pour l'isoforme α 2 a permis une sélection basée sur la détection de la GFP (étapes en vert). Un clonage des cellules d'intérêt a été réalisé à l'issue de ces deux modes de sélection. (C) Caractérisation d'un clone déficient pour les isoformes α 1/ α 2 (AMPK dKO). ① Analyse de la taille de fragments PCR par électrophorèse capillaire pour la caractérisation des insertions/délétions dans le gène PRKAA2. Les deux pics correspondent à la taille du fragment amplifié pour chaque allèle. La flèche en bleu indique la taille du fragment obtenu à partir des cellules WT (154 paires de bases). ② Séquence de la région du gène PRKAA2 ciblé par l'ARNg dirigé contre l'isoforme α 2. ③ Analyse de la phosphorylation de la Thr-172 de l'AMPK et de l'expression de l'AMPK α totale, ainsi que de la phosphorylation de la Ser-79 de l'ACC et de l'expression de l'ACC totale par Western blot dans les lysats des cellules WT et AMPK dKO traitées avec 10 μ M de 991 pendant 10 minutes. La beta-actine a été utilisée comme témoin de charge.

Article 1 :

Knockdown of human AMPK using the CRISPR/Cas9 genome-editing system.

Adrien Grenier, Pierre Sujobert, Séverine Olivier, Hélène Guermouche, Johanna Mondésir, Olivier Kosmider, Benoit Viollet, and Jérôme Tamburini. *Methods Mol Biol.* 2018 ;1732 :171-194. (Grenier et al. 2018)



Chapter 11

Knockdown of Human AMPK Using the CRISPR/Cas9 Genome-Editing System

Adrien Grenier, Pierre Sujobert, Séverine Olivier, Hélène Guermouche, Johanna Mondésir, Olivier Kosmider, Benoit Viollet, and Jérôme Tamburini

Abstract

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a critical energy sensor, regulating signaling networks involved in pathology including metabolic diseases and cancer. This increasingly recognized role of AMPK has prompted tremendous research efforts to develop new pharmacological AMPK activators. To precisely study the role of AMPK, and the specificity and activity of AMPK activators in cellular models, genetic AMPK inactivating tools are required. We report here methods for genetic inactivation of AMPK α 1/ α 2 catalytic subunits in human cell lines by the CRISPR/Cas9 technology, a recent breakthrough technique for genome editing.

Key words CRISPR/Cas9, AMPK, AMPK α 1, PRKAA1, AMPK α 2, PRKAA2, AML, Caco2

1 Introduction

1.1 CRISPR/Cas9 Genome-Editing System

The rapid development of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein-9 endonuclease (Cas9) technology provides unprecedented genomic research tools. CRISPR are short DNA sequences found in bacteria. Together with the bacterial Cas9, these sequences are involved in the clearance of foreign DNA from bacteria [1]. Shortly after its discovery, the CRISPR/Cas9 system has been engineered for genome editing including in eukaryotic cells. Indeed, CRISPR/Cas9 offers a specific genomic tool based on the complementation of genomic DNA by a 20-mer oligonucleotide sequence followed by a consensus sequence called PAM for protospacer adjacent motif. This short guide RNA (sgRNA) allows the recruitment of Cas9 to the targeted genomic DNA sequence leading to DNA

Adrien Grenier, Pierre Sujobert, Séverine Olivier contributed equally to this work.

Dietbert Neumann and Benoit Viollet (eds.), *AMPK: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1732, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3_11,   Springer Science+Business Media, LLC 2018

double-strand breaks (DSB). In case of DSB repair by nonhomologous end joining (NHEJ), small insertions/deletions within coding sequences may be produced leading to a premature stop codon [2, 3]. Alternatively, DSB may be repaired by homologous recombination (HR), which may be exploited for targeted mutagenesis of endogenous genes when using a mutated recombination template [4]. In fact, multiple refinements of the CRISPR/Cas9 technology have been described, and the power of these techniques as well as their potential applications is increasingly growing.

1.2 Why and How Disrupting AMPK Activity?

AMP-activated protein kinase (AMPK) is one of the main cellular energy sensors, activated by the binding of AMP or ADP to its γ -regulatory subunit and by the phosphorylation of its α -catalytic subunit [5]. Once activated, AMPK modifies cell metabolism (inhibition of anabolism and activation of catabolism) to restore cellular energy balance. Tremendous research efforts are therefore ongoing to efficiently activate AMPK in the context of metabolic diseases or cancer [5]. Abrogating AMPK activity may help to define the role of AMPK in a given cellular context. Unfortunately, no specific AMPK inhibitors are currently available and genetic knockdown/knockout approaches are recommended to validate the function of AMPK (*see* Chapter 12). Hence, specific deletion of AMPK genes represents an invaluable tool to assess the specificity of AMPK-targeting small molecules (mostly AMPK activators). While targeting regulatory AMPK β or γ subunits may be important to disrupt the regulation of AMPK activity and function, AMPK α gene inactivation is sufficient to abrogate AMPK serine/threonine kinase activity [6]. At first glance, we used RNA interference (RNAi) by small hairpin RNA (shRNA) to deplete AMPK α from acute myeloid leukemia (AML) cells as done by other groups in other cellular contexts [7–9]. However, we failed to achieve a complete inhibition of AMPK α , with a residual expression of 10–20% at the protein level [10]. Indeed, Saito and colleagues recently demonstrated the essential pro-survival function of AMPK in AML cells exposed to stress [11], thus explaining the negative selection of cells with efficient AMPK α 1 knockdown. Hence, efficient and stable AMPK α knockout in human cell lines represents a challenge. To avoid this limitation, and also to reduce the probability of off-target as observed with shRNA [12], we moved toward a CRISPR/Cas9-based approach to study AMPK function in human cell lines. In this chapter, we describe the use of CRISPR/Cas9 technology to disrupt AMPK α 1 expression in acute myeloid leukemia (AML) MOLM-14 and OCI-AML3 cells and concomitant AMPK α 1 and AMPK α 2 expression in colon carcinoma Caco2 cells that may provide invaluable tools for further studies on AMPK biology and development of specific AMPK activators for the treatment of cancer and metabolic diseases (*see* Note 1). We attempted to find common DNA sequences across *PRKAA1* and *PRKAA2* genes (encoding the AMPK α 1 and AMPK α 2 catalytic subunits,

respectively) for targeting by a single sgRNA, but no such sequence was available within *PRKAA1* or *PRKAA2* coding or non-coding DNA. While multiplexing sgRNA into a single vector is possible [13], we used a sequential procedure to achieve first AMPK α 1 and then AMPK α 2 knockdown in single-cell clones. We thus developed *PRKAA1*- and *PRKAA2*-targeting CRISPR/Cas9 systems allowing a convenient sequential selection of AMPK α 1-depleted single-cell clones based on antibiotic resistance and then isolation of AMPK α 2 knockout single-cell clones based on the expression of a fluorescent marker. In particular, we describe procedures to design AMPK α 1 and AMPK α 2 targeting sgRNAs and cloning into lenti-viral vector. We also provide methods for infection, clonal selection, screening, and validation of single-cell CRISPR clones (*see Note 2*).

2 Material

2.1 sgRNA Design and Cloning

1. Online bioinformatic sgRNA design tool (e.g., CRISPR design tool) (*see Note 3*).
2. plentiCRISPR v2 plasmid (Addgene reference #52961). (*See Notes 4 and 5*).
3. pL-CRISPR.EFS.GFP plasmid (Addgene reference #57818).
4. Designed sgRNA oligonucleotides, 100 μ M oligonucleotides in H₂O:
 - *PRKAA1 sgRNA#1*: forward 5'-CACCGAGGGCACGCC ATACCCTTG-3' and reverse 5'-AAACCAAGGGTATGGC GTGCCCT-3'.
 - *PRKAA1 sgRNA#2*: forward 5'-CACCGATCCTGAAA GAGTACCATTC-3' and reverse 5'-AAACGAATGGTA CTCTTTCAGGAT-3'.
 - *PRKAA2 sgRNA#1*: forward 5'-CACCGAAGATCGGAC ACTACGTGCT-3' and reverse 5'-AAACAGCACGTAG TGTCCGATCTTC-3'.
 - *PRKAA2 sgRNA#2*: forward 5'-CACCGTCAGCCATC TTCGGCGCGCG-3' and reverse 5'-AAACCGCGCGCC GAAGATGGCTGAC-3'.
5. 10 \times kinase buffer: 500 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, 1 mM spermidine.
6. T4 PNK: 10 U/ μ l T4 polynucleotide kinase.
7. Restriction enzyme: 10 U/ μ l EspI (BsmBI) and 10 \times FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific).
8. T4 ligase: 1 U/ μ l T4 ligase.
9. 10 \times ligation buffer: 500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 10 mM DTT, 50% (w/v) polyethylene glycol-8000.

10. Stbl3 *Escherichia coli* competent cells.
11. SOC medium: 20 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose. Dissolve to 1 L deionized water, 20 g of tryptone, 5 g of yeast extract, 2 ml of 5 M NaCl, 2.5 ml of 1 M KCl, 10 ml of 1 M MgCl₂, and 10 ml of 1 M MgSO₄. Autoclave at 121 °C for 15 min, and add 20 ml of filter-sterilized 1 M glucose.
12. LB agar plate: lysogeny broth (LB) agar plate with 100 µg/ml ampicillin.
13. Maxiprep plasmid DNA kit.

2.2 Production of Lentiviral Particles

Before starting work with lentivirus, ensure compliance with your Environmental Health and Safety office and government/organization/university.

1. HEK 293T cells.
2. Phosphate buffer saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4.
3. CaCl₂ solution: 1 M CaCl₂.
4. Lipofectamine[®] 2000 transfection reagent.
5. PsPAX2 plasmid (encoding Gag and Pol proteins). (Addgene reference #12260).
6. pMD2.G (encoding VSV-G envelope proteins). (Addgene reference #12259).
7. HEPES buffered saline (HBS): 20 mM HEPES, pH 7, 150 mM NaCl.
8. Complete DMEM medium: DMEM, 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine.
9. Complete MEM alpha medium: MEM alpha medium, 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine.
10. Opti-MEM culture medium.
11. 0.22 µm filter.
12. G418 (Geneticin[®]) stock solution: 100 mg/ml G418.

2.3 Infection and Clone Selection

1. Human AML cell lines: MOLM-14 or OCI-AML3 human cell lines.
2. Human Caco2 colon carcinoma cell line.
3. Complete MEM alpha medium: Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium, 10% (v/v) FBS, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine.

4. Complete EMEM culture medium: Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), 20% (v/v) FBS, nonessential amino acids, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.
5. Trypsin/EDTA solution: 0.25% (w/v) Trypsin, 0.53 mM EDTA.
6. 50 µm cell strainer.
7. Cell sorting buffer: PBS (without Ca²⁺/Mg²⁺), 25 mM HEPES, pH 7, 1% (v/v) FBS, 1 mM EDTA.
8. 12 ml FACS tube.
9. Flow cytometer.

2.4 Screening

1. GeneScan™ 500ROX.
2. PCR Primers:
 - *PRKAA1 primers*: forward 5'-FAM-ATCACCAGGATCC TTTGGCA-3' and reverse 5'-TGCTTTCCTTACACCTT GGTG-3'.
 - *PRKAA2 primers*: forward 5'-FAM-GCTGCACTGTGGG TAGGC-3' and reverse 5'-GGGCGTCGGCACCTTC-3'.
3. Capillary electrophoresis.
4. GeneMapper® software v3.7.

2.5 Sequencing

1. Sequencing primers:
 - *PRKAA1 primers*: forward 5'-ATCACCAGG ATCCTTTGGCA-3' and reverse 5'-TGCTTTCCTTACACCTTGGTG-3'.
 - *PRKAA2 primers*: forward 5'-GCTGCACTGTGGGTAGG C-3' and reverse 5'-GGGCGTCGGCACCTTC-3'.
2. Cell lysis buffer: 4% Tween 20, 100 µg/ml proteinase K in H₂O.
3. DNA polymerase: Phire Hot Start II DNA Polymerase and 5× reaction buffer (Thermo Scientific).
4. Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer: 40 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA.
5. Agarose gel: 2% (w/v) agarose in TAE.

3 Methods

3.1 sgRNA Design and Cloning

Putative target sites can be identified by simply scanning the region of the particular genomic location that you want to target (but you should check your sgRNA design for potential off-target effects) or by using online bioinformatical tools dedicated to sgRNA design. (See **Note 3**).

Human AMPK α catalytic subunit encompasses two isoforms, AMPK α 1 and AMPK α 2, encoded by the *PRKAA1* and *PRKAA2* genes located at chromosomes 5p13.1 and 1p32.2, respectively. *PRKAA1* is made of 9 exons (Fig. 1A) representing 5088 base pairs (bp) and encodes a 559-amino acid (AA) protein of 64 kDa. *PRKAA2* coding sequence is 9280 bp long but with a long 3' untranslated region and encodes a 552-AA protein of 62 kDa (Fig. 1B). To target *PRKAA1* gene, we designed two sgRNAs targeting *PRKAA1* exon 7. To target *PRKAA2* gene, we designed two sgRNAs targeting *PRKAA2* exon 1 (Fig. 1A and B).

CRISPR Design

1. Identify sgRNA targeting sequences in the genomic region of interest by running the CRISPR design tool (*see* **Notes 6–8**). The output window shows 23 bp genomic sites of the form 5'-N₂₀NGG-3' within your target region. These sites may reside on the + or – strand (Fig. 2).
2. Remove NGG sequence to leave 20 nt target sequence.
3. Add G to the 5' end of target sequence if it does not begin with G. (*See* **Note 9**).
4. For cloning into the plentiCRISPR vector using BbsI restriction enzyme, add GATC to the 5' end of forward oligonucleotide, and add AAAA to the reverse complement oligonucleotide (including any additional G nucleotide). (*See* **Note 10**).
5. Synthesize forward and reverse oligonucleotides corresponding to the selected sgRNAs. (*See* **Notes 11 and 12**).

CRISPR Cloning

6. Mix 1 μ l of 100 μ M of forward and reverse oligonucleotides with 1 U of T4 PNK in 10 μ l of 1 \times kinase buffer, and incubate for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. (*See* **Note 13**).
7. Incubate at 95 $^{\circ}$ C for 5 min and gradually cool the solution at room temperature.
8. Digest 5 μ g of plentiCRISPRv2 plasmid backbone with 30 U of Esp3I (BsmBI) in a final volume of 60 μ l of 1 \times FastDigest Green Buffer. Incubate for 25 min at 37 $^{\circ}$ C and then at 65 $^{\circ}$ C for 15 min. (*See* **Note 14**).
9. Prepare a 10 μ l ligation reaction mix by adding 150 ng of plentiCRISPR digestion product, 1 μ l of 1 μ M annealed sgRNA oligonucleotides, 1 μ l of 1 U/ μ l T4 ligase, 1 μ l of 10 \times T4 ligase buffer. Incubate for 10–30 min at room temperature.

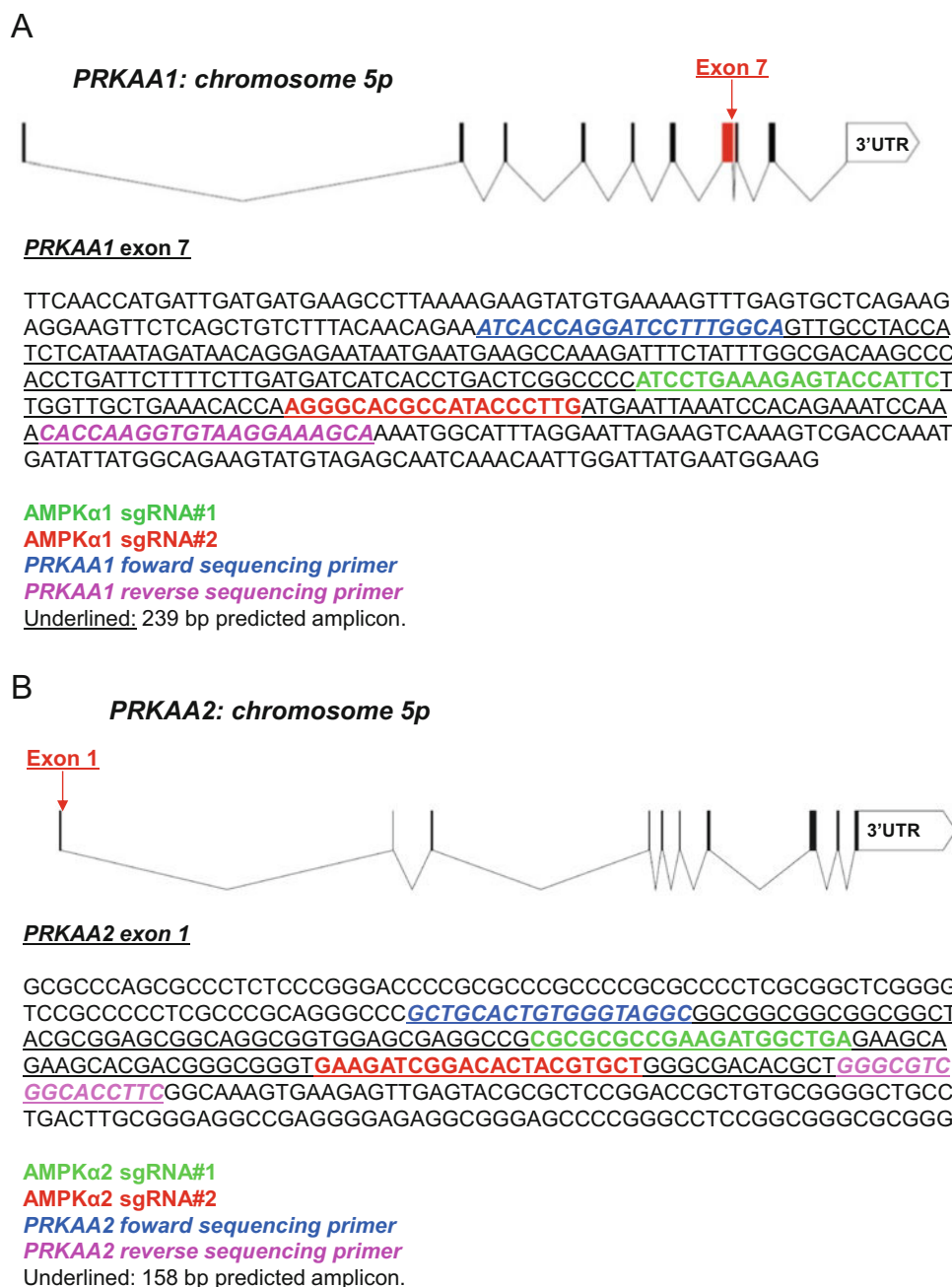


Fig. 1 Graphical representation of *PRKAA1* and *PRKAA2* genomic DNA sequences. *PRKAA1* and *PRKAA2* encompass 9 and 10 exons, respectively. Exons are figured as vertical black rectangles. *PRKAA1* exon 7 is highlighted in red. Intronic regions are depicted by connecting roof-shaped lines. 3' untranslated regions (3'UTR) are indicated. The scale is indicated, 1kd: 10 bases (A) AMPK α 1 sgRNA#1 (green) and sgRNA#2 (red), forward (blue) and reverse (pink) sequencing primers, and predicted amplicon (underlined) are represented. (B) AMPK α 2 sgRNA 1 (green) and 2 (red), forward (blue) and reverse (pink) sequencing primers, and predicted amplicon (underlined) are represented

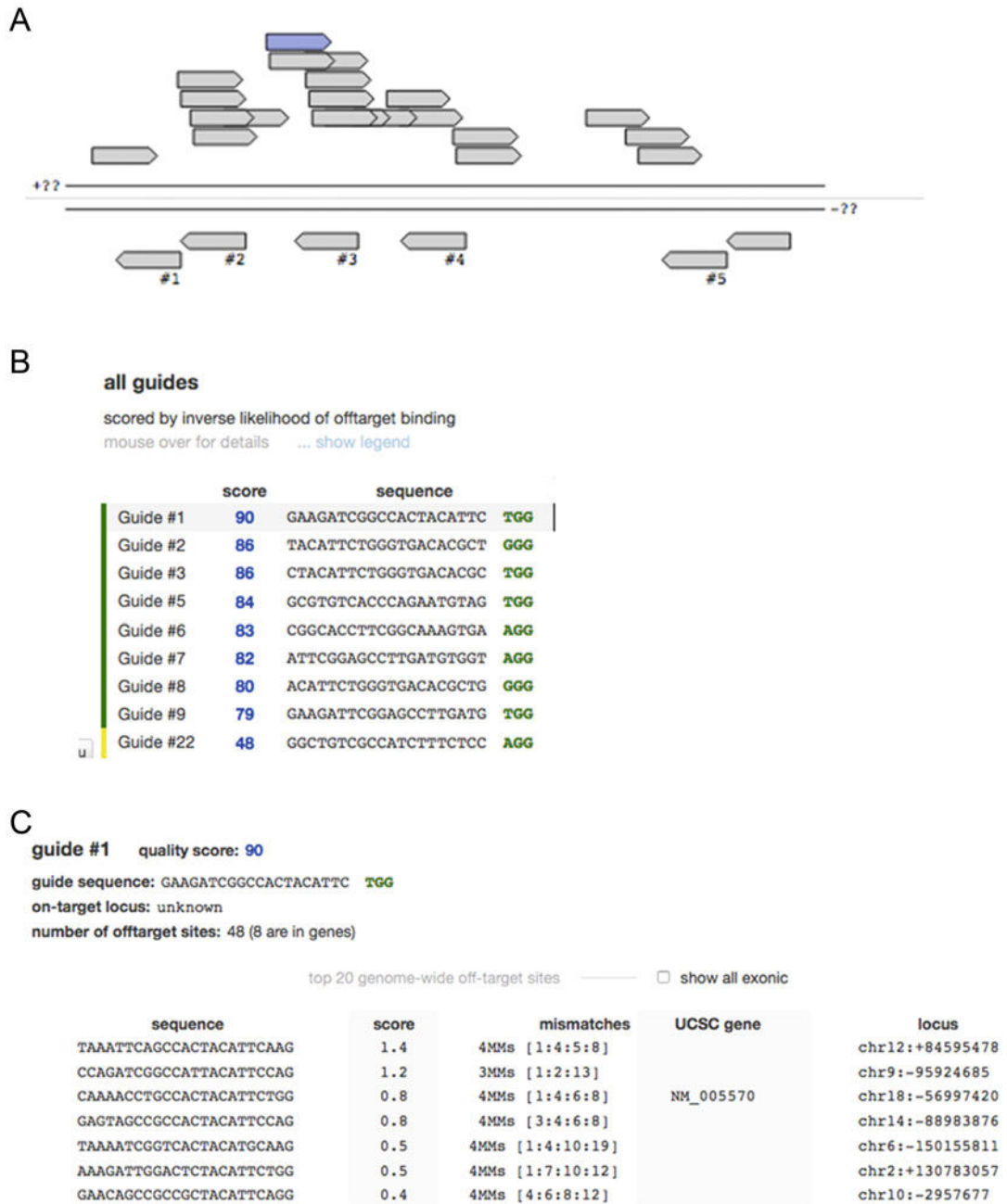


Fig. 2 Screenshots from online CRISPR design tool. **(A)** Graphical representation of location for proposed AMPK α 1 sgRNA sequence within *PRKAA1* gene. **(B)** Specificity scores for proposed AMPK α 1 sgRNA sequence. Each guide has a specificity score from 0 to 100. **(C)** Details about potential off-targets. CRISPR Design application software is available at <http://crispr.mit.edu>

10. Transform the ligation product into Stbl3 *Escherichia coli*. (*See Note 15*).
11. Incubate ligation product and one aliquot of Stbl3 cells for 10 min on ice.
12. Heat shock at 42 °C for 45 s and return to ice for 2 min.
13. Add 250 µl of room temperature SOC medium, and incubate at 37 °C with shaking for 1 h.
14. Spread the transformation mixture onto a prewarmed LB agar plate containing 100 µg/ml kanamycin. Incubate overnight at 37 °C.
15. Incubate the plates overnight at 37 °C in a microbiological incubator.
16. After incubation, pick 5–10 colonies to identify a correct clone for proper insert identification by Sanger sequencing.
17. After identifying the colonies with the correct sequence, isolate plasmid DNA using a maxiprep kit.

3.2 Lentivirus Production

To produce recombinant lentivirus, HEK293-T packaging cells are transfected with the packaging plasmids pVSVg and psPAX2 encoding lentiviral proteins (Gag, Pol, and Env) and the transfer plentiCRISPR/sgRNA plasmid. We propose here two different methods for lentiviral particles production using HEK293T packaging cells. (*See Note 16*).

Calcium/HBS Transfection

1. Plate 1.5×10^6 HEK293T cells into two T175 flasks in complete DMEM medium containing 1 mg/ml G418 antibiotic (generally 4 days before transfection).
2. The day of transfection, wash cells once with PBS, and add 18 ml of DMEM without FBS or G418. Incubate the cells for 6 h in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator.
3. Prepare transfection solution by adding 1.5 ml of sterile water, 500 µl of 1 M CaCl₂ solution, and a DNA plasmid mix containing 16 µg pMD2.G, 24 µg PsPAX2, and 3 µg of plentiCRISPR/sgRNA plasmids.
4. During a continuous vortex agitation, add dropwise transfection solution into 2 ml of HBS in a 50 ml tube. Incubate the mixture (final volume of 4 ml) for 15 min at room temperature.
5. Add 2 ml of this mix on each T175 flask, and incubate overnight in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator.

6. Discard culture medium and add 18 ml of complete DMEM culture medium. Incubate in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator for 24 h.
7. Collect the supernatants using a syringe, and filtrate out the cellular debris using a 0.22 µm filter. The filtered lentivirus supernatant can be either immediately used to transduce a cell line or stored at –80 °C. Avoid freeze-thawing lentivirus supernatant. (*See Note 17*).

Lipofectamine Transfection

8. Plate 2×10^6 HEK293T cells into two 10 cm diameter culture dishes with DMEM culture medium containing 1 mg/ml G418 antibiotic, and incubate overnight in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator.
9. Wash once with PBS, and replace medium with 4.2 ml of OPTIMEM culture medium.
10. Add 12 µl of Lipofectamine 2000 Transfection Reagent to 400 µl of FBS-free OPTIMEM medium. Incubate the mixture at room temperature for 15 min.
11. Add 3 µg of plentiCRISPR/sgRNA, 2 µg of PsPAX2 vector, and 1 µg of pMD2.G plasmids to 400 µl of FBS-free OPTIMEM medium.
12. Mix diluted plasmid DNA with diluted Lipofectamine mixture. Incubate the mixture at room temperature for 15 min.
13. Add 800 µl of the mixture dropwise to the cells, and incubate in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator.
14. Replace medium after 3–6 h with fresh DMEM culture medium, and incubate in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator for 48 h.
15. Collect the supernatants using a syringe, and filtrate out the cellular debris using a 0.22 µm filter. The filtered lentiviral supernatant can be either immediately used to transduce a cell line or stored at –80 °C. Avoid freeze-thawing lentiviral supernatant. (*See Note 17*).

3.3 Cell Infection and Clonal Isolation

Determination of MOI

The volume of supernatants used for infection may vary for each cell line and depends on lentiviral titer. Determination of the multiplicity of infection (MOI) for each cell line is recommended and is valid only for a given lentiviral supernatant batch [14]. To ensure that most cells receive only one stably integrated sgRNA, a MOI of 0.3 should be used. (*See Note 18*).

MOI theoretically is the number of viral particles per cell; a MOI of 1 means that 1 particle reached a single cell. However, particles may not lead to viral genome integration in all cases, and

transduction is not linear but follows a Poisson distribution considering that each event is independent. MOI can be determined by using the following formula:

$$m = -\ln(1 - P)$$

where m = MOI and P = probability of infection.

1. Plate 12-well plates at a density of 2×10^5 /ml AML cells in 2 ml of complete MEM alpha medium.
2. In each well, add 200, 100, 50, 25, or 0 μ l of lentiviral supernatant. An additional no antibiotic selection control well without addition of lentivirus is prepared. Incubate for 24 h in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator.
3. Twenty-four hours after lentiviral transduction, wash the cells twice with PBS to eliminate residual lentiviral particles, and then incubate with complete MEM alpha medium.
4. Twenty-four hours after lentiviral transduction, replace the medium with complete MEM alpha medium containing 1 mg/ml puromycin (or the relevant antibiotic selection). For the no antibiotic selection control well, replace the medium with complete MEM alpha medium without antibiotic.
5. Refresh complete MEM alpha medium with and without antibiotic until the antibiotic selection control well with no virus contains no viable cells.
6. Count the number of cells in each well. For each virus conditions, MOI is estimated. For example, if 37% of transduced cells are recovered after antibiotic selection, $MOI = -\ln(0.37) = 0.994$.

Infection of Cell Lines

7. For AML human cell lines, seed cells at a density of 2×10^5 cells/ml in complete MEM alpha medium.
8. For colon carcinoma Caco2 cells, plate 2×10^5 cells/wells in 24-well plates in 0.5 ml of complete EMEM culture medium.
9. Add lentiviral supernatants at a MOI of 0.3, and incubate for 24 h in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator.
10. Wash the cells with PBS twice, and then incubate with complete MEM alpha medium for AML cells or complete EMEM culture medium for Caco2 cells.

Antibiotic Selection and Clonal Isolation

11. Two to three days after lentiviral transduction, replace the medium with complete MEM alpha medium containing 1 mg/ml puromycin (or relevant antibiotic selection depending on antibiotic resistance marker expressed on the lentivirus

- vector used) for AML cells or complete EMEM culture medium containing 1 mg/ml puromycin (or relevant antibiotic) for Caco2 cells.
12. After antibiotic selection of transduced cells, select clonal cell lines by isolating single cells into 96-well plates through either cell sorting or other isolation procedures. (*See Notes 19 and 20*).
 13. For single isolation of AML cells, count cells with an automated cell counter, and prepare a cell suspension with 10^6 cells/ml in cell sorting buffer.
 14. For single isolation of Caco2 cells, aspirate culture medium, and wash cells with room temperature PBS.
 15. Add trypsin/EDTA and incubate for 3 min to detach cells.
 16. Resuspend dissociated cells with prewarmed complete EMEM medium, and gently pipet up and down several times to generate a single-cell suspension.
 17. Centrifuge the cell suspension for 5 min at $800 \times g$ at room temperature.
 18. Aspirate the supernatant, and resuspend the cell pellet in appropriate volume of cell sorting buffer to adjust the cell concentration to 10^6 cells/ml.
 19. Filter cell suspensions through a 50 μm filter into a FACS tube.
 20. Set up the cell sorter and install the required collection device.
 21. Collect cells individually into 96-well plates containing 100 μl /well of appropriate culture medium.
 22. After isolation of single cells (or single-cell derived clones), culture the cells without selection antibiotic. Allow the bulk cells to expand in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator. Establishment of new clonal cell lines will vary depending on the doubling time of the cell line used.

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Enrichment and Clonal Isolation

The following steps are performed for clonal isolation without antibiotic selection when using a plentiCRISPR plasmid expressing a fluorescent marker (e.g., pL-CRISPR.EFS.GFP plasmid). This approach can be a useful alternative strategy when working with puromycin (or other antibiotic)-resistant cell lines. Indeed, we used FACS to select cells transduced with “GFP” pL-CRISPR.EFS.GFP/AMPK α 2 in puromycin-resistant AMPK α 1 knockout Caco2 cells (previously generated by transduction with “puromycin” plentiCRISPR/AMPK α 1) (*see Note 21*) (Fig. 3).

23. Two to three days after lentiviral transduction, confirm successful delivery of sgRNA by visualizing fluorescent marker expression using fluorescence microscopy.

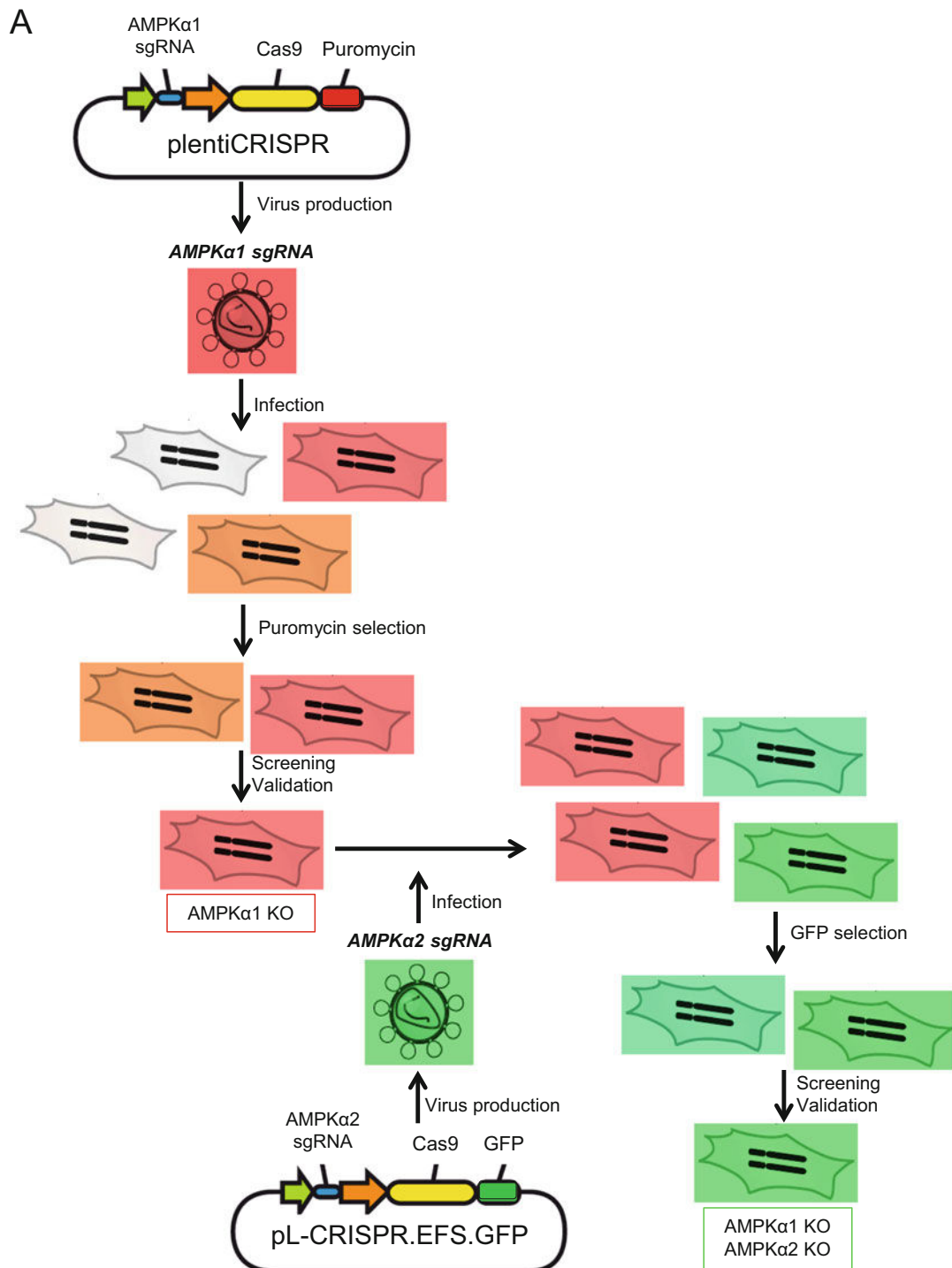


Fig. 3 Experimental workflow for genome engineering of colon carcinoma Caco2 cells. We used a sequential procedure to achieve both AMPK α 1 and AMPK α 2 knockout in single-cell Caco2 clones. (A) PRKAA1-targeting sgRNAs are cloned into the plentiCRISPR plasmid, allowing a selection based on puromycin resistance. PRKAA2-targeting sgRNAs are cloned into the pL-CRISPR.EFS.GFP plasmid allowing a selection based on GFP

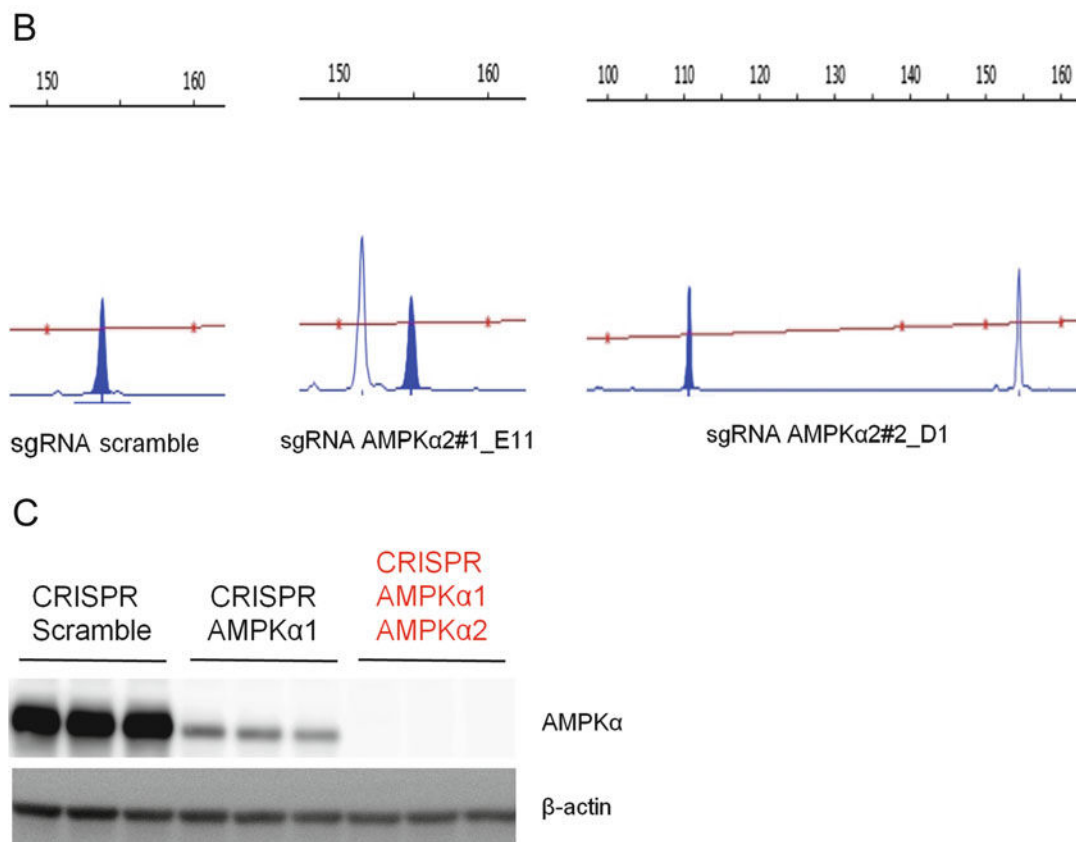


Fig. 3 (continued) detection. Single-cell sgRNA AMPK α 1 Caco2 clones were selected based on puromycin resistance (*left part*), and then single-cell sgRNA AMPK α 2 Caco2 clones on a AMPK α 1 knockout background are isolated based on GFP fluorescence (*right part*). **(B)** Genome editing efficiency of AMPK α 2 sgRNA in AMPK α 1-knockout Caco2 cells is assessed by capillary electrophoresis fragment analysis. **(C)** Western blot analysis of AMPK α protein expression in single-cell Caco2 clones isolated after sequential transduction with lentivirus expressing “puromycin” CRISPR/AMPK α 1 and “GFP” CRISPR/AMPK α 2. Western blots were performed using anti-panAMPK α and anti- β -actin antibodies. Each clone was analyzed in triplicate

24. Prepare cells for FACS analysis as described in Subheading 3.3, steps 13–19 for suspension and adherent cells.
25. Set up the flow cytometer with negative control cells. Adjust the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) to place the population of interest on scale.
26. Run positive control cells, and draw an interval gate to define the populations of interest.
27. Once gates have been determined, sort the top ~10% of fluorescent-positive cells from the experimental samples.

28. Collect cells individually into 96-well plates containing 100 μ l/well of culture medium.
29. After sorting, examine the plates under a microscope, and determine the presence of a single cell in most of the wells on the plate. Mark off the wells that are empty or that may have been seeded more than a single cell.
30. When cells exceed 10^5 cells/ml for suspension cells and are 80–90% confluent for adherent cells, prepare replicate plates for screening.
31. Expand the cells for 2–3 weeks. Change medium every 3–5 days as necessary and passage accordingly.

3.4 Screening and Validation

Most mutations induced by sgRNA at target site are small deletions or insertions (± 1 –20 bp), and knockout cell clones can be simply identified by analyzing successful micro-deletions or micro-insertions by product size analysis. Forward and reverse primers designed to anneal outside of the target locus region are used.

1. Screen a coverage of >20 clones per sgRNA to guarantee that each perturbation will be sufficiently represented in the final screening readout. (*See Note 22*).

Cell Lysis

2. Transfer cells into a 96-well U-bottom plate, and wash once in PBS buffer through centrifugation at $300 \times g$ (1200 rpm) for 20 s at 4 °C.
3. Discard culture medium and add 13 μ l of cell lysis buffer. (*See Notes 23 and 24*).
4. Transfer into PCR tubes, vortex briefly, and heat at 56 °C for 10 min and then at 95 °C for an additional 10 min.

PCR Amplification

5. Select a 500 bp region around the targeting site, and identify optimal targeting primer sets that amplify 200–300 bp around the targeting site. (*See Note 25*).
6. Assemble a 50 μ l PCR with 13 μ l of cell lysate, 1.5 μ l of 10 μ M 5'-FAM-labelled forward primer, 1.5 μ l of 10 μ M nonfluorescent reverse primer, 1 μ l of 10 mM dNTP, 10 μ l of 5 \times PCR buffer, and 1 μ l of phire taq polymerase.
7. Run sample in thermocycler with the following program: 98 °C for 1 min and for 35 cycles, 98 °C for 7 s, X °C for 5 s (X depend on the annealing temperature of the primers), 72 °C for 10–15 s/kb, and then 72 °C for 1 min. (*See Note 26*).
8. After the reaction is complete, run 1 μ l of each amplified target on a 2% (w/v) agarose gel in TAE to verify successful amplification of a single product at the appropriate size.

Fragment Analysis

9. To 1 μ l of fluorescent PCR products, add 18.8 μ l of water and 0.2 μ l of GeneScan™ 500ROX.
10. Perform migration by capillary electrophoresis using a DNA analyzer.
11. Analyze migration profile using GeneMapper® software v3.7 (Applied Biosystems) (Fig. 4C, left panel).

Validation of Genetic Modification by Sanger Sequencing

12. Use nonfluorescent primers to generate amplicons as described above see Sect. 3.4, steps 5–7.
13. Sequence the amplicons by using the same primers. Representative chromatograms are provided in Fig. 4C (right panel) for correlation with fragment analysis for the same clone.

Verification of Knockout Cell Clones by Immunoblotting Analysis

After validation of sequence perturbation, Western blot analysis is recommended for verifying protein expression of targeted genes (*see Note 24*). Methods for performing Western blot are described in Chapters 24 and 27.

Western blots from CRISPR/AMPK α 1-modified MOLM-14- and OCI-AML3-derived clones are shown in Fig. 5A–C. Western blots from CRISPR/AMPK α 1- and CRISPR/AMPK α 2-modified Caco2 derived clones are shown in Fig. 3A and B.

4 Notes

1. Although we provide a comprehensive view of CRISPR/Cas9 use in human AML and colon carcinoma cell lines, the methods described here may be applied to AMPK knockdown in other human cell lines as well as to any gene of interest.
2. Recent breakthrough allows researchers to disrupt the expression of a given gene by multiple means. Among the most popular techniques are RNA interference and CRISPR/Cas9, whose pros and cons are reviewed by other [12]. While both techniques might be used to achieve a partial knockdown of protein expression (e.g., with inactivated dCas9 fused to transcriptional modulators [15]), only CRISPR/Cas9 can achieve a complete and stable inhibition of protein expression. We believe that most of the technical pitfalls in CRISPR/Cas9 assays could be overcome after a careful adaptation of our current canvas to each cell type and sgRNAs, providing an invaluable tool for AMPK pharmacological research and beyond.

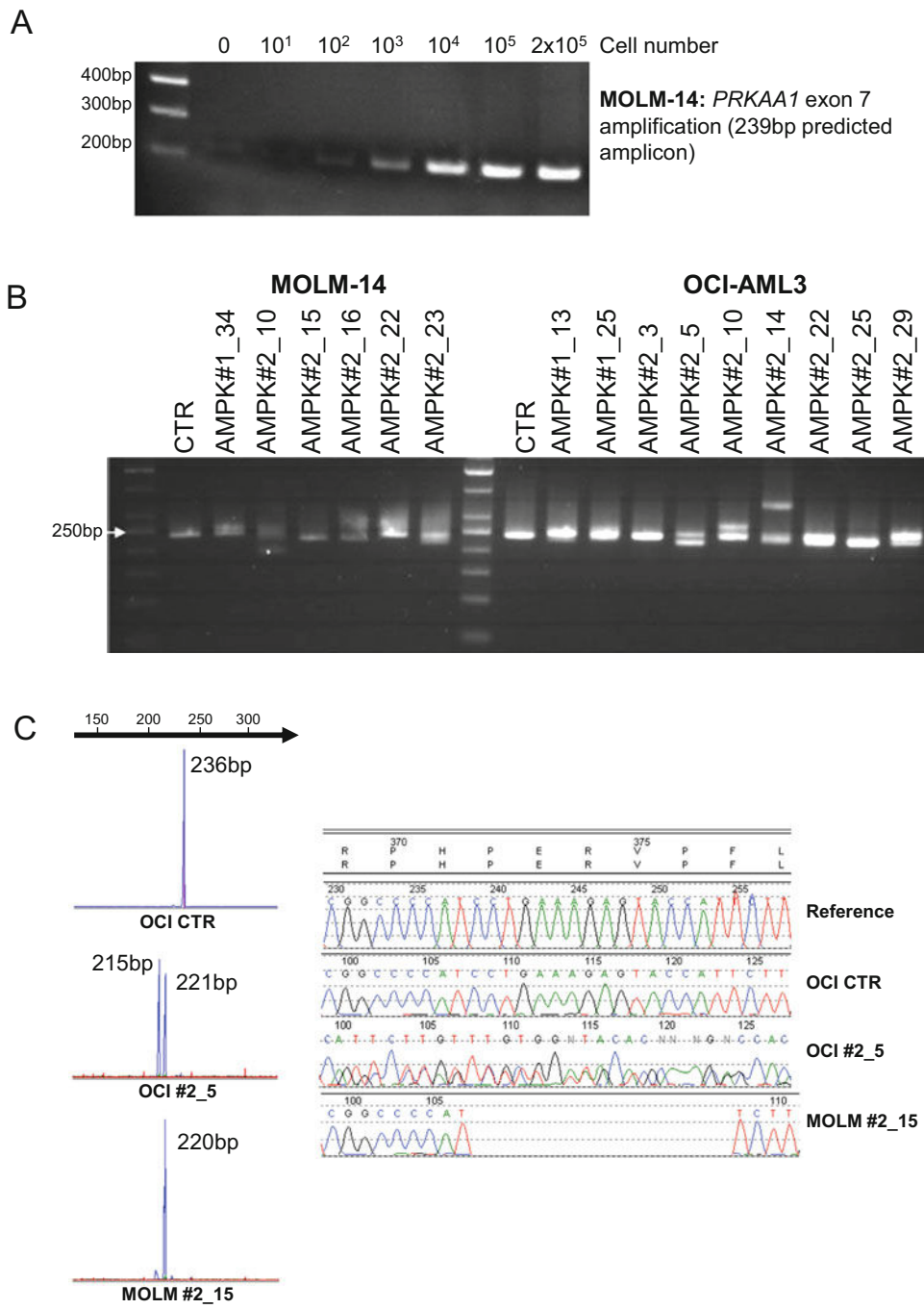


Fig. 4 Fragment and sequencing analysis of single-cell sgRNA AMPK α 1 AML clones. **(A)** Limiting dilutions experiments in MOLM-14 cells to assess the sensitivity of H₂O/tween lysis and AMPK α 1-targeted locus amplification. **(B)** Agarose gel migration of PCR products (using the sequencing primers described in Fig. 1a) from single-cell MOLM-14 and OCI-AML3 clones isolated after transduction with lentivirus expressing CRISPR/AMPK α 1#1 and #2. **(C)** Capillary electrophoresis fragment analysis using FAM-labelled primers in OCI-AML3 CTR, OCI-AML3 AMPK α 1#2_5, and MOLM-14 AMPK α 1#2_15 clones (*left panel*) and matching Sanger sequencing for OCI-AML3 AMPK α 1#2_5 and MOLM-14 AMPK α 1#2_15 clones (*right panel*)

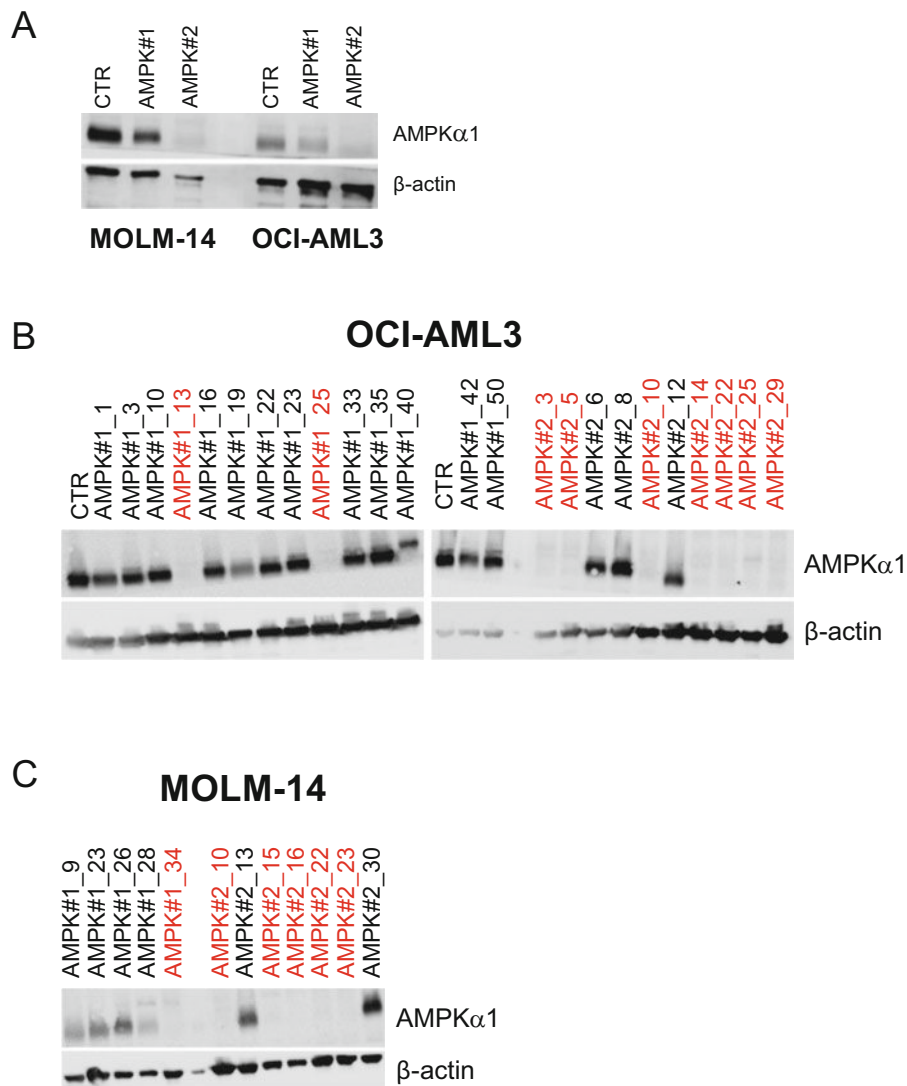


Fig. 5 AMPK α 1 protein expression in sgRNA AMPK α 1 AML cell lines. **(A)** Western blot analysis of AMPK α 1 protein expression in MOLM-14 and OCI-AML3 cell lines bulk populations transduced with lentivirus expressing CRISPR/AMPK α 1#1 and #2. **(B)** Western blots analysis of AMPK α 1 protein expression in single-cell OCI-AML3 clones after transduction with lentivirus expressing CRISPR/AMPK α 1#1 and #2. **(C)** Western blots analysis of AMPK α 1 protein expression in single-cell MOLM-14 clones isolated after transduction with lentivirus expressing CRISPR/AMPK α 1#1 and #2. Clone numbers highlighted in *red* and in *black* indicate successful AMPK α 1 knockout and knockout failure, respectively. Western blots were performed using anti-AMPK α 1 and anti- α -actin antibodies

3. Many bioinformatics tools are available online to help in the design of sgRNA (e.g., ZiFit, CRISPR Design Tool). We used the optimized CRISPR Design application software from Dr. Feng Zhang’s laboratory (<http://crispr.mit.edu>). This software provides an accurate analysis of off-target sites. Due to the

growing use of the CRISPR/Cas9 technology, more and more sgRNA sequences will be published to target a given gene/protein. Thus, it will be possible to pick-up already validated sgRNA sequences into published articles. Some companies also offers ready-to-use plasmids containing a validated sgRNA and also services for lentiviral particle production for a given plasmid that may represents a valuable assets, particularly for teams with limited experience with the CRISPR/Cas9 technology.

4. In previous publication, we have used the plentiCRISPRv1 plasmid [10], formerly referenced under the Addgene reference #49545, but this plasmid is currently not available due to the recent development of plentiCRISPRv2 plasmid (Addgene reference #52961). plentiCRISPRv2 is identical to the original plentiCRISPRv1 but produces nearly tenfold higher titer virus.
5. We mostly used the plentiCRISPR v1 plasmid, allowing the expression of sgRNA and Cas9 through a unique vector. While we found this system very convenient for our purposes, facilitating the clonal selection steps by antibiotic selection and allowing further transductions with other lentiviral vectors, such as GFP-expressing vectors (pL-CRISPR.EFS.GFP plasmid, Addgene reference #57818), people may want to use different systems dependent on their cellular model. Among many CRISPR/Cas9 tools currently available, we mention doxycycline-inducible vectors, such as, for example, the pLKO.1-puro U6 sgRNA BfuAI stuffer plasmid (Addgene #50920), using a modified Cas9 inactivated for endonuclease activity (dCas9) and fused to transcription corepressors such as KRAB, allowing a direct and efficient repression of transcription.
6. Appropriate sgRNA sequences are computationally designed based on known sgRNA targeting rules. The selected genomic target sequence should be unique to the genomic target site and be present immediately upstream the PAM sequence that is necessary for Cas9 recognition. Cas9 nuclease cuts 3-nt upstream of the PAM site. Avoid target sequence with homopolymer stretches (e.g., AAAA) and with a GC-rich content. The sequence analysis software analyzes a target sequence of up to 500 nucleotides and searches for PAM sequences either in the positive or negative strand of the corresponding genomic DNA. Every potential sgRNA is then analyzed against a reference genome (e.g., human genome hg19), to search for potential off-target sites in the whole genome. The output assigns a score (from 0 to 100) for each guide, according to an algorithm described on the website, and indicates the potential undesirable targets of this sgRNA. As recommended by Zhang's team, sgRNA with a score above 50 are good candidates, provided the off-targets are outside gene regions.

7. sgRNAs targeting the first exons of the gene are better candidates, to ensure that the premature stop codon will efficiently disrupt protein function. However, when targeting genes encoding multiple isoforms, we recommend targeting exons shared between all isoforms.
8. It is recommended to check the location of the sgRNA on the genomic sequence of the gene of interest, in order to avoid sgRNA that would be complementary to an exon-exon junction and thus would be inefficient at the genomic level.
9. If the 20 bp sequence does not start with a “G,” a single “G” nucleotide must be prepended to allow efficient transcription from the RNA polymerase III U6 promoter.
10. Appropriate sites for restriction enzymes should be added for subcloning purpose. If plentiCRISPR plasmid contain a Esp3I (BsmBI) restriction site, add “GATC” to the 5' end of the forward sequence and “AAAA” to the 5' end of reverse complementary sequence. The two oligos should anneal to form the following double strands:
5'-GATCGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXG-3'.
3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCAAAA-5'.
11. A control sgRNA that does not match any genomic sequence can be also synthesized. We used the following nontargeted guide as a control: 5'-GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC-3' [10].
12. We suggest using two (or more) different sgRNA sequences for each target gene, to be able to conclude that the observed effects are directly due to gene knockout, rather than to off-target activities of the constructs.
13. If phosphorylated oligonucleotides are ordered, the use of T4 PNK is omitted.
14. In order to minimize the risk of self-ligation of the plentiCRISPR plasmid, an additional digestion with 30 U of NsiI in the presence of 3 U of thermosensitive alkaline phosphatase (FastAP, EF0651, Thermo Scientific) is performed.
15. Lentiviral transfer plasmids contain long terminal repeats (LTRs) and must be transformed into recombination-deficient bacteria. We use Stbl3 *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, C7373-03) although other RecA⁻ strains may be used as well.
16. The choice between calcium/HBS and Lipofectamine™2000 to transduce HEK293 cells is mostly based on the cost/efficiency balance. For large lentiviral productions, we generally use calcium/HBS transductions for cost/efficiency reasons. In case of hard-to-transduce cell line, filtrated and concentrated supernatants should be used in priority. Alternatively, lentiviral production can be delegated to commercial companies.

Lentiviral supernatants should be stored at -80°C , and freezing/thawing cycles should be avoided by aliquoting the supernatants in small fractions.

17. Lentivirus supernatants can be concentrated by ultracentrifugation to increase transduction efficiency that may be helpful for some cell types. Concentration of lentivirus is achieved through centrifugation in a SW32Ti rotor at $82500 \times g$ (22,000 rpm) for 1 h 30 min with the following settings: acceleration 3 and deceleration 3. Concentrated supernatants are then stored at -80°C .
18. Researchers should be aware that lentiviral transduction efficacy is widely different across cell line and that each lentiviral supernatant batch also produces different transduction rates for the same cell line. We recommend the determination of a MOI for each lentiviral supernatant and each cell line used. MOI calculation is based on Poisson's statistics, assuming that cell transduction is a binary process. Indeed, MOI better reflects the true cell transduction rate than quantification of lentiviral particle on cell culture supernatants due to the presence of empty particles. While MOI is ideally evaluated when the vector is directly detected in a given cell, for example, by a fluorescent protein (GFP or other), an approximation of efficiently transduced cells is possible using antibiotic selection such as puromycin, approximating that only transduced cells are alive after adjunction of the selection compound.
19. Among multiple critical steps using this technique described here, people should keep in mind that, dependent on cell type, CRISPR/Cas9-induced knockdown may not be apparent in a bulk cellular population, in contrast to other techniques such as RNA interference. Several parameters may explain this fact, among which are variability in lentiviral transduction efficacy, discrepancy in sgRNA efficacy and also cell ploidy that may affect CRISPR/Cas9 efficacy in the presence of multiple copy of a given gene. Moreover, CRISPR/Cas9 may induce multiple gene modifications at the single-cell level, which may be difficult to genetically characterize when working on a bulk population. For these reasons, we recommend to single-cell clone-transduced cell lines and to choose the optimal clones based on genetic and immunoblotting characterization.
20. Depending on the response of used cell types to FACS, alternative methods can be performed. Cells can be individually sorted by using limiting dilution. We recommend to plate cells at 0.4 cell/well of 96-well plates. Isolation of clonal cell populations can be also performed by plating the cells at low density to isolate individual single-cell-derived clones. Monoclonal colonies can be picked and moved to a flat bottom

96-well plates for expansion. As colony formation could vary among cell types, optimal density of cell population needs to be determined empirically.

21. Beyond genetic and proteomic characterization of AMPK knockdown cells, attention should be given to the evaluation of AMPK activity in these cells. In AML cells, we exploited the fact that only AMPK α 1 isoform are expressed, allowing a complete disruption of AMPK activity, as attested, for example, by the absence of induction of ACC phosphorylation upon stimulation by AMPK activators [10]. In other cell types, co-expression of AMPK α 2 even at low levels might represent an issue for achieving a complete inhibition of AMPK. In this situation, strategy of sequential targeting of *PRKAA1* and then *PRKAA2* by different CRISPR/Cas9 vectors might represent an option.
22. In our experience, the probability of inducing DNA alterations by CRISPR/Cas9 is variable depending on the vector, sgRNA, and cell line. Therefore, achieving a significant depletion of a target protein on a bulk cellular population by this method is uncommon. In MOLM-14 and OCI-AML3 bulk populations, efficient AMPK α 1 knockdown is achieved using AMPK#2 sgRNA, but AMPK α 1 protein expression is barely affected by AMPK#1 sgRNA in these cells (Fig. 3A). We may extrapolate the probability of efficient knockdown, as in OCI-AML3 cells, 2/12 (16%) clones were AMPK α 1-depleted with AMPK#1 guide and 7/12 (58%) with AMPK#2 guide (Fig. 3B). Similar, we found 1/5 (20%) modified clones with AMPK#1 and 5/7 (71%) with AMPK#2 in the MOLM-14 cell line (Fig. 3C). We thus suggest performing a single-cell selection of cellular clones that will be further genetically characterized.
23. We have developed an easy-to-use assay to amplify a region avoiding DNA extraction and using a limited number of cells. This tool allows searching for genomic DNA modifications in a large number of single-cell-derived clones simultaneously. However, any method for genomic DNA isolation may be utilized.
24. To screen for multiple clones in parallel, we set up an assay based on direct PCR amplification of our target genomic sequence among cells in liquid cultures. By direct cell lysis into the PCR tube, we avoid time-consuming steps of DNA extraction and purification. While we focused on capillary electrophoresis DNA fragment analysis, as we found this technique robust and cost-efficient for our purposes, other techniques may be applied to characterize CRISPR/Cas9-induced genomic modifications including next-generation sequencing [16]. Although time-consuming, it is possible to search for

protein modification across the clones using immunoblotting. Alternatively, we may imagine to directly assess protein expression in single-cell clones using reverse phase protein microarrays (RPPA) that allows to test in parallel up to 100 conditions in a single slide [17]. However in this latter case, we still advise to characterize the selected clones at the genetic level as well.

25. Amplification of fragment smaller than 400 bp is recommended to ensure good resolution of the fluorescence-labelled DNA size analysis. Note that the size of amplicon analysis could vary by ~1 bp.
26. To estimate the appropriate annealing temperature for primer pairs when using the Phire DNA polymerase, we use the Tm calculator application available at <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.

Acknowledgments

Work from the authors was performed within the Département Hospitalo-Universitaire (DHU) AUTOimmune and HORMonal diseaseS (AUTHORS) and was supported by grants from INSERM, CNRS, Université Paris Descartes, and Société Francophone du Diabète (SFD). J.M. was supported by a fellowship from AP-HP. A.G. holds a doctoral fellowship from CARPEM. S.O. received a doctoral fellowship from the Région Ile-de-France (CORDDIM).

References

1. Zhang F, Wen Y, Guo X (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 23(R1):R40–R46
2. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154(6):1380–1389
3. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8(11):2281–2308
4. Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, Olsen KM, Gregg A, Noggle S, Tessier-Lavigne M (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 533(7601):125–129
5. Hardie DG (2013) The LKB1-AMPK pathway—friend or foe in cancer? *Cancer Cell* 23(2):131–132
6. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4):251–262
7. Chen L, Chen Q, Deng G, Kuang S, Lian J, Wang M, Zhu H (2016) AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 480(4):515–521
8. Jiang H, Liu W, Zhan SK, Pan YX, Bian LG, Sun B, Sun QF, Pan SJ (2016) GSK621 targets glioma cells via activating AMP-activated

- protein kinase signalings. *PLoS One* 11(8): e0161017
9. Wu YH, Li Q, Li P, Liu B (2016) GSK621 activates AMPK signaling to inhibit LPS-induced TNF α production. *Biochem Biophys Res Commun* 480(3):289–295
 10. Sujobert P, Poulain L, Paubelle E, Zylbersztejn F, Grenier A, Lambert M, Townsend EC, Brusq JM, Nicodeme E, Decroocq J, Nepstad I, Green AS, Mondesir J, Hospital MA, Jacque N, Christodoulou A, Desouza TA, Hermine O, Foretz M, Viollet B, Lacombe C, Mayeux P, Weinstock DM, Moura IC, Bouscary D, Tamburini J (2015) Co-activation of AMPK and mTORC1 induces cytotoxicity in acute myeloid leukemia. *Cell Rep* 11(9):1446–1457
 11. Saito Y, Chapple RH, Lin A, Kitano A, Nakada D (2015) AMPK protects leukemia-initiating cells in myeloid leukemias from metabolic stress in the bone marrow. *Cell Stem Cell* 17(5):585–596
 12. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell* 159(3):647–661
 13. Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T (2014) Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep* 4:5400
 14. Tiscornia G. SOaVI (2007) Development of lentiviral vectors expressing siRNA. *CSH protocols*:23–34
 15. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F (2015) Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517(7536):583–588
 16. Bell CC, Magor GW, Gillinder KR, Perkins AC (2014) A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *BMC Genomics* 15:1002
 17. Kornblau SM, Coombes KR (2011) Use of reverse phase protein microarrays to study protein expression in leukemia: technical and methodological lessons learned. *Methods Mol Biol* 785:141–155

1.2) L'activation de l'AMPK facilite l'assemblage des jonctions serrées dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2

Le second article présenté dans cette partie a été publié dans *International Journal of Molecular Sciences*, et porte sur les effets de l'activation de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées dans les cellules Caco-2 (Olivier et al. 2019).

Conséquences de la délétion de l'AMPK en condition basale

Tout d'abord, afin d'évaluer le rôle de l'AMPK au niveau de la barrière épithéliale, nous avons mesuré la TEER sur des cellules Caco-2 contrôles (WT) et invalidées pour les deux isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK (AMPK dKO) cultivées sur filtre Transwell pendant une période de 3 semaines. Nous avons montré que la TEER était similaire dans les cellules WT et AMPK dKO. De manière concordante, nous n'avons pas observé de différence au niveau de la morphologie des jonctions serrées par observation en microscopie électronique, ni au niveau de la localisation de la protéine ZO-1 par immunofluorescence. Ainsi, ces premiers résultats indiquent que l'AMPK n'est pas nécessaire au maintien des jonctions serrées dans ce modèle.

Conséquences de la délétion de l'AMPK sur la réponse au calcium switch

Ensuite, dans le but d'investiguer le rôle de l'AMPK dans un contexte d'altération de la barrière épithéliale, nous avons effectué des expériences de calcium switch sur les cellules Caco-2. Le calcium switch consiste à incuber les cellules dans un milieu sans calcium pendant une période de 16h, ce qui induit une déstabilisation des jonctions serrées, puis les cellules sont à nouveau incubées dans du milieu de culture contenant du calcium, ce qui permet l'induction d'un réassemblage des jonctions serrées. Suite à une altération de la barrière induite par calcium switch, nous avons montré que les cellules AMPK dKO présentaient un délai dans la reformation de la barrière épithéliale. En effet, suite au rajout de calcium, l'établissement de la TEER est moins rapide dans les cellules AMPK dKO par rapport aux cellules WT. De plus, les cellules AMPK dKO présentent une perméabilité paracellulaire plus élevée et une relocalisation de ZO-1 à la membrane

plasmique plus lente par rapport aux cellules WT. Nous avons confirmé ce résultat avec l'utilisation d'un inhibiteur de l'AMPK, le composé SBI-0206965, dans les cellules WT. En effet, dans un contexte de calcium switch, nous avons montré que l'inhibition de l'AMPK, confirmée par Western blot, empêchait l'établissement de la TEER suite au rajout de calcium. Nous avons également observé une diminution de la quantité de ZO-1 après le calcium switch en présence de l'inhibiteur de l'AMPK.

Effets de l'activation de l'AMPK sur la réponse au calcium switch

De manière intéressante, nous avons tout d'abord observé que l'ajout de calcium induisait l'activation de l'AMPK dans les cellules WT dans le cadre du calcium switch. Nous avons ensuite évalué les effets d'un activateur direct de l'AMPK, le composé 991, dans ce contexte du calcium switch. Nous avons montré qu'en présence de cet activateur, la TEER était augmentée dans les cellules WT par rapport aux cellules non traitées après le rajout du calcium. De manière concordante, la perméabilité était diminuée dans les cellules traitées au 991, et la relocalisation de ZO-1 à la membrane plasmique était plus rapide. Le 991 permettait également de maintenir un niveau d'expression protéique plus élevée de ZO-1 au cours du temps. Ces effets étaient perdus dans les cellules AMPK dKO.

Ainsi, nos résultats démontrent que l'activation pharmacologique de l'AMPK favorise le réassemblage des jonctions serrées suite à une altération de la barrière épithéliale induite par un calcium switch. L'AMPK pourrait constituer une cible thérapeutique pour réduire les défauts de la barrière intestinale observés dans certaines pathologies.

Article 2 :

AMPK activation promotes tight junction assembly in intestinal epithelial Caco-2 cells.

**Séverine Olivier, Jocelyne Leclerc, Adrien Grenier, Marc Foretz, Jérôme Tamburini
and Benoit Viollet. Int J Mol Sci. 2019 Oct 18 ;20(20). (Olivier et al. 2019)**



Article

AMPK Activation Promotes Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells

Séverine Olivier, Jocelyne Leclerc, Adrien Grenier, Marc Foretz , Jérôme Tamburini and Benoit Viollet *

Université de Paris, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, F-75014 Paris, France; severine.olivier@inserm.fr (S.O.); jocelyne.leclerc@inserm.fr (J.L.); adrien.grenier@aphp.fr (A.G.); marc.foretz@inserm.fr (M.F.); jerome.tamburini@inserm.fr (J.T.)

* Correspondence: benoit.viollet@inserm.fr; Tel.: +33-1-4441-2401

Received: 17 September 2019; Accepted: 17 October 2019; Published: 18 October 2019



Abstract: The AMP-activated protein kinase (AMPK) is principally known as a major regulator of cellular energy status, but it has been recently shown to play a key structural role in cell-cell junctions. The aim of this study was to evaluate the impact of AMPK activation on the reassembly of tight junctions in intestinal epithelial Caco-2 cells. We generated Caco-2 cells invalidated for AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ (AMPK dKO) by CRISPR/Cas9 technology and evaluated the effect of the direct AMPK activator 991 on the reassembly of tight junctions following a calcium switch assay. We analyzed the integrity of the epithelial barrier by measuring the trans-epithelial electrical resistance (TEER), the paracellular permeability, and quantification of zonula occludens 1 (ZO-1) deposit at plasma membrane by immunofluorescence. Here, we demonstrated that AMPK deletion induced a delay in tight junction reassembly and relocalization at the plasma membrane during calcium switch, leading to impairments in the establishment of TEER and paracellular permeability. We also showed that 991-induced AMPK activation accelerated the reassembly and reorganization of tight junctions, improved the development of TEER and paracellular permeability after calcium switch. Thus, our results show that AMPK activation ensures a better recovery of epithelial barrier function following injury.

Keywords: AMPK; direct AMPK activator; calcium switch; Caco-2 cells; intestinal barrier function; tight junction; trans-epithelial electrical resistance; paracellular permeability

1. Introduction

Epithelial cells are essential to protect organisms from the external environment. One of their main characteristics is to form a physical barrier thanks to a robust network of junctional proteins that closely link the cells between them and maintain their polarity. Cell-cell contacts involve tight junctions (zonula occludens proteins, occludins, claudins) and adherens junctions (catenins, cadherins). These proteins located at the apical part of epithelial cells regulate the paracellular permeability [1] and form multimolecular complexes where actin microfilaments can attach [2]. Alterations of epithelial barriers and loss of cell polarity are associated with various disorders like cancer development [3], inflammatory bowel diseases [4], or renal injury [5].

The AMP-activated protein kinase (AMPK) is an ubiquitous serine/threonine kinase principally known as an energy sensor at cellular level. It is a heterotrimeric protein composed of a α catalytic subunit and β and γ regulatory subunits existing as multiple isoforms in vertebrates [6]. In response to metabolic stresses where cellular energy balance is compromised, such as during ischaemia, hypoxia, or muscle contraction, AMP/ATP and ADP/ATP ratios are increased which leads to AMPK activation [7]. Binding of AMP on γ subunit enables phosphorylation of AMPK on Thr-172 by upstream kinase Liver Kinase B1 (LKB1) which in turn activates AMPK that phosphorylates downstream targets involved in

various metabolic processes to restore cellular energy balance [8]. Ca^{2+} /calmodulin-activated protein kinase kinase β (CaMKK β) is also able to phosphorylate AMPK in response to an increase in intracellular calcium, thus independently of the variation of AMP and ADP concentrations [9]. Furthermore, there exist various natural and pharmacological activators that act via different mechanisms: allosteric activation, phosphorylation of Thr-172, or protection against dephosphorylation of Thr-172 [10].

In addition to its best known metabolism functions, AMPK has been involved in the process of tight junctions' assembly in epithelial and endothelial cells under stress conditions, highlighting a novel structural function. This role has been first demonstrated in renal Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells where AMPK inhibition impaired tight junctions reassembly following a calcium switch challenge, whereas AMPK activation facilitated tight junctions assembly [11,12]. Following this breakthrough, other studies have shown the importance of AMPK in the regulation of epithelial and endothelial barriers in lung [13], heart [14] and brain [15].

The beneficial role of AMPK in intestinal health has received much attention in the recent years. Some studies using mouse models that mimic inflammatory bowel diseases showed a correlation between the decrease in intestinal AMPK activity and colitis development [16], and that metformin, an indirect AMPK activator, can protect against epithelial injuries [17,18]. Furthermore, the study of the effects of prebiotics and short chain fatty acids (SCFAs) produced by commensal bacteria on intestinal barrier has become a focus of interest in the last few years. Notably, it has been reported in human colon carcinoma Caco-2 cells that butyrate accelerated the assembly of tight junctions via the activation of AMPK [19,20], suggesting some interactions between AMPK and intestinal microbiota for the regulation of intestinal barrier function. All these previously reported studies strongly support a mechanism involving AMPK-dependent regulation of tight junction assembly, albeit the use of the AMPK inhibitor compound C, which has questionable selectivity [21], and widely-used indirect pharmacological AMPK activators, which have known off-target effects [22]. Thus, the significance of AMPK in the maintenance of intestinal barrier remains unclear.

Here, the aim of the present study was to evaluate the role of AMPK in the reassembly of tight junctions during a calcium switch assay in monolayer of Caco-2 cells by using novel genetic and pharmacological approaches. Notably we examined the effect of a specific and direct AMPK activator 991 on the assembly of tight junction proteins in AMPK-deficient Caco-2 cells generated by CRISPR/Cas9 system. Our study suggests that AMPK represents a druggable target to restore intestinal barrier integrity.

2. Results

2.1. Deletion of both AMPK α 1 and AMPK α 2 is Necessary to Abrogate AMPK Signaling in Caco-2 Cells

To examine the role of AMPK in tight junction assembly in intestinal epithelial cells, we invalidated the two catalytic AMPK α 1 and AMPK α 2 subunits in human colon carcinoma Caco-2 cells by genome editing with the CRISPR/Cas9 system. We used a sequential approach targeting first the *PRKAA1* gene encoding the catalytic AMPK α 1 subunit and then the *PRKAA2* gene encoding the catalytic AMPK α 2 subunit in single-cell clones, as previously described [23] (Figure 1A). The CRISPR-Cas9 system introduced insertion deletion (indel) mutations in the target sites of *PRKAA1* and *PRKAA2* genes, resulting in premature stop codons (Figure 1B,C).

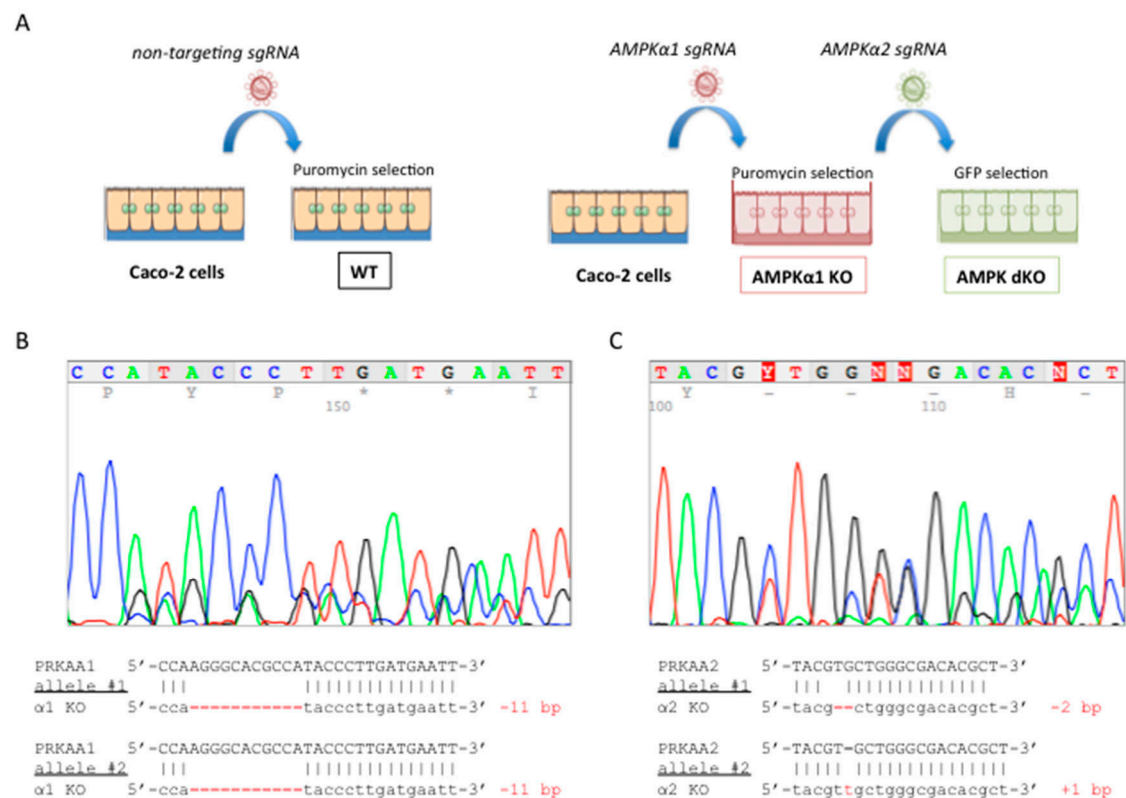


Figure 1. Generation and characterization of AMPK α 1/ α 2-deficient Caco-2 cells. (A) Experimental workflow for genome engineering of colon carcinoma Caco-2 cells. A sequential procedure was used to target first *PRKAA1* gene encoding AMPK α 1 and then *PRKAA2* gene encoding AMPK α 2. Cells expressing *PRKAA1*-targeting sgRNAs were first selected on puromycin resistance and then cells on an AMPK α 1 knockout background expressing *PRKAA2*-targeting sgRNAs were selected on green fluorescent protein (GFP) expression. Control cells were generated by using a non-targeting sgRNA and were selected on puromycin resistance. (B) Sequencing analysis of *PRKAA1* CRISPR alleles shows that both alleles were modified by deletion of 11 bp, resulting in premature stop codons. (C) Sequencing analysis of *PRKAA2* CRISPR alleles shows that one allele displayed a deletion of 2 bp and the second allele an insertion of 1 bp. All these alleles result in premature stop codons.

Although the catalytic subunit AMPK α 1 is predominantly expressed in Caco-2 cells [24], deletion of both AMPK catalytic subunits (AMPK α 1 and AMPK α 2) was necessary to fully abolish AMPK signaling [23]. Notably, in AMPK α 1-deficient (AMPK α 1 KO) Caco-2 cells, expression of the non-deleted AMPK α 2-isoform was markedly increased when compared to control (WT) cells treated with a non-targeting small guide RNA (sgRNA) (Supplementary Figure S1A). As a result, while activation of AMPK with the direct pan-AMPK pharmacological activator 991 [25] in AMPK α 1 KO cells triggered phosphorylation of acetyl CoA carboxylase (ACC) at Ser-79, a well-established target of AMPK (Supplementary Figure S1B), this was completely abolished in double AMPK α 1/AMPK α 2-deficient (AMPK dKO) Caco-2 cells compared to WT cells (Figure 2A). Taken together, these findings demonstrate that we generated a Caco-2 cell line completely devoid of AMPK activity.

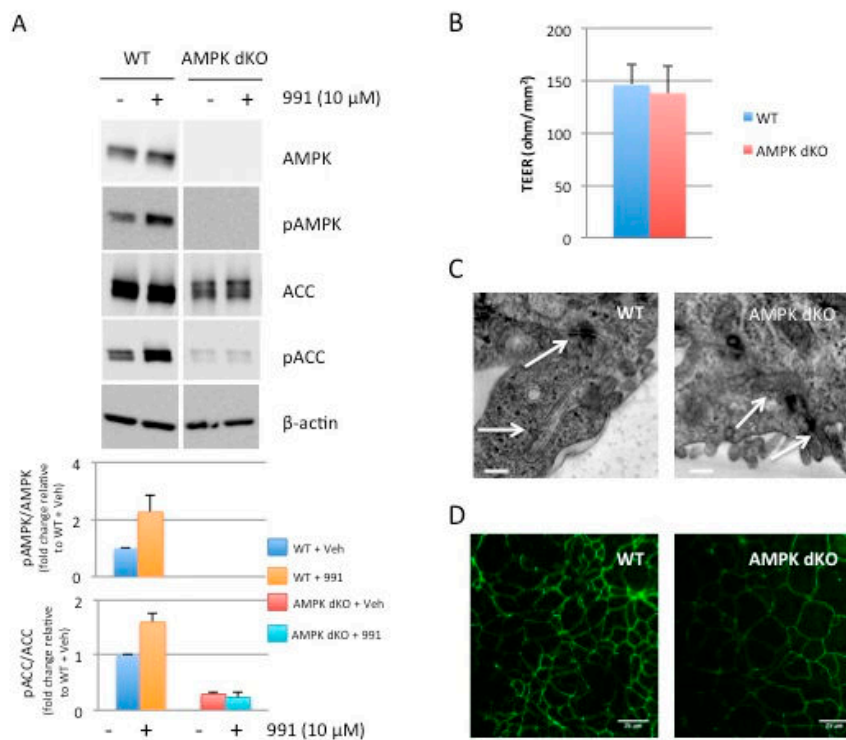


Figure 2. Effect of AMPK deletion on tight junction integrity at steady-state. (A) Whole cell lysates of WT and AMPK dKO Caco-2 cells treated with 10 μ M 991 for 10 min were analyzed for total and phospho(p)-AMPK and -ACC at Thr-172 and Ser-79, respectively. Expression of β -actin served as loading control. Lower panels represent ratios of pAMPK:AMPK and pACC:ACC from quantification of immunoblot images. (B) Variation of trans-epithelial electrical resistance (TEER) in polarized confluent WT and AMPK dKO Caco-2 cells. Cells were grown on Transwell filters for 3 weeks and TEER was measured in WT and AMPK dKO Caco-2 cells. Data represent means \pm SD ($n = 3$). (C) Transmission electron micrograph of WT and AMPK dKO Caco-2 cells at steady-state. Sections of monolayers of postconfluent stationary cells grown on Transwell filters. Arrows indicate cell-cell junctions. High magnification of intercellular spaces with distinguishable tight junctions are shown. Scale Bar: 200 nm. (D) Representative immunostaining of ZO-1 in WT and AMPK dKO Caco-2 cells at steady-state. Scale bar: 25 μ m.

2.2. Disruption of AMPK in Caco-2 cells does not Alter the Integrity of Tight Junction at Steady-State

To investigate the effect of AMPK deletion on tight junction assembly, we first measured trans-epithelial electrical resistance (TEER) in monolayers of WT and AMPK dKO Caco-2 cells grown on Transwell filters in normal culture medium for 3 weeks. We found that TEER was similar in polarized confluent WT and AMPK dKO cells (Figure 2B). These findings provide evidence that AMPK is not required for the long-term maintenance of functional tight junction. Consistently, no obvious difference in tight junction morphology could be observed by transmission electron microscopy analysis of WT and AMPK dKO cells at steady-state (Figure 2C), nor in ZO-1 location at plasma membrane analyzed by immunofluorescence (Figure 2D).

2.3. Deletion of AMPK Prevents Calcium-Induced Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Cells

Intercellular junctions between epithelial cells are dependent on extracellular calcium concentrations [26]. Low concentrations of extracellular Ca^{2+} disrupt intercellular junctions, and the restoration of Ca^{2+} concentrations induces the deposition of junction proteins to the plasma membrane and triggers junction assembly. When WT Caco-2 cells are switched from calcium-free to calcium-containing culture medium (calcium switch experiment), TEER is increased over time reflecting the reassembly of tight junctions and restoration of the paracellular barrier function

(Figure 3A). However, in AMPK dKO cells, the development of TEER was delayed upon readdition of calcium (Figure 3A), suggesting a role of AMPK in the process of tight junctions reassembly. To further investigate the role of AMPK in the establishment of intestinal barrier integrity, we measured paracellular permeability in WT and AMPK dKO Caco-2 cell monolayers after the calcium switch assay. We observed that AMPK dKO cells displayed a 4-fold increased paracellular flux to 0.4 kDa FITC-conjugated sulfonic acid compared to WT cells, suggesting major defaults in intestinal barrier integrity associated with the delay in TEER development (Figure 3B). Next, we monitored the location of ZO-1 by immunostaining after the calcium switch challenge, and we quantified ramifications of ZO-1 deposit at plasma membrane (Figure 3C). Calcium withdrawal induced the relocation of ZO-1 in the cytoplasm in both WT and AMPK dKO cells (Figure 3D). However, upon readdition of calcium, ZO-1 deposit at plasma membrane was less important in AMPK dKO cells compared to WT cells at 1 h 30 min, 3 h and 6 h, indicating a delay in the reorganization of tight junction proteins in the absence of AMPK (Figure 3C,D). Altogether, our data show that the absence of AMPK in Caco-2 cells induces a delay in the reassembly of tight junctions during the calcium switch assay.

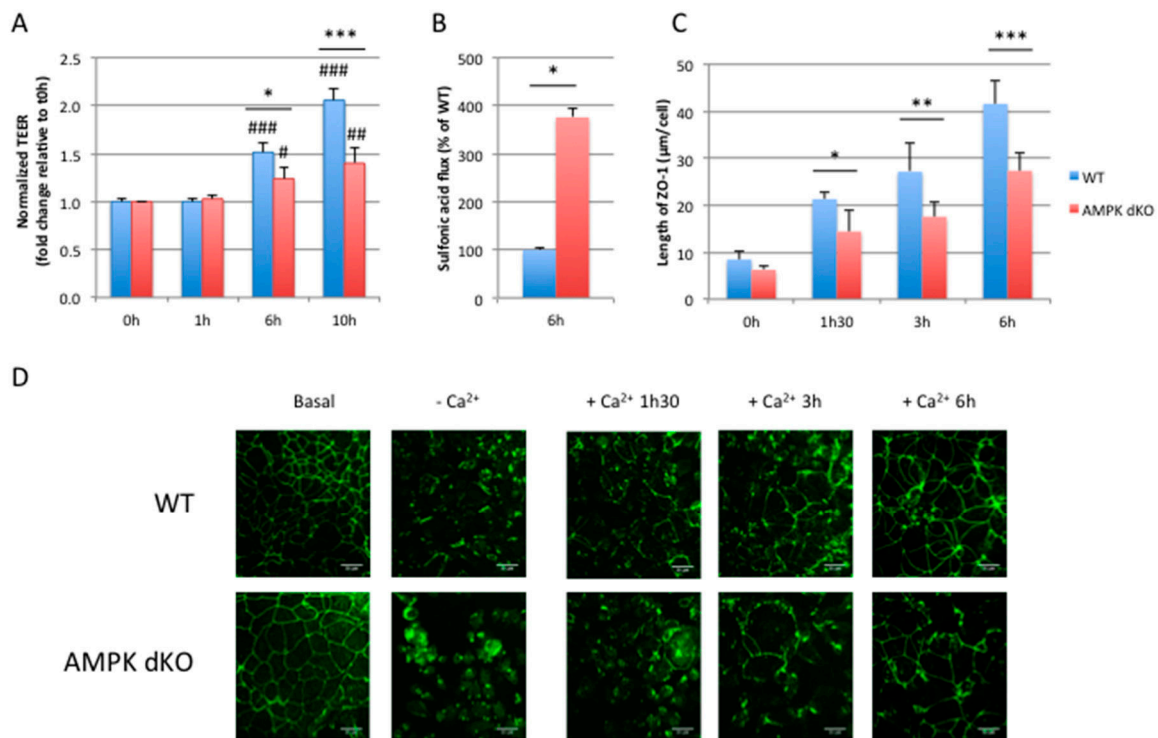


Figure 3. AMPK disruption delays barrier integrity recovery after calcium switch. **(A)** Time course of TEER development in WT and AMPK dKO Caco-2 cells subjected to a calcium switch. Cells grown on Transwell filters were incubated in calcium-free medium for 16 hours and switched to normal calcium medium. TEER was measured at the indicated time points after calcium switch and is given as fold change relative to the value in calcium-free medium at 0 h time point (0 h) **(B)** Paracellular permeability of 0.4 kDa FITC-sulfonic acid in WT and AMPK dKO Caco-2 monolayers subjected to calcium switch. Flux of FITC-sulfonic acid was measured at 6 h time point (6 h) and is given as the percentage of WT value. **(C)** Quantification of ZO-1 deposition at cell-cell junction after calcium switch at the indicated time points in WT and AMPK dKO Caco-2 cells. **(D)** Representative immunostaining of ZO-1 in WT and AMPK dKO Caco-2 cells at steady-state (basal), incubated in calcium-free medium for 16 hours (-Ca²⁺) or subjected to calcium switch (+Ca²⁺) for indicated time. Scale bar: 25 µm. Data represent means ± SD for three independent experiments ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ versus AMPK dKO cells at the same time point. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.005$ versus 0 hour time point (0 h) for the same genotype.

2.4. Acute Pharmacological Inhibition of AMPK Prevents Calcium-Induced Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Cells

AMPK-dependent effect on the establishment of TEER during the calcium switch assay was also confirmed by incubating WT Caco-2 cells with SBI-0206965, a specific AMPK inhibitor [21]. Upon readdition of calcium, increased phosphorylation of AMPK and ACC, reflecting AMPK activity during TEER establishment, was fully abolished by treatment with SBI-0206965 (Figure 4A). Pharmacological inhibition of AMPK led to a significant inhibition of TEER establishment (Figure 4B) that was associated with impaired increase in protein levels of the tight junction-associated protein zonula occludens 1 (ZO-1) following calcium switch (Figure 4C). To exclude the possibility that SBI-0206965 acts via off-target effects, independently of AMPK inhibition, we evaluated its effect in AMPK dKO cells by measuring the development of TEER after calcium switch. SBI-0206965 had no effect on TEER (Supplementary Figure S2A) and ZO-1 protein levels were globally low () in the absence of AMPK, confirming the importance of AMPK during the re-establishment of TEER.

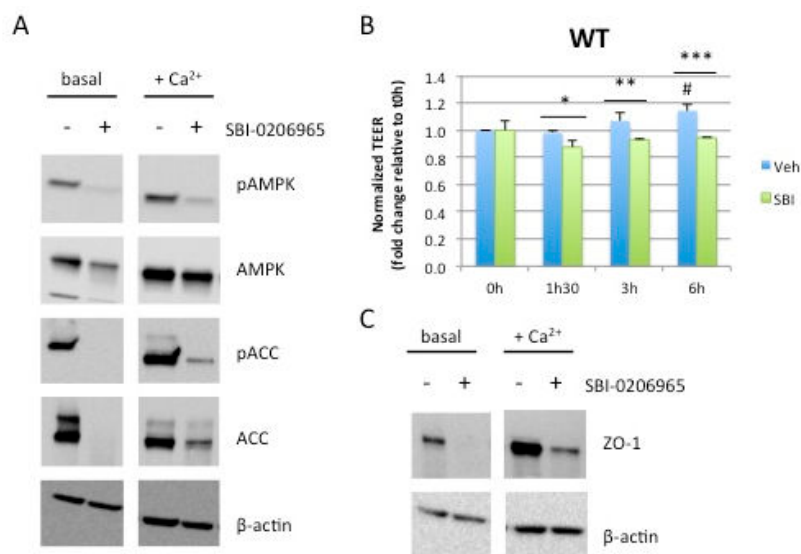


Figure 4. Acute pharmacological inhibition of AMPK prevents establishment of TEER after calcium switch. **(A)** Effect of SBI-0206965 on AMPK signaling. WT Caco-2 cells at steady-state (basal) or subjected to calcium switch (+Ca²⁺) were treated for 40 min with 5 μ M SBI-0206965. Whole cell lysates were analyzed for phosphorylation of AMPK at Thr-172 and ACC at Ser-79. Expression of β -actin served as loading control. **(B)** Time course of TEER development in WT Caco-2 cells subjected to a calcium switch in the presence or absence of the AMPK inhibitor SBI-0206965. Cells grown on Transwell filters were incubated in calcium-free medium for 16 hours and switched to normal calcium medium in the presence or absence of the AMPK inhibitor SBI-0206965. TEER was measured at the indicated time points after calcium switch and is given as fold change relative to the value in calcium-free medium (0 h time point). Data represent means \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ versus SBI-0206965 treated cells for the same time point. # $p < 0.05$ versus 0 h time point (0 h) for the same condition. **(C)** Cell lysates from WT Caco-2 cells at steady-state (basal) or subjected to calcium switch (Ca²⁺ switch) and treated for 40 min with or without 5 μ M SBI-0206965 were blotted with anti-ZO-1 antibodies. Expression of β -actin served as loading control.

2.5. Pharmacological AMPK Activation Enhances the Reassembly of Tight Junctions

We next investigated the effect of AMPK activation on the reassembly of tight junctions by treating Caco-2 cells with the pan-AMPK activator 991 upon readdition of calcium during the calcium switch assay. To confirm the effect of 991 on AMPK activation, we monitored the phosphorylation of AMPK and ACC during the experiment. Western blot data showed increased levels of AMPK and ACC phosphorylation in WT cells in response to 991 treatment in the absence of calcium (Supplementary

Figure S3A) and during the calcium switch experiment at 1 h and 30 min, 3 h and 6 h; the effect of 991 was lost in AMPK dKO cells (Figure 5A). In the presence of 991, the establishment of TEER was significantly increased at 3 h and 6 h in WT cells whereas no effect was observed in AMPK dKO cells (Figure 5B). In accordance with the values of TEER, the paracellular permeability measured with the 0.4 kDa FITC-conjugated sulfonic acid was significantly decreased at 6 h in WT cells treated with 991, but not in AMPK dKO cells (Figure 5C). Consistent with these findings, we found that 991-induced AMPK activation in WT cells enhanced the reassembly of tight junction as revealed by the obvious changes in the morphological organization of tight junction by electron microscopy analysis (Supplementary Figure S4). We also monitored the effect of 991 on the location of ZO-1 during the calcium switch by immunofluorescence. We found that 991 induced a more rapid relocalization of ZO-1 at plasma membrane in WT cells, the quantification of ZO-1 deposit was significantly higher at 0 h and 15 min, 3 h, and 6 h compared to the control condition (Figure 5D,E). Furthermore, we showed that 991-induced AMPK activation had a positive effect on ZO-1 location even in the absence of calcium (Supplementary Figure S3B,C). Compound 991 had no effect on ZO-1 location in AMPK dKO cells (Figure 5D,E), in accordance with the lack of changes on TEER and paracellular permeability (Figure 5B,C). At protein expression level, the readdition of calcium induced an increase of ZO-1 at 0 h and 15 min in both conditions in the presence or in the absence of 991, but the effects on AMPK dKO cells were lower (Figure 5F). However, at later time points, the presence of 991 led to increased levels of the tight junction protein ZO-1 at 1 h and 30 min compared to the control condition in WT cells, and there was no effect in AMPK dKO cells (Figure 5F). These data indicate that AMPK participates in both the reassembly and maintenance of tight junctions over time. Thus, pharmacological activation could ensure a better recovery of intestinal integrity after disruption of barrier function.

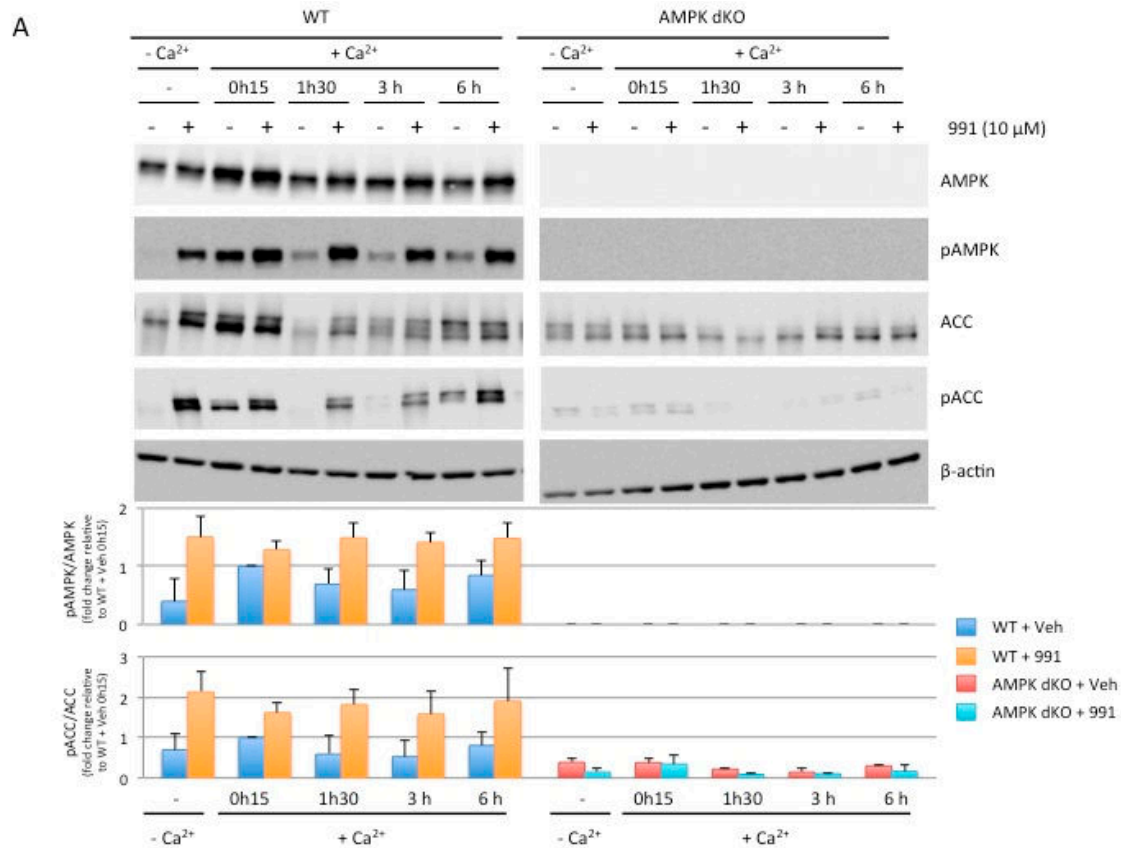


Figure 5. Cont.

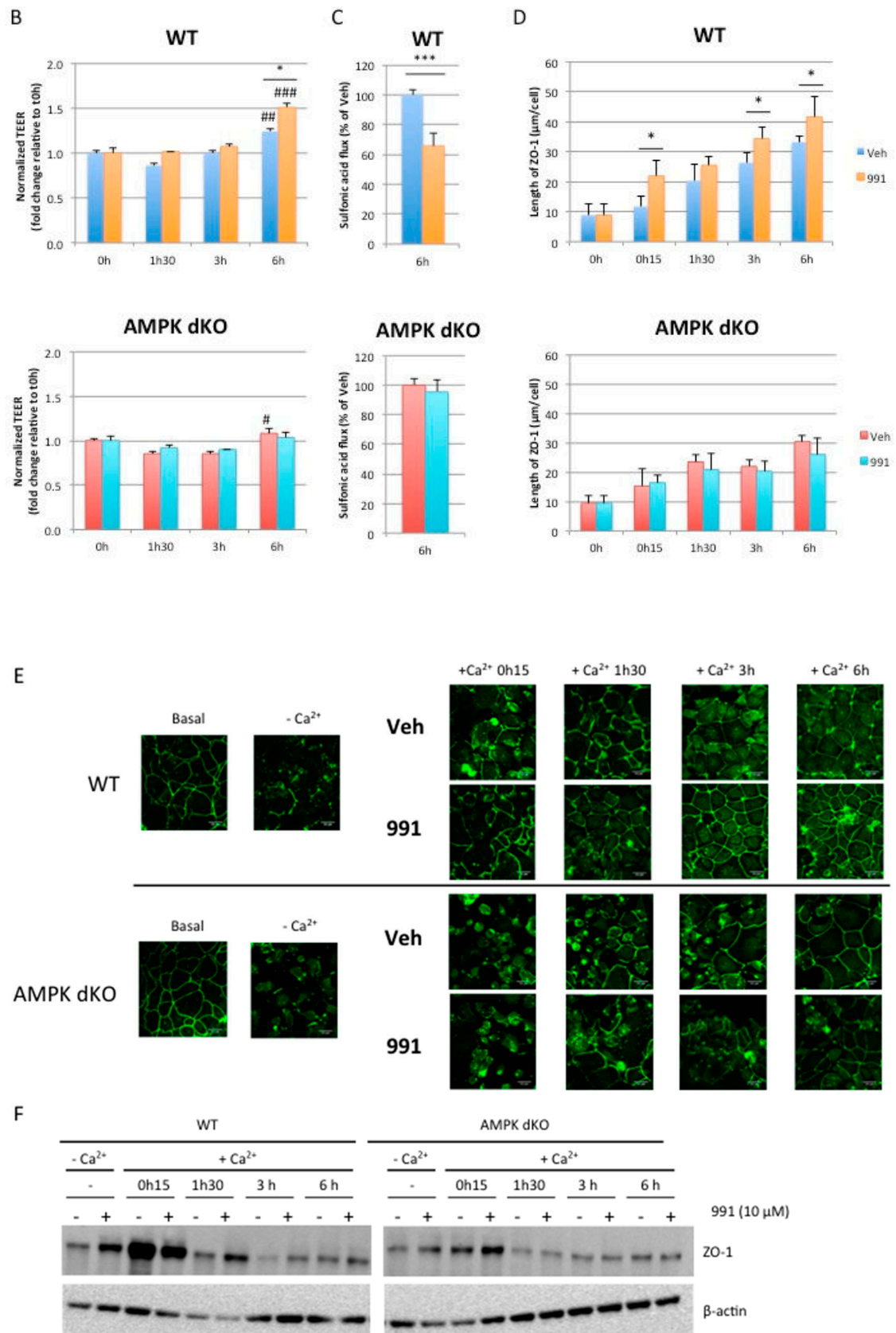


Figure 5. AMPK activation promotes tight junction assembly after calcium switch. (A) WT and AMPK dKO Caco-2 cells were subjected to calcium switch and were treated with DMSO or 10 µM 991 at

indicated time points. Cell lysates were analyzed for Thr-172 phosphorylation and total AMPK expression, Ser-79 phosphorylation and total ACC expression by Western blotting. Expression of β -actin served as loading control. Lower panels represent ratios of pAMPK:AMPK and pACC:ACC from quantification of immunoblot images. (B) Time course of TEER development in WT and AMPK dKO Caco-2 cells subjected to a calcium switch in the presence or absence of the AMPK activator 991. Cells grown on Transwell filters were incubated in calcium-free medium for 16 hours and switched to normal calcium medium in the presence or absence of 10 μ M 991. TEER was measured at the indicated time points after calcium switch and is given as fold change relative to the value in calcium-free medium at 0 h time point (0 h). (C) Paracellular permeability of 0.4 kDa sulfonic acid in WT and AMPK dKO Caco-2 monolayers subjected to calcium switch in the presence or absence of the AMPK activator 991. Paracellular flux was measured at the 6 h time point (6 h) and is given as the percentage of WT value. (D) Quantification of ZO-1 deposition at cell-cell junction in WT and AMPK dKO Caco-2 cells after calcium switch and treatment with or without 10 μ M 991 at the indicated time points. (E) Representative immunostaining of ZO-1 in WT and AMPK dKO Caco-2 cells at steady-state (basal), incubated in calcium-free medium for 16 hours ($-Ca^{2+}$) or subjected to calcium switch ($+Ca^{2+}$) in the presence or absence of the AMPK activator 991 for indicated time. Scale bar: 25 μ m. (F) After calcium switch, cell lysates were analyzed for ZO-1 expression by Western blotting. Expression of β -actin served as loading control. Data represent means \pm SD for three independent experiments ($n = 3$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ versus 991 treated cells at the same time point. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.005$ versus 0 h time point (0 h) for the same condition.

3. Discussion

In the current study, we highlighted the importance of AMPK in the initiation of tight junctions reassembly following a disruption of the intestinal epithelial barrier. We used Caco-2 cell monolayers as an *in vitro* model of the intestinal barrier and manipulated the assembly of tight junctions in calcium switch assays, which have been widely used for studying the barrier competence of the intestinal epithelium. To study the role of AMPK in the assembly of tight junctions, we generated a Caco-2 model invalidated for both isoforms of the catalytic subunit of AMPK (AMPK α 1 and AMPK α 2). The relevance to work with AMPK dKO Caco-2 cells was justified by the increased expression of the non-deleted AMPK α 2-isoform when only the predominant AMPK α 1 isoform was knocked-out. In addition, we observed that pharmacological activation of AMPK in AMPK α 1 KO Caco-2 cells triggered phosphorylation of ACC to similar levels than in WT cells, raising the possibility that each AMPK α -isoform can substitute for the other, with respect to both phosphorylation of downstream targets and amelioration of tight junction assembly. However, further work is warranted to elucidate potential AMPK isoform-specific role in the regulation of intestinal barrier function.

In steady-state conditions, when Caco-2 cells are fully confluent and polarized on Transwell filters, AMPK does not seem to play a crucial role in the maintenance of tight junctions, as values of TEER were similar between WT and AMPK dKO cells. In line with these results, previous study has reported that AMPK was not necessary for the maintenance of tight junctions in confluent MDCK cells [12]. Although there were no obvious differences in the epithelial barrier function and the ultrastructure of tight junctions between WT and AMPK dKO cells at steady-state, we found that AMPK dKO cells showed impaired development of TEER when tight junctions integrity was challenged during a calcium switch assay. Upon readdition of calcium, AMPK dKO cells displayed a delay in the re-establishment of the epithelial barrier, as shown by a slower establishment of TEER and relocalization of ZO-1 at plasma membrane, and a higher paracellular permeability compared to WT cells. The use of the AMPK inhibitor SBI-0206965 also confirmed a role for AMPK in the re-establishment of TEER and in the reassembly of tight junctions during the calcium switch assay. Thus, inhibition of AMPK either genetically or chemically was associated with impairment in the restoration of epithelial barrier integrity, demonstrating the modulatory role of AMPK in intestinal epithelial barrier function. Although our results do not permit to conclude on the requirement of AMPK in the initiation of tight junction assembly, they indicate that AMPK is necessary but not sufficient in this process. AMPK dKO cells are

still able to induce the formation of tight junction, meaning that these cells have probably developed compensatory mechanisms to balance the absence of AMPK.

As already reported in MDCK cells [11], we observed an increase in the activation of AMPK upon the readdition of calcium in Caco-2 cells, as revealed by enhanced AMPK and ACC phosphorylation in this context. We hypothesized that treatment with calcium could lead to the activation of CaMKK β , a well-known upstream kinase for AMPK [9], which in turn could phosphorylate and activate AMPK. AMPK activation through CaMKK but not LKB1 was also suggested in MDCK cells because levels of nucleotides were not significantly altered during the calcium switch assay [11], and variations in cellular energy status rather tend to facilitate activation of AMPK by the upstream kinase LKB1 [27]. However, a study conducted on Caco-2 cells showed that the absence of LKB1 could induce impairments in polarization. It has notably been found that LKB1 was important for ZO-1 location at plasma membrane [28]. Thus, further investigation will be required to better understand the role of upstream AMPK kinases in the AMPK-mediated regulation of tight junction assembly.

In previous studies, it has been shown that epithelial AMPK activation with the commonly used pharmacological AMPK activator, AICAR, was closely associated with enhanced tight junction integrity in MDCK cells during calcium switch [11,12]. The authors suggested that these effects could be mediated by the activation of AMPK. Treatment with AICAR also improved epithelial barrier function in Caco-2 cells as shown by increased TEER and decreased paracellular permeability of FITC-dextran [19,29]. However, the specificity of AICAR has been questioned due to its ability to activate AMP-dependent enzymes and is regarded as a non-specific activator of AMPK [30]. Here, we analyzed the impact of AMPK activation in Caco-2 cells by using a novel class of direct allosteric AMPK activators, binding to the allosteric drug and metabolite (ADaM) site, located between the α -subunit kinase domain and β -subunit carbohydrate binding module of AMPK complex [31]. Here, we showed that activation of AMPK with the pan-AMPK activator 991 facilitated the reassembly of tight junctions by increasing TEER and decreasing the paracellular permeability during the calcium switch assay. Compound 991 also induced a faster relocalization of ZO-1 at cell-cell contact and maintained expression levels of ZO-1. Importantly, all the beneficial effects of 991 were lost in AMPK dKO cells showing AMPK-dependent action. Interestingly, compound 991 also had a beneficial effect on the initiation of tight junctions reassembly in calcium-free medium, meaning that the sole AMPK activation is sufficient to induce this process. However, the combination of compound 991 and calcium enables a greater impact on the epithelial barrier recovery associated with enhanced AMPK activation over time.

How AMPK activation promotes the assembly of tight junction proteins remains to be elucidated. It has been reported that rapamycin rescues the delay of tight junction assembly in MDCK cells expressing an AMPK kinase-dead mutant, indicating that AMPK may act, at least partially, through the regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling [11]. AMPK may also directly act on tight junctions as it has been revealed in a phosphoproteomic study that ZO-2, another protein belonging to the zonula occludens family, could be a potential target of AMPK [32]. Otherwise, it could also be possible that AMPK phosphorylates proteins involved in the regulation of tight junctions, such as protein kinase C (PKC), initially defined as signaling proteins. Indeed, some PKC isoforms are localized at plasma membrane and participate in the maintenance and the assembly of tight junctions. In particular, both PKC η and PKC ζ play a key role in the localization of ZO-1 and occludin at the membrane and are able to phosphorylate occludin [33,34]. A study performed in Caco-2 cells reported that AMPK activation by sodium butyrate led to PKC β phosphorylation, which is necessary to ensure a correct recovery of the epithelial barrier during a calcium switch assay [35]. In the same study, the authors also found that AMPK activation regulated the phosphorylation of myosin II regulatory light chain (MLC2) by decreasing the activity of MLCK, involved in the contraction of the cytoskeleton and the regulation of paracellular permeability. Interestingly, it has been shown that AMPK directly phosphorylates MLC2 in *Drosophila* and knock-out of AMPK in fly causes abnormal epithelial integrity [36]. It has also been reported that AMPK could facilitate adherens junctions

formation by the phosphorylation of afadin to regulate its interaction with the tight junction-associated protein ZO-1, thereby facilitating ZO-1 distribution to the plasma membrane [37,38].

Lastly, two new AMPK substrates recently identified could be of interest to explain the action of AMPK activation on the reassembly of tight junctions. First, cingulin, a protein involved in the association of planar apical microtubules with tight junctions, has been found by a motif affinity proteomic approach designed for the discovery of AMPK substrates in primary mouse hepatocytes [32]. AMPK-mediated phosphorylation of cingulin at Ser137 was validated in Caco-2 cells treated with 991 [32]. The importance of cingulin in the association between microtubules and tight junctions was further revealed in mouse mammary epithelial Eph4 cells by using a knockdown model [39]. Second, a novel effector of AMPK has been discovered in MDCK cells. Under stress conditions, AMPK was shown to phosphorylate the G-alpha interacting vesicle associated protein (GIV), a scaffold protein involved in cell polarity. GIV is notably able to bind aPKC/Par3/Par6 and cadherin/catenin complexes. Thus, the AMPK-GIV signaling pathway stabilizes tight junction proteins [40]. AMPK-mediated phosphorylation of GIV at Ser245 has been recently confirmed by using AMPK-deficient enteroids derived monolayers treated with metformin, another commonly used indirect AMPK activator [41]. However, future studies determining the role of GIV and cingulin phosphorylation in the mechanisms mediating AMPK effects on tight junction are required.

In conclusion, we demonstrated that pharmacological AMPK activation has the ability to enhance the assembly of tight junction in intestinal Caco-2 cells, likely through a faster relocalization of ZO-1 at cell-cell contact. In addition to pharmacological drugs, SCFAs [19,42] as well as many naturally occurring phytochemicals [43–46] have been shown to improve barrier function associated with AMPK activation. Thus, our data provide support for targeting AMPK by the use of pharmacological, as well as nutraceutical compounds, to strengthen intestinal epithelial barrier functions and to exert health beneficial effects on leaky gut, predisposing individuals to intestinal bowel disease, obesity and diabetes.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents and Antibodies

Compound 991 (5-[[6-chloro-5-(1-methylindol-5-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]oxy]-2-methylbenzoic acid; CAS no. 129739-36-2) was synthesized by Spirochem (Spirochem, Zürich, Switzerland). SBI-0206965 was purchased from Sigma-Aldrich (#SML 1540, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). FITC-conjugated sulfonic acid (Fluorescein-5-(and-6)-Sulfonic acid) was obtained from ThermoFisher Scientific (#F1130, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Primary antibodies directed against total AMPK α (#2532), AMPK α phosphorylated at Thr-172 (#2531), total acetyl-CoA carboxylase 1/2 (ACC1/2) (#3676), ACC phosphorylated at Ser-79 on ACC (#3661), and β -actin (#4967) were purchased from Cell Signaling Technology (CST, Danvers, MA, USA). ZO-1 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (#13663, CST, Danvers, MA, USA) and ThermoFisher Scientific (#33-9100, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Anti-AMPK α 1 and anti-AMPK α 2 antibodies were kindly donated by Grahame Hardie (University of Dundee, Dundee, UK). HRP-conjugated secondary antibodies, goat anti-mouse IgG (#401215) and goat anti-rabbit IgG (#401393) were purchased from Calbiochem (EMD Chemicals Inc., San Diego, USA and EMD Millipore Corp., Billerica, USA, respectively) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibodies were obtained from ThermoFisher (#A-11008, ThermoFisher Scientific, Eugene, OR, USA).

4.2. Generation of AMPK Deficient Caco-2 Cells using CRISPR-Cas9 Gene Editing System

Generation of AMPK α 1/ α 2 KO Caco-2 cells was previously described [23]. Briefly, guide RNA sequences for targeting *PRKAA1* (encoding AMPK α 1) and *PRKAA2* (encoding AMPK α 2) genes were designed by using the online CRISPR design tool at <http://crispr.mit.edu>. Single guide RNA (sgRNA) sequences for AMPK α 1 and AMPK α 2 were as follows: 5'-AGGGCACGCCATACCCTTG-3'

and 5'-AAGATCGGACACTACGTGCT-3', respectively. The non-targeted scramble guide sequence: 5'-GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC-3' was used as control. Each sgRNA was cloned into pLentiCrispr plamids (Addgene #52961 and #57818) and lentivirus were produced in HEK293-T packaging cells. Caco-2 cells were first infected with lentivirus expressing *PRKAA1* sgRNA, and selected with puromycin. Single cell cloning was performed by cell sorting into 96-well plates and individual clones were screened by Western blot analysis using AMPK α 1 antibodies. A single-cell AMPK α 1-deficient clone was then infected with lentivirus expressing *PRKAA2* sgRNA, and cells were sorted based on the expression of GFP. Single colonies were screened by Western blot using AMPKpan α , and screened for insertion and deletion (indel) mutation after amplification of PCR products of target *PRKAA2* gene with Phire hot start DNA polymerase (ThermoFisher Scientific, Life Technologies SAS, Courtabœuf, France) using primers 5'-GCTGCACTGTGGGTAGGC-3' and 5'-GGGCGTCCGGCACCTTC-3'. Indel mutations were validated by DNA sequencing analysis and a clone lacking both AMPK α 1 and α 2 protein expression was selected.

4.3. Cell Culture and Calcium Switch Assay

Caco-2 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and were maintained at 37 °C with 5% CO₂ and 95% air atmosphere. Cells were grown in MEM (ThermoFisher Scientific, Life Technologies SAS, Courtabœuf, France) supplemented with FBS 20% (Eurobio), penicillin/streptomycin 1%, and non essential amino acids 1% (ThermoFisher Scientific, Life Technologies SAS, Courtabœuf, France).

Caco-2 cells were grown for 21 days on permeable filters with 8 μ m pore diameter (Greiner Bio-One, Courtabœuf, France). Polarized cells were washed twice with calcium-free Minimum Essential Medium (SMEM) and then incubated with SMEM supplemented with calcium-free FBS 3% for 16 h. SMEM was removed, cells were washed with MEM, then cells were incubated with MEM for 6 h or 10 h. Depending on experimental conditions, cells could be treated with 10 μ M 991 or 5 μ M SBI-0206965 during re-incubation with regular MEM. Barrier integrity was monitored over time by measurements of TEER and paracellular permeability.

4.4. TEER and Paracellular Permeability Measurements

TEER was measured with an epithelial volt-ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), for each well 3 measures were performed. During calcium switch assay, TEER was measured before incubation with SMEM, and then at 0 h, 1 h and 30 min, 3 h, 6 h, and 10 h after readdition of regular MEM.

Paracellular permeability was measured at 6 h after readdition of regular MEM with Fluorescein-5-(and-6)-Sulfonic acid 0.4 kDa (1g/L). 50 μ L of FITC-sulfonic acid were added into the apical part and was incubated for 1h at 37 °C. Then 150 μ L of medium from the basal part were collected in a microplate, and the fluorescence was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm with FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

4.5. Immunofluorescence and Quantification of ZO-1

Cells on filters were fixed in cold methanol for 5 min at -20 °C and blocked with BSA 10% for 1h at room temperature. Cells were then incubated with anti-ZO-1 antibodies from Cell Signaling Technology (CST, Danvers, MA, USA) overnight at 4 °C, followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (ThermoFisher Scientific, Eugene, Oregon, USA). Cell nuclei were stained with Hoechst. Mowiol was used as the mounting medium. Cells were observed on Spinning Disk confocal microscope, and pictures were obtained from MetaMorph software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Quantification of ZO-1 length was calculated by outlining manually ZO-1 staining at plasma membrane at cell junctions on six areas randomly chosen in each coverslip as previously described [11].

Outlined length were measured on ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and then divided by nuclei number in each area to get the average ZO-1 length per cell.

4.6. Electron Microscopy

Cells on filters were fixed with 3% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.2 M (pH 7.2) and were then embedded in epoxy resin. Samples were examined with a transmission electron microscope (JEOL 1011, JEOL Europe SAS, Croissy-sur-Seine, France) at the Cochin Institute electron microscopy facility using a GATAN eslangshen camera and the Digital Micrograph software (Gatan Microscopy Suite, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA).

4.7. Western Blotting

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 1mM DTT, 10% glycerol, and protease (Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and phosphatase (Pierce phosphatase inhibitor, ThermoFisher Scientific, Life Technologies SAS, Courtabœuf, France) inhibitors. Lysates were sonicated on ice for 4×30 s to shear DNA and reduce viscosity. The lysates were centrifuged for 5 min at $10,000 \times g$ at 4 °C, and the supernatants were collected for the determination of total protein content with a BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific, Life Technologies SAS, Courtabœuf, France). Supernatant proteins (20 µg) were separated by SDS-PAGE in precast 4-15% polyacrylamide gels and the resulting bands were transferred to nitrocellulose membranes. Equal loading was checked by Ponceau Red staining of the blot membrane before blocking by incubation for 30 min at room temperature with Tris-buffered saline supplemented with 0.2% NP40 and 5% non-fat dry milk. Total and phosphorylated AMPK and ACC, ZO-1, and β -actin were probed from separated membranes. Immunoblotting was performed according to standard procedures, and the signals were detected with chemiluminescence reagents (EMD Chemicals Inc., San Diego, USA and EMD Millipore Corp., Billerica, USA) by using ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Band intensities were quantified by Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) densitometry analysis and ratios for pAMPK:AMPK and pACC:ACC were calculated relative to the control condition.

4.8. Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SD. Groups were compared in unpaired two-tailed Student's *t*-tests, one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test for longitudinal and one single time point data comparisons or two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test for multiple comparisons as appropriate with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Differences between groups were considered statistically significant if $p < 0.05$.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5171/s1>.

Author Contributions: B.V. and S.O. designed and performed experiments, interpreted data, and wrote the manuscript. A.G. and J.T. designed and cloned sgRNA to produce recombinant lentivirus. B.V., S.O. and J.L. generated and characterized AMPK-deficient Caco-2 cells. M.F. assisted the generation and characterization of AMPK-deficient Caco-2 cells. B.V., S.O., M.F. and J.T. edited the manuscript.

Funding: This research was funded by INSERM, CNRS, Université Paris Descartes and SFD (Société Francophone du Diabète, allocation de recherche SFD-Industrie 2016 - Pierre Fabre Médicament). Séverine Olivier holds a doctoral fellowship from the Région Ile-de-France (CORDDIM).

Acknowledgments: The authors thank the cellular imaging, electron microscopy and cytometry and immunobiology facilities at Institut Cochin for their support. We thank François Jouret, Pascal Rowart and Laurence Poma (University of Liège, Liège, Belgium) for their help in ZO-1 quantification and Grahame Hardie (University of Dundee, Dundee, UK) for generously providing AMPK α 1 and AMPK α 2 antibodies. We also thank Kei Sakamoto and Robin Willows (Nestlé Research, Lausanne, Switzerland) for tentative analysis of cingulin phosphorylation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

ACC	Acetyl CoA carboxylase
ADaM	Allosteric drug and metabolite
AMPK	AMP-activated protein kinase
CaMKK β	Ca ²⁺ calmodulin-activated protein kinase kinase beta
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 9 endonuclease
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
GFP	Green fluorescent protein
GIV	G-alpha interacting vesicle associated protein
LKB1	Liver kinase B1
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MLC2	Myosin II regulatory light chain
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PKC	Proteins kinase C
SCFAs	Short chain fatty acids
TEER	Trans-epithelial electrical resistance
ZO-1	Zonula occludens 1

References

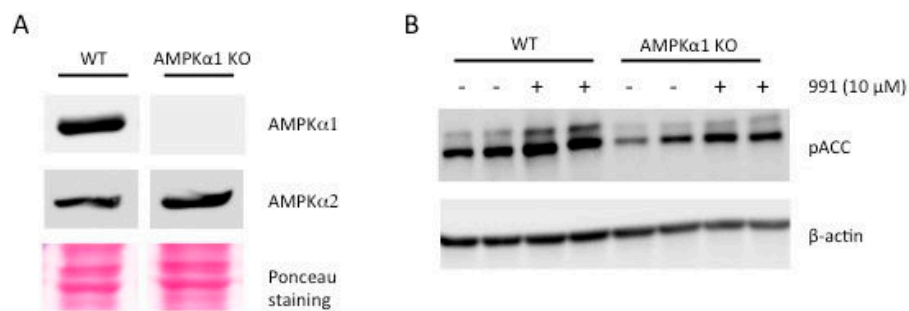
- Anderson, J.M.; Van Itallie, C.M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, G467-75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nagafuchi, A. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 600–603. [[CrossRef](#)]
- Wodarz, A.; Nathke, I. Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1016–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lee, S.H. Intestinal permeability regulation by tight junction: Implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* **2015**, *13*, 11–18. [[CrossRef](#)]
- Basile, D.P.; Anderson, M.D.; Sutton, T.A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 1303–1353.
- Ross, F.A.; MacKintosh, C.; Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase: A cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *FEBS J.* **2016**, *283*, 2987–3001. [[CrossRef](#)]
- Hardie, D.G.; Ross, F.A.; Hawley, S.A. AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1222–1236. [[CrossRef](#)]
- Zhang, Y.L.; Guo, H.; Zhang, C.S.; Lin, S.Y.; Yin, Z.; Peng, Y.; Luo, H.; Shi, Y.; Lian, G.; Zhang, C.; et al. AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 546–555. [[CrossRef](#)]
- Hawley, S.A.; Pan, D.A.; Mustard, K.J.; Ross, L.; Bain, J.; Edelman, A.M.; Frenguelli, B.G.; Hardie, D.G. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 9–19. [[CrossRef](#)]
- Guigas, B.; Viollet, B. Targeting AMPK: From Ancient Drugs to New Small-Molecule Activators. *Exp. Suppl.* **2016**, *107*, 327–350.
- Zhang, L.; Li, J.; Young, L.H.; Caplan, M.J. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17272–17277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zheng, B.; Cantley, L.C. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 819–822. [[CrossRef](#)]
- Kalsi, K.K.; Garnett, J.P.; Patkee, W.; Weekes, A.; Dockrell, M.E.; Baker, E.H.; Baines, D.L. Metformin attenuates the effect of Staphylococcus aureus on airway tight junctions by increasing PKCzeta-mediated phosphorylation of occludin. *J. Cell Mol. Med.* **2019**, *23*, 317–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Castanares-Zapatero, D.; Bouleti, C.; Sommereyns, C.; Gerber, B.; Lecut, C.; Mathivet, T.; Horckmans, M.; Communi, D.; Foretz, M.; Vanoverschelde, J.L.; et al. Connection between cardiac vascular permeability, myocardial edema, and inflammation during sepsis: Role of the alpha1AMP-activated protein kinase isoform. *Crit. Care Med.* **2013**, *41*, e411-22. [[CrossRef](#)]

15. Takata, F.; Dohgu, S.; Matsumoto, J.; Machida, T.; Kaneshima, S.; Matsuo, M.; Sakaguchi, S.; Takeshige, Y.; Yamauchi, A.; Kataoka, Y. Metformin induces up-regulation of blood-brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *433*, 586–590. [[CrossRef](#)]
16. Chen, L.; Wang, J.; You, Q.; He, S.; Meng, Q.; Gao, J.; Wu, X.; Shen, Y.; Sun, Y.; Wu, X.; et al. Activating AMPK to Restore Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelium and to Attenuate Experimental Colitis by Metformin. *Front Pharmacol.* **2018**, *9*, 761. [[CrossRef](#)]
17. Deng, J.; Zeng, L.; Lai, X.; Li, J.; Liu, L.; Lin, Q.; Chen, Y. Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation. *J. Cell Mol. Med.* **2018**, *22*, 546–557. [[CrossRef](#)]
18. Xue, Y.; Zhang, H.; Sun, X.; Zhu, M.J. Metformin Improves Ileal Epithelial Barrier Function in Interleukin-10 Deficient Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0168670. [[CrossRef](#)]
19. Peng, L.; Li, Z.R.; Green, R.S.; Holzman, I.R.; Lin, J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1619–1625. [[CrossRef](#)]
20. Elamin, E.E.; Masclee, A.A.; Dekker, J.; Pieters, H.J.; Jonkers, D.M. Short-chain fatty acids activate AMP-activated protein kinase and ameliorate ethanol-induced intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 1872–1881. [[CrossRef](#)]
21. Dite, T.A.; Langendorf, C.G.; Hoque, A.; Galic, S.; Rebello, R.J.; Ovens, A.J.; Lindqvist, L.M.; Ngoei, K.R.W.; Ling, N.X.Y.; Furic, L.; et al. AMP-activated protein kinase selectively inhibited by the type II inhibitor SBI-0206965. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 8874–8885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Foretz, M.; Hebrard, S.; Leclerc, J.; Zarrinpashneh, E.; Soty, M.; Mithieux, G.; Sakamoto, K.; Andreelli, F.; Viollet, B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 2355–2369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Grenier, A.; Sujobert, P.; Olivier, S.; Guermouche, H.; Mondesir, J.; Kosmider, O.; Viollet, B.; Tamburini, J. Knockdown of Human AMPK Using the CRISPR/Cas9 Genome-Editing System. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1732*, 171–194. [[PubMed](#)]
24. Harmel, E.; Grenier, E.; Bendjoudi Ouadda, A.; El Chebly, M.; Ziv, E.; Beaulieu, J.F.; Sane, A.; Spahis, S.; Laville, M.; Levy, E. AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions. *Endocrinology* **2014**, *155*, 873–888. [[CrossRef](#)]
25. Xiao, B.; Sanders, M.J.; Carmena, D.; Bright, N.J.; Haire, L.F.; Underwood, E.; Patel, B.R.; Heath, R.B.; Walker, P.A.; Hallen, S.; et al. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 3017. [[CrossRef](#)]
26. Cereijido, M.; Robbins, E.S.; Dolan, W.J.; Rotunno, C.A.; Sabatini, D.D. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* **1978**, *77*, 853–880. [[CrossRef](#)]
27. Woods, A.; Johnstone, S.R.; Dickerson, K.; Leiper, F.C.; Fryer, L.G.; Neumann, D.; Schlattner, U.; Wallimann, T.; Carlson, M.; Carling, D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **2003**, *13*, 2004–2008. [[CrossRef](#)]
28. Baas, A.F.; Kuipers, J.; van der Wel, N.N.; Batlle, E.; Koerten, H.K.; Peters, P.J.; Clevers, H.C. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* **2004**, *116*, 457–466. [[CrossRef](#)]
29. Sun, X.; Yang, Q.; Rogers, C.J.; Du, M.; Zhu, M.J. AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 819–831. [[CrossRef](#)]
30. Guigas, B.; Sakamoto, K.; Taleux, N.; Reyna, S.M.; Musi, N.; Viollet, B.; Hue, L. Beyond AICA riboside: In search of new specific AMP-activated protein kinase activators. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 18–26. [[CrossRef](#)]
31. Olivier, S.; Foretz, M.; Viollet, B. Promise and challenges for direct small molecule AMPK activators. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *153*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ducommun, S.; Deak, M.; Sumpton, D.; Ford, R.J.; Nunez Galindo, A.; Kussmann, M.; Viollet, B.; Steinberg, G.R.; Foretz, M.; Dayon, L.; et al. Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: Identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cell Signal.* **2015**, *27*, 978–988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jain, S.; Suzuki, T.; Seth, A.; Samak, G.; Rao, R. Protein kinase Czeta phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem. J.* **2011**, *437*, 289–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

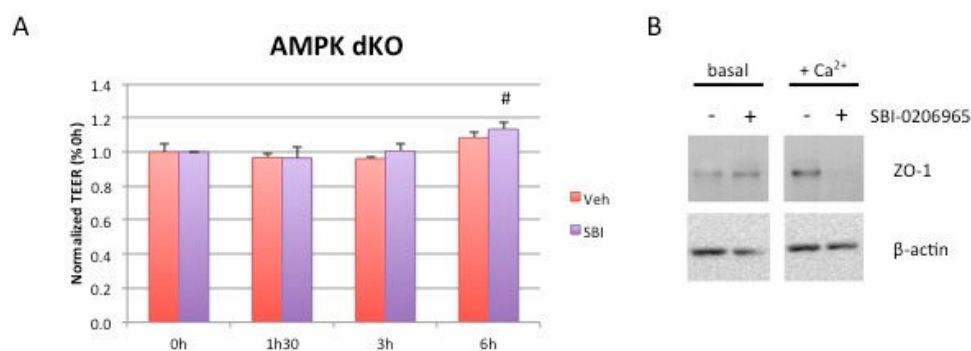
34. Suzuki, T.; Elias, B.C.; Seth, A.; Shen, L.; Turner, J.R.; Giorgianni, F.; Desiderio, D.; Guntaka, R.; Rao, R. PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 61–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Miao, W.; Wu, X.; Wang, K.; Wang, W.; Wang, Y.; Li, Z.; Liu, J.; Li, L.; Peng, L. Sodium Butyrate Promotes Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Monolayers Involving Inhibition of MLCK/MLC2 Pathway and Phosphorylation of PKC β 2. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1696. [[CrossRef](#)]
36. Lee, J.H.; Koh, H.; Kim, M.; Kim, Y.; Lee, S.Y.; Karess, R.E.; Lee, S.H.; Shong, M.; Kim, J.M.; Kim, J.; et al. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* **2007**, *447*, 1017–1020. [[CrossRef](#)]
37. Zhang, L.; Jouret, F.; Rinehart, J.; Sfakianos, J.; Mellman, I.; Lifton, R.P.; Young, L.H.; Caplan, M.J. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibition induce Ca²⁺-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 16879–16890. [[CrossRef](#)]
38. Rowart, P.; Wu, J.; Caplan, M.J.; Jouret, F. Implications of AMPK in the Formation of Epithelial Tight Junctions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2040. [[CrossRef](#)]
39. Yano, T.; Matsui, T.; Tamura, A.; Uji, M.; Tsukita, S. The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J. Cell Biol.* **2013**, *203*, 605–614. [[CrossRef](#)]
40. Aznar, N.; Patel, A.; Rohena, C.C.; Dunkel, Y.; Joosen, L.P.; Taupin, V.; Kufareva, I.; Farquhar, M.G.; Ghosh, P. AMP-activated protein kinase fortifies epithelial tight junctions during energetic stress via its effector GIV/Girdin. *Elife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
41. Ghosh, P.; Swanson, L.; Sayed, I.M.; Mittal, Y.; Lim, B.B.; Ibeawuchi, S.-R.; Foretz, M.; Viollet, B.; Sahoo, D.; Das, S. A Signaling Pathway to Detect and Repair the Leaky Gut barrier: Implications in Aging and Cancer. Unpublished work. 2019.
42. Elamin, E.; Masclee, A.; Juuti-Uusitalo, K.; van Ijzendoorn, S.; Troost, F.; Pieters, H.J.; Dekker, J.; Jonkers, D. Fatty acid ethyl esters induce intestinal epithelial barrier dysfunction via a reactive oxygen species-dependent mechanism in a three-dimensional cell culture model. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Muanprasat, C.; Wongkrasant, P.; Satitsri, S.; Moonwiriyaakit, A.; Pongkorpsakol, P.; Mattaveewong, T.; Pichyangkura, R.; Chatsudthipong, V. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. *Biochem Pharmacol* **2015**, *96*, 225–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wang, K.; Jin, X.; Chen, Y.; Song, Z.; Jiang, X.; Hu, F.; Conlon, M.A.; Topping, D.L. Polyphenol-Rich Propolis Extracts Strengthen Intestinal Barrier Function by Activating AMPK and ERK Signaling. *Nutrients* **2016**, *8*, 272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sun, X.; Du, M.; Navarre, D.A.; Zhu, M.J. Purple Potato Extract Promotes Intestinal Epithelial Differentiation and Barrier Function by Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Park, H.Y.; Kunitake, Y.; Hirasaki, N.; Tanaka, M.; Matsui, T. Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, *79*, 130–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

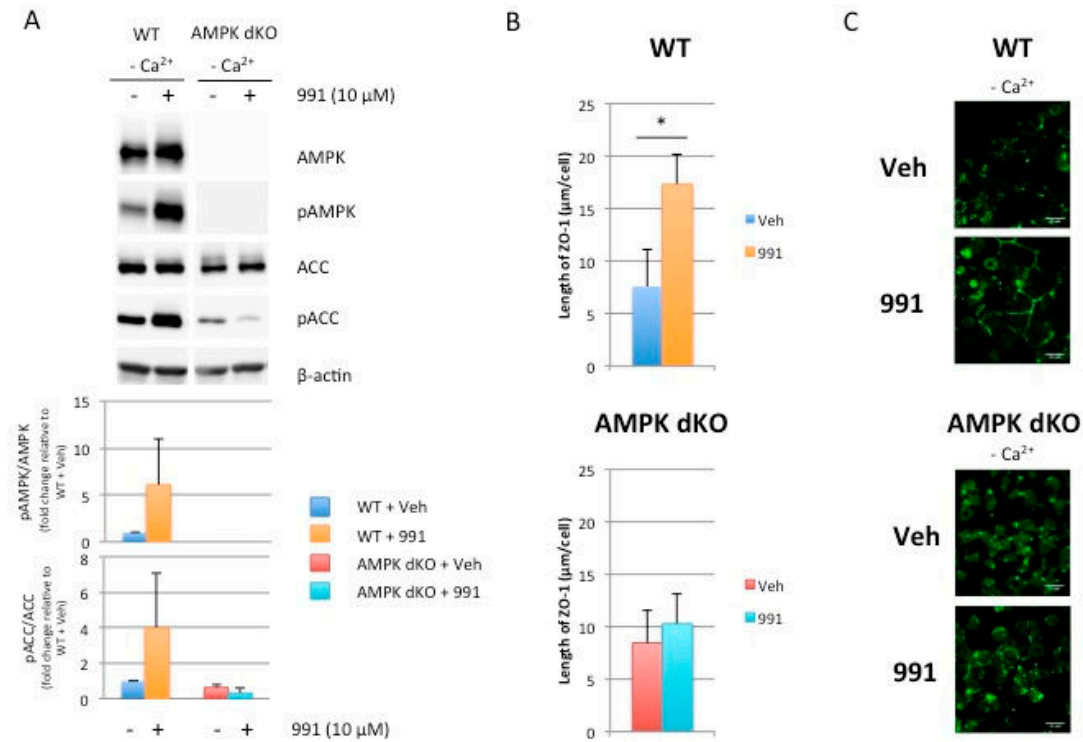


Suppl Figure S1: Characterization of AMPK α 1-deficient Caco2 cells. (A) Western blot analysis of AMPK α 1 and AMPK α 2 protein abundance in Caco-2 cells expressing non-targeted (WT) or *PRKAA1*-targeted sgRNAs (AMPK α 1 KO). Ponceau staining served as loading control. (B) Whole cell lysates of WT and AMPK α 1 KO Caco-2 cells treated with 10 μ M 991 were analyzed for the phosphorylation of ACC at Ser79. Expression of β -actin served as loading control.



Suppl Figure S2: Effect of acute pharmacological inhibition of AMPK in AMPK dKO Caco-2 cells on establishment of TEER after calcium switch. (A) Time course of TEER development in AMPK dKO Caco-2 cells subjected to a calcium switch in the presence or absence of the AMPK inhibitor SBI-0206965. Cells grown on Transwell filters were incubated in calcium-free medium for 16 hours and switched to normal calcium medium in the presence or absence of 5 μ M SBI-0206965. TEER was measured at the indicated time points after calcium switch and is given as fold change relative to the value in calcium-free medium at 0 hour time point (t0h). Data represent means \pm SD for three independent experiments (n=3). [#]*p*<0.05 versus 0 hour time point (t0h) for the same condition. (B) Cell lysates from AMPK dKO Caco-2 cells at steady-state (basal) or subjected to

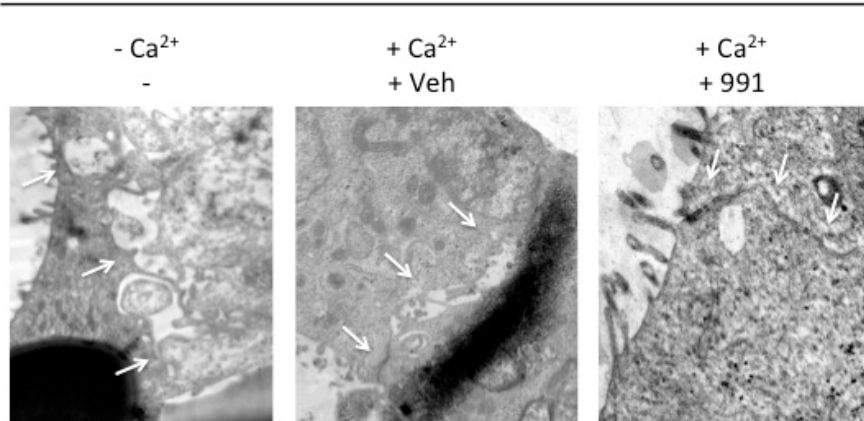
calcium switch (Ca^{2+} switch) and treated for 40 min with or without 5 μM SBI-0206965 were blotted with anti-ZO-1 antibodies. Expression of β -actin served as loading control.



Suppl Figure S3: AMPK activation promotes ZO-1 location at plasma membrane in the absence of calcium.

(A) Cells grown on Transwell filters were incubated in calcium-free medium for 16 hours and treated with or without 10 μM 991 for 15 min. Cell lysates were analyzed for Thr-172 phosphorylation and total AMPK expression, Ser-79 phosphorylation and total ACC expression by western blotting. Expression of β -actin served as loading control. Lower panels represent ratios of pAMPK:AMPK and pACC:ACC from quantification of immunoblot images. (B) Quantification and (C) representative immunostaining of ZO-1 deposition at cell-cell junction in WT and AMPK dKO Caco-2 cells incubated in calcium-free medium for 16 hours and treated with or without 10 μM 991 for 15 min.

WT



Suppl Figure S4: Effect of AMPK activation in Caco-2 cells on tight junction ultrastructure during calcium switch. Transmission electron microscopy ultrastructure of tight junction of monolayers of WT Caco-2 cells incubated in calcium-free medium, after calcium switch in the presence or absence of 10 μM 991 for 6 hours. Scale bar is 200 nm. Arrows indicate the localization of cell-cell junctions.

1.3) Les cibles de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées

Dans le but d'identifier les mécanismes par lesquels l'AMPK favorise le réassemblage des jonctions serrées dans le contexte du calcium switch, nous avons utilisé deux stratégies : une approche consistant à évaluer directement la phosphorylation de cibles connues de l'AMPK, et une autre approche plus globale consistant à identifier les voies de signalisation et notamment les protéines kinases impliquées dans ce processus.

La cinguline et la GIV

Nous avons tout d'abord identifié dans la littérature deux cibles phosphorylables par l'AMPK (Fig. 28), connues pour être impliquées dans la régulation des jonctions serrées des cellules épithéliales, la cinguline (Yano et al. 2013, Ducommun et al. 2015) et la GIV (Aznar et al. 2016). En premier lieu, nous avons souhaité savoir si ces protéines étaient phosphorylées par l'AMPK en réponse au calcium switch en présence du composé 991, et participaient au réassemblage des jonctions serrées dans les cellules Caco-2. Pour cela, nous avons étudié par Western blot, à l'aide de phospho-anticorps, les sites de phosphorylation par l'AMPK de la cinguline (Ser137) et de la GIV (Ser245) dans des lysats de cellules WT et AMPK KO récupérés 10min et 1h30 après le rajout de calcium dans le cadre d'une expérience de calcium switch. Nous avons effectué ces expériences en collaboration avec Pradipta Ghosh (UC San Diego) pour la GIV, et Kei Sakamoto et Robin Willows (Nestlé Institute of Health Sciences) pour la cinguline. Cependant, avec cette technique d'analyse, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de modulation de la phosphorylation de ces protéines dans les cellules WT traitées ou non avec le 991. A ce jour, nous ne pouvons pas conclure quant à leur implication dans le processus de réassemblage des jonctions serrées en réponse au calcium switch.

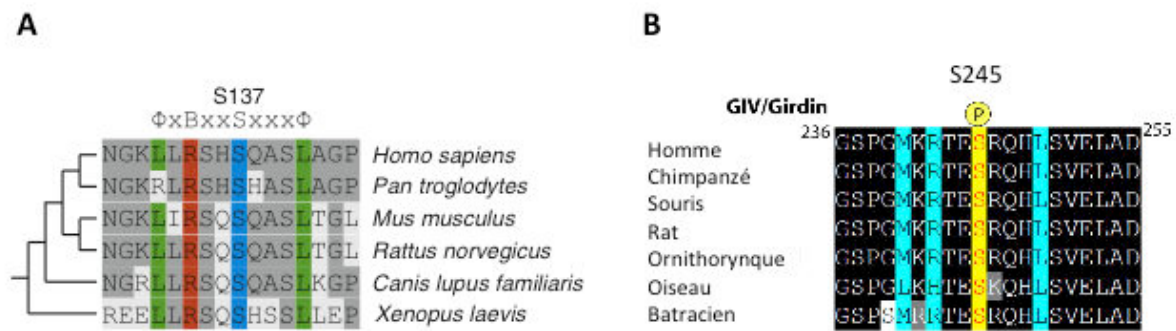


Figure 28 : *Alignement des séquences du site de phosphorylation par l'AMPK de la cinguline et la GIV dans différentes espèces.*

(A) Séquences de la cinguline chez le chimpanzé, la souris, le rat, le chien, et la grenouille alignées à celle chez l'homme. Le site consensus de l'AMPK est indiqué au dessus des séquences (B : résidu basique, ϕ : résidu hydrophobe). (B) Séquences de la GIV chez le chimpanzé, la souris, le rat, l'ornithorynque, l'oiseau, et la grenouille alignées à celle chez l'homme. (D'après (Ducommun et al. 2015, Aznar et al. 2016)).

Etude des kinases impliquées dans le mécanisme de réassemblage des jonctions

Dans un second temps, afin d'étudier les voies de signalisation impliquées dans le processus de réassemblage des jonctions serrées, nous avons utilisé un système de puces développées par la société PamGene (<https://www.pamgene.com/en/home.htm>). Ces puces permettent notamment de mesurer l'activité de sérine/thréonine kinases dans un échantillon donné de lysat cellulaire à partir de la phosphorylation de peptides initialement présents sur les puces (Fig. 29). Dans un contexte de calcium switch, nous avons récupéré les lysats cellulaires de cellules WT traitées ou non avec le 991 30min après l'ajout du calcium. L'analyse informatique de cette expérience a révélé que plusieurs protéines appartenant à la famille des PKC (PKC γ , PKC η , PKC ζ , PKC β , PKC α , PKC θ , et PKC δ) présentaient une activité kinase plus importante dans les cellules WT traitées avec le 991 par rapport aux cellules WT non traitées (Tableau 1). Or, les protéines PKC interviennent dans le maintien des protéines des jonctions serrées. Il a en particulier été montré que les PKC η et PKC ζ permettaient la phosphorylation de l'occludine, favorisant alors l'assemblage des jonctions serrées (Suzuki et al. 2009, Jain et al. 2011). Ainsi, ce résultat suggère que l'AMPK pourrait réguler certaines protéines

PKC dans le cadre du processus de réassemblage des jonctions. Il serait donc pertinent de vérifier l'état de phosphorylation de ces protéines dans notre modèle de calcium switch dans les cellules WT et AMPK KO traitées ou non avec le 991.

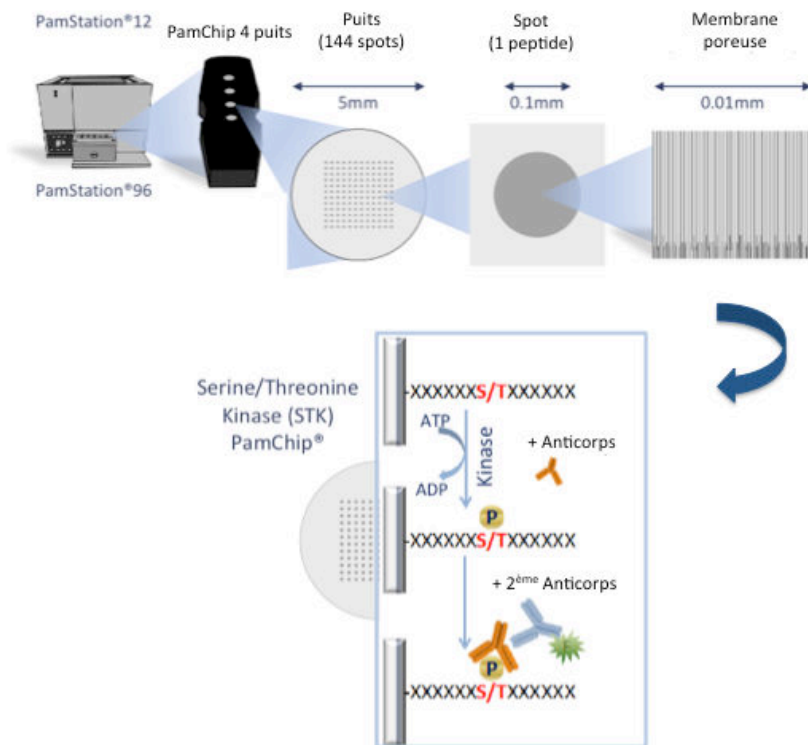


Figure 29 : *La méthodologie PamGene pour mesurer les profils d'activité des sérine/thréonine kinases.*

Chaque puce contient 4 puits contenant chacun 144 peptides immobilisés sur une membrane poreuse. Les séquences des peptides présentent 13 acides aminés, et un site de phosphorylation (issu de la littérature ou prédit par analyse informatique) qui est corrélé avec l'activité d'une ou plusieurs sérine/thréonine kinases. Des anticorps primaires anti-phosphosérine et anti-phosphothréonine, puis des anticorps secondaires fluorescents sont utilisés pour détecter l'activité de phosphorylation des kinases de l'échantillon (<https://www.pamgene.com/en/home.htm>).

Nom de la kinase	Score kinase
PKC γ	0,65
PKC η	0,65
PKC ζ	0,57
PKC β	0,42
PKC α	0,36
PKC θ	0,24
PKC δ	0,20

Tableau 1 : Liste des PKCs activées en réponse au calcium switch et au 991 dans les cellules WT.

Ces analyses ont été effectuées via l'utilisation du logiciel BioNavigator. Le score kinase est calculé en fonction des différents peptides phosphorylés et reflète l'activité des kinases dans les échantillons traités au 991. Les scores de l'ensemble des kinases activées dans la condition avec le 991 sont compris entre 0 et 3,2 ; plus le score est élevé, plus l'activité de la kinase est importante.

2) Conséquences de l'absence de l'AMPK intestinale chez la souris

2.1) Analyse phénotypique des souris invalidées pour l'AMPK intestinale en condition basale

Dans le but d'étudier le rôle de l'AMPK au niveau de la barrière épithéliale intestinale, notre laboratoire a généré un modèle constitutif de souris invalidées pour les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK (AMPK KO) dans l'intestin. Ce modèle, invalidé pour l'AMPK spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales, a été obtenu en croisant des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la villine (el Marjou et al. 2004) et des souris floxées pour les gènes codant les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$.

Caractérisation du modèle

Nous avons analysé l'expression des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK par Western blot dans les cellules épithéliales intestinales isolées de différents segments de l'intestin, à savoir le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le côlon proximal et le côlon distal, des souris

WT et AMPK KO. Chez les souris WT, les deux isoformes sont exprimées et, de manière intéressante, nous avons constaté un gradient d'expression le long de l'axe antéro-postérieur l'intestin avec notamment une plus forte expression au niveau distal dans le côlon. Les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ne sont pas détectées dans les cellules épithéliales intestinales des souris AMPK KO ; de plus, l'expression des deux isoformes dans le foie est identique entre les souris WT et AMPK KO, confirmant ainsi la délétion spécifique dans les cellules épithéliales intestinales (Fig. 30).

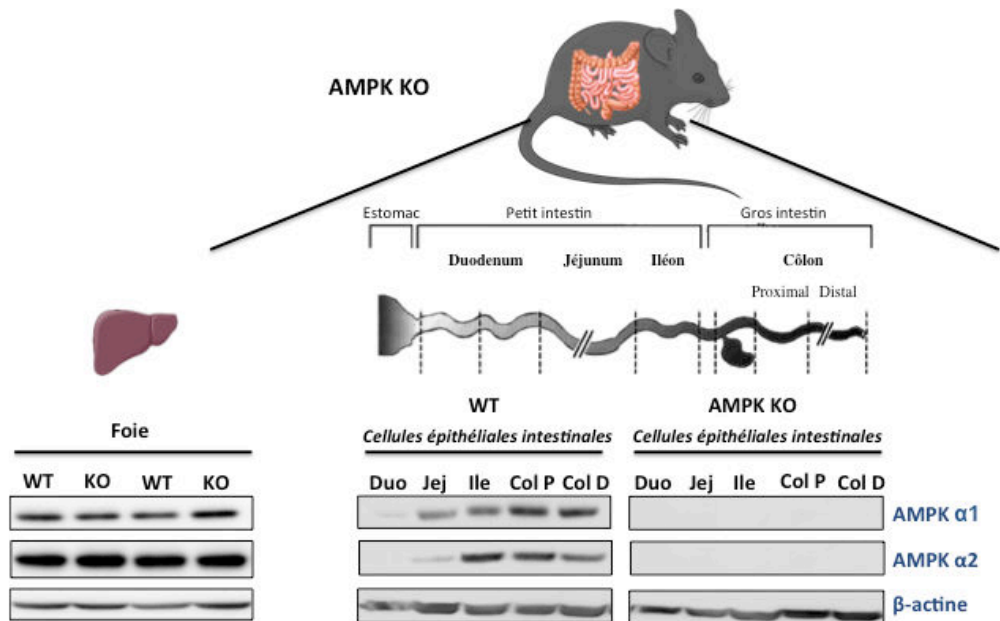


Figure 30 : Caractérisation du modèle de souris invalidées pour les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales.

Analyse par Western blot de l'expression des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK chez les souris WT et AMPK KO dans les cellules épithéliales intestinales du duodénum, jéjunum, iléon, côlon proximal, côlon distal et dans les hépatocytes. La beta-actine a été utilisée comme de témoin de charge.

Une analyse phénotypique plus fine des effets de la délétion de l'AMPK sur la fonction intestinale a été entreprise par Malvyne Rolli-Derkinderen et Camille Pochard de l'unité de recherche TENS à Nantes, avec qui nous avons collaboré sur ce projet. Aucune différence n'a été observée entre les souris WT et AMPK KO au niveau du poids des souris, de la longueur de l'intestin, du temps de transit, du nombre, du poids, et de l'humidité des fèces (données non publiées).

Perméabilité intestinale

Afin d'évaluer l'intégrité de la barrière intestinale chez les souris, nous avons mesuré la perméabilité paracellulaire au dextran 4 kDa *in vivo* et *ex vivo*, dans des chambres de Ussing, de plusieurs segments de l'intestin. *In vivo*, nous n'avons pas observé de différence entre les souris WT et AMPK KO (Fig. 31A) ; cependant, nous avons montré que les souris AMPK KO présentaient une augmentation de la perméabilité *ex vivo* au niveau du côlon distal (Fig. 31B). Dans la mesure où la perméabilité intestinale chez les souris AMPK KO est uniquement affectée dans le côlon distal, cela pourrait expliquer l'absence de différence entre les souris WT et AMPK KO dans la perméabilité *in vivo*, laquelle reflète une perméabilité intestinale globale des animaux. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans le maintien de la barrière épithéliale intestinale, notamment au niveau du côlon distal.

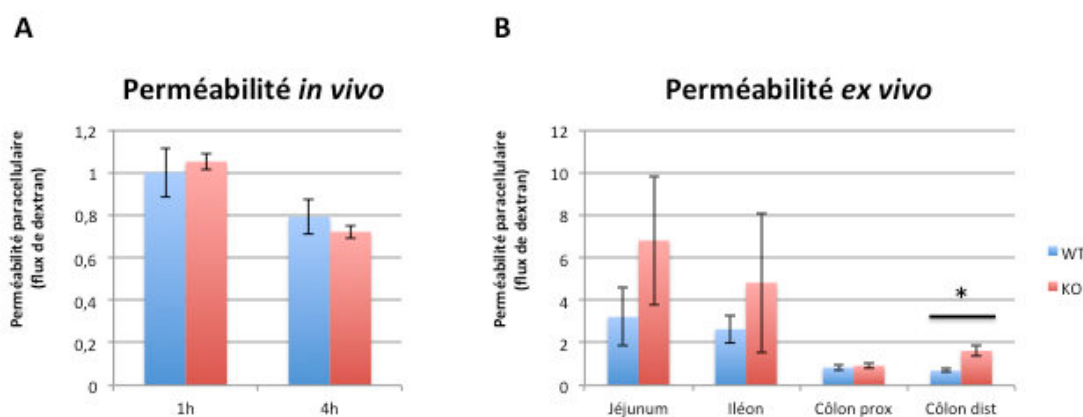


Figure 31 : La délétion de l'AMPK intestinale induit une augmentation de la perméabilité au niveau du côlon distal.

(A) Perméabilité paracellulaire *in vivo* évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-FITC 4 kDa dans le sérum 1h et 4h après gavage des souris. Les valeurs sont normalisées par rapport au groupe WT au temps 1h. (B) Perméabilité paracellulaire *ex vivo* dans le jéjunum, l'iléon, le côlon proximal et le côlon distal évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-FITC durant une période de 3h. * $P < 0,05$.

2.2) Conséquences phénotypiques de l'invalidation de l'AMPK intestinale dans différents modèles pathologiques

Suite à ces premiers résultats, nous avons investigué les conséquences de l'absence de l'AMPK dans des modèles pathologiques présentant des dysfonctions de la barrière intestinale. Pour induire des altérations de l'épithélium, nous avons travaillé sur un premier modèle de colite induite par un traitement au DSS et sur un second modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique.

2.2.1) Modèle de colite induite par un traitement au DSS

Nous avons travaillé sur un modèle de colite dans le but de mimer les symptômes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) retrouvées chez l'homme. En effet, comme nous l'avons décrit dans la partie introductive, les MICI sont associées à des phénomènes d'hyperperméabilité. En conséquence, le modèle de colite nous semblait pertinent pour étudier le rôle de l'AMPK dans la fonction barrière. Pour induire la colite, nous avons traité les souris WT et AMPK KO de la lignée constitutive avec du DSS, un agent chimique qui a pour effet de détruire la muqueuse du côlon et d'induire une inflammation au niveau intestinal. Le DSS est couramment utilisé dans les modèles murins pour mimer les symptômes des MICI (Chassaing et al. 2014).

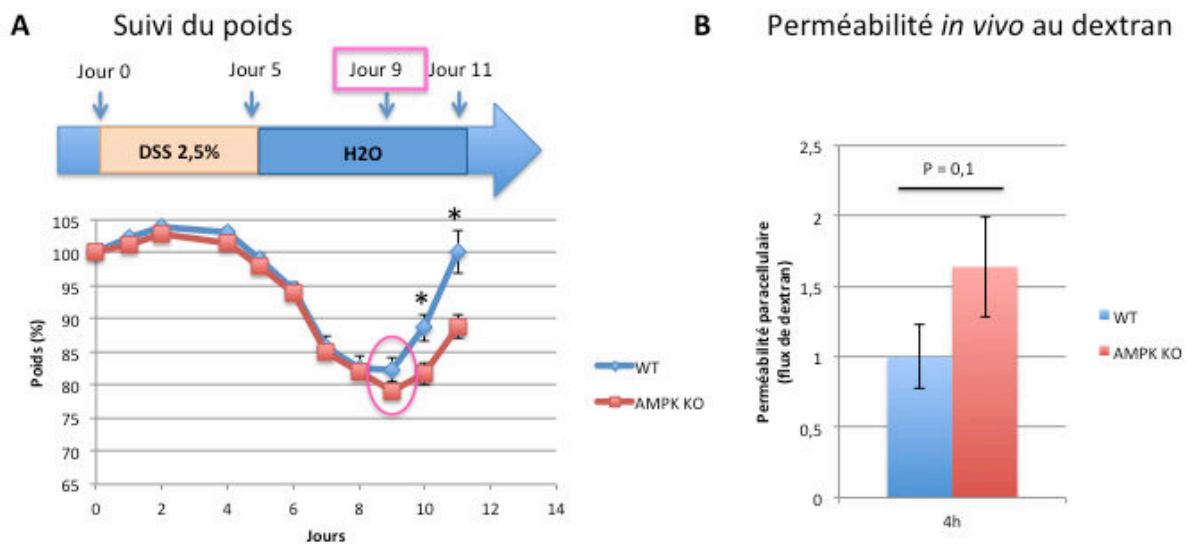
Dans le cadre de notre protocole expérimental de colite induite par le DSS, deux phases sont observables : une première phase caractérisée par le développement de lésions intestinales et une seconde par le processus de cicatrisation de l'intestin, lesquelles sont respectivement associées à une perte de poids suivi d'un gain de poids chez l'animal. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la phase de ré-épithélisation.

Suivi du poids, perméabilité intestinale, paramètres inflammatoires et jonctions serrées

Lors de la phase d'altération de la barrière intestinale, la perte de poids est similaire entre les souris WT et AMPK KO. Au contraire, lors de la phase de récupération,

les souris AMPK KO présentent un retard dans la reprise de poids par rapport aux souris WT (Fig. 32A). Pour expliquer ce défaut chez les souris AMPK KO, nous avons évalué plusieurs paramètres reflétant l'intégrité de la barrière intestinale au moment de l'initiation de la phase de regain de poids, à savoir au jour 9 de l'expérimentation. Tout d'abord, au jour 9, nous avons observé une tendance à une perméabilité *in vivo* augmentée au dextran 4 kDa chez les souris AMPK KO (Fig. 32B), associée à une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées ZO-1 et occludine au sein du côlon distal (Fig. 32C). Cette altération de la barrière intestinale plus prononcée chez les souris AMPK KO est également corrélée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL1 β , et TNF α dans le côlon distal (Fig. 32D). De manière concordante avec ces résultats sur l'inflammation intestinale, l'analyse histologique des côlons des souris WT et AMPK KO au jour 9 a révélé des zones de dégradations de la muqueuse intestinale dépourvues de cellules épithéliales plus importantes chez les souris AMPK KO, notamment au niveau de la partie distale du côlon (Fig. 32E).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'AMPK joue un rôle notable dans le processus de ré-épithélisation de l'intestin.



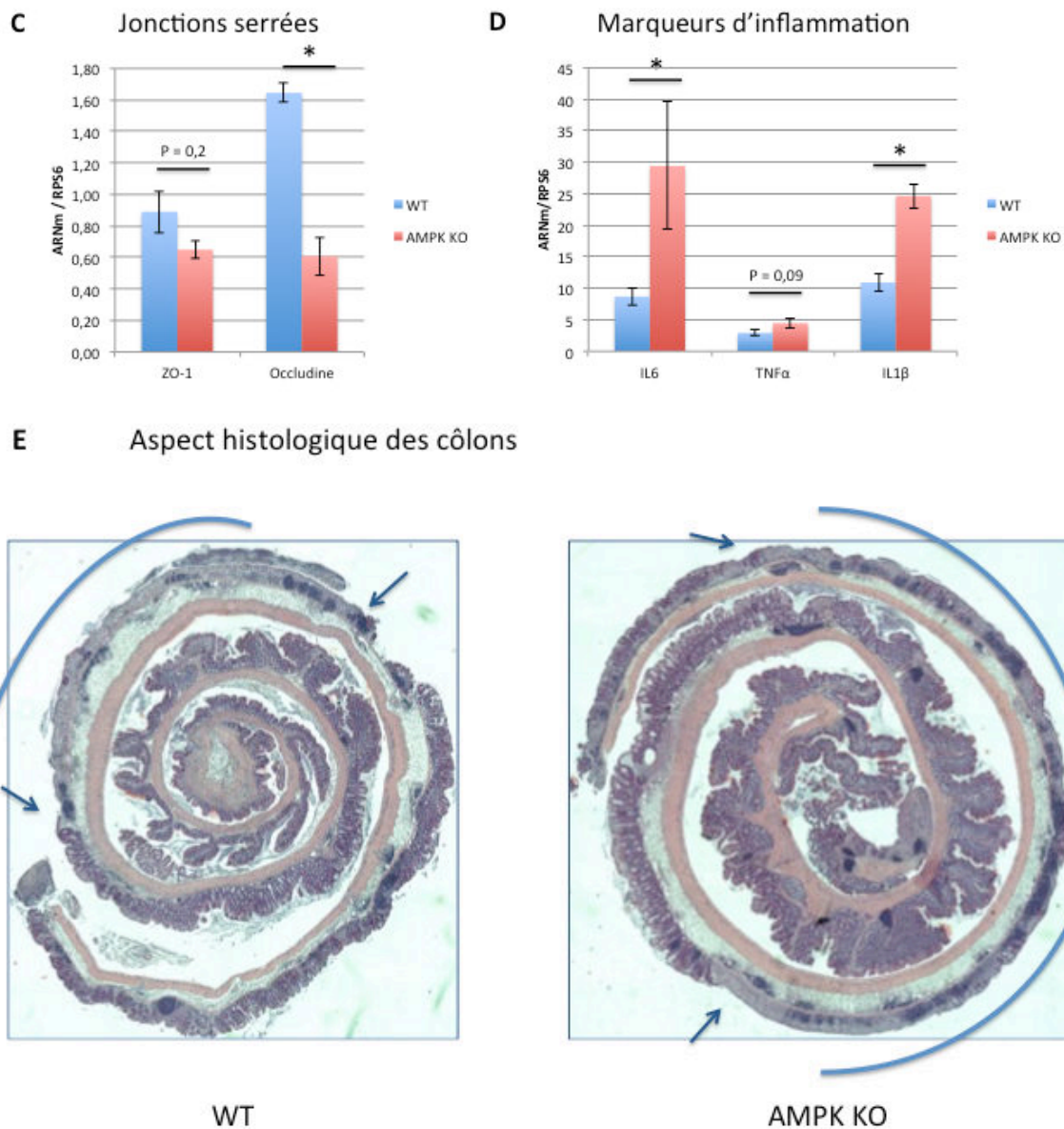


Figure 32 : La délétion de l'AMPK intestinale entraîne un délai dans le processus de ré-épithélisation dans un contexte de colite induite par le DSS.

(A) Suivi du poids corporel des souris WT et AMPK KO pendant et après le traitement au DSS. Les résultats sont exprimés en pourcentage du poids initial. (B) Perméabilité paracellulaire in vivo évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-FITC 4 kDa dans le sérum 4h après gavage des souris WT et AMPK KO. Les valeurs sont normalisées par rapport au groupe WT au temps 4h. (C) Expression des ARNm de ZO-1 et de l'occludine dans le tissu entier du côlon distal. (D) Expression des ARNm de l'IL6, du TNFα, et de l'IL1β dans le tissu entier du côlon distal. (E) Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des côlons entiers des souris WT et AMPK KO. Le côlon proximal se trouve à l'intérieur du swiss-roll, et le côlon distal à l'extérieur (grossissement x10). * P<0,05.

2.2.2) Modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique

2.2.2.a) Effets de la délétion constitutive de l'AMPK intestinale

Afin d'investiguer le rôle de l'AMPK dans le contexte d'une autre pathologie associée à des dysfonctions de la barrière intestinale, nous avons travaillé sur un modèle d'obésité sur la lignée constitutive de souris invalidées pour l'AMPK intestinale. Pour cela, nous avons nourri des souris WT et AMPK KO selon un régime contrôle ou un régime gras (60% des calories apportées par les lipides) pendant une période de 10 semaines.

Paramètres métaboliques

Au cours du temps, nous observons bien un effet du régime gras sur le gain de poids, mais il n'y a pas de différence entre les souris WT et AMPK KO (Fig. 33A). En fin de régime, nous avons mesuré certains paramètres métaboliques de ces souris. De manière concordante avec le gain de poids, nous observons à nouveau un effet du régime sur le développement de la masse grasse (Fig. 33B) et sur la sensibilité à l'insuline (Fig. 33C). Toutefois, les effets du régime gras sur la tolérance au glucose sont peu marqués (Fig. 33D). Pour chacun de ces paramètres, nous n'avons pas mis en évidence de différences entre les souris WT et AMPK KO pour chaque régime.

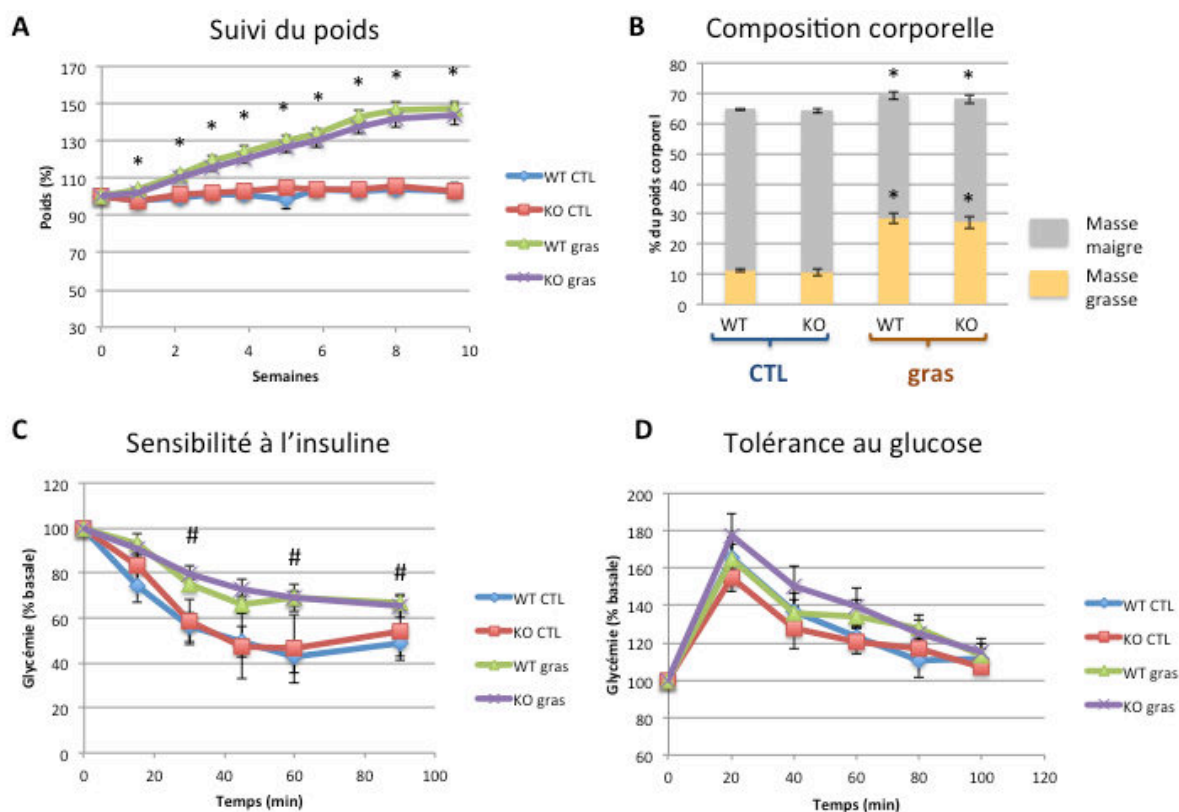


Figure 33 : Les souris WT et AMPK KO ne présentent pas de différence dans leurs paramètres métaboliques sous régime contrôle ou gras.

(A) Suivi de la masse corporelle des souris WT et AMPK KO au cours des régimes contrôle (CTL) et gras exprimée en pourcentage de la masse basale. (B) Masses maigre et grasse des souris WT et AMPK KO sous régimes contrôle et gras exprimées en pourcentage de la masse corporelle en fin de régime. (C) Tests de sensibilité à l'insuline et (D) de tolérance au glucose chez les souris WT et AMPK KO sous régimes contrôle et gras effectués en fin de régime. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la glycémie basale. *, # $P < 0,05$; * WT CTL vs WT gras ou KO CTL vs KO gras, # WT CTL vs WT gras.

Perméabilité intestinale

Nous avons évalué l'intégrité de la barrière intestinale par la mesure de la perméabilité paracellulaire *in vivo* et *ex vivo* en fin de régime. De manière surprenante, nous n'avons pas observé d'augmentation de la perméabilité *in vivo* chez les souris sous régime gras par rapport aux souris sous régime contrôle, ni avec l'utilisation du dextran 4 kDa (Fig. 34A), ni avec l'acide sulfonique d'une taille plus petite de 0,4 kDa (Fig. 34B). Malgré ce résultat, nous avons toutefois analysé la perméabilité *ex vivo* au dextran 4 kDa

au niveau du côlon distal de ces souris dans la mesure où nous avons précédemment montré des différences de perméabilité entre les souris WT et AMPK KO en condition basale dans cette région de l'intestin (Fig. 31B). La comparaison de la perméabilité entre les souris WT et AMPK KO sous chacun des régimes a permis de mettre en évidence une perméabilité exacerbée chez les souris AMPK KO sous régime gras par rapport aux souris WT. En effet, sous régime contrôle, les souris AMPK KO tendent à avoir une perméabilité augmentée de 1,6 fois par rapport aux souris WT, confirmant nos précédents résultats, tandis que sous régime gras, les souris AMPK KO présentent une perméabilité 2,6 fois plus importante par rapport aux souris WT (Fig. 34C).

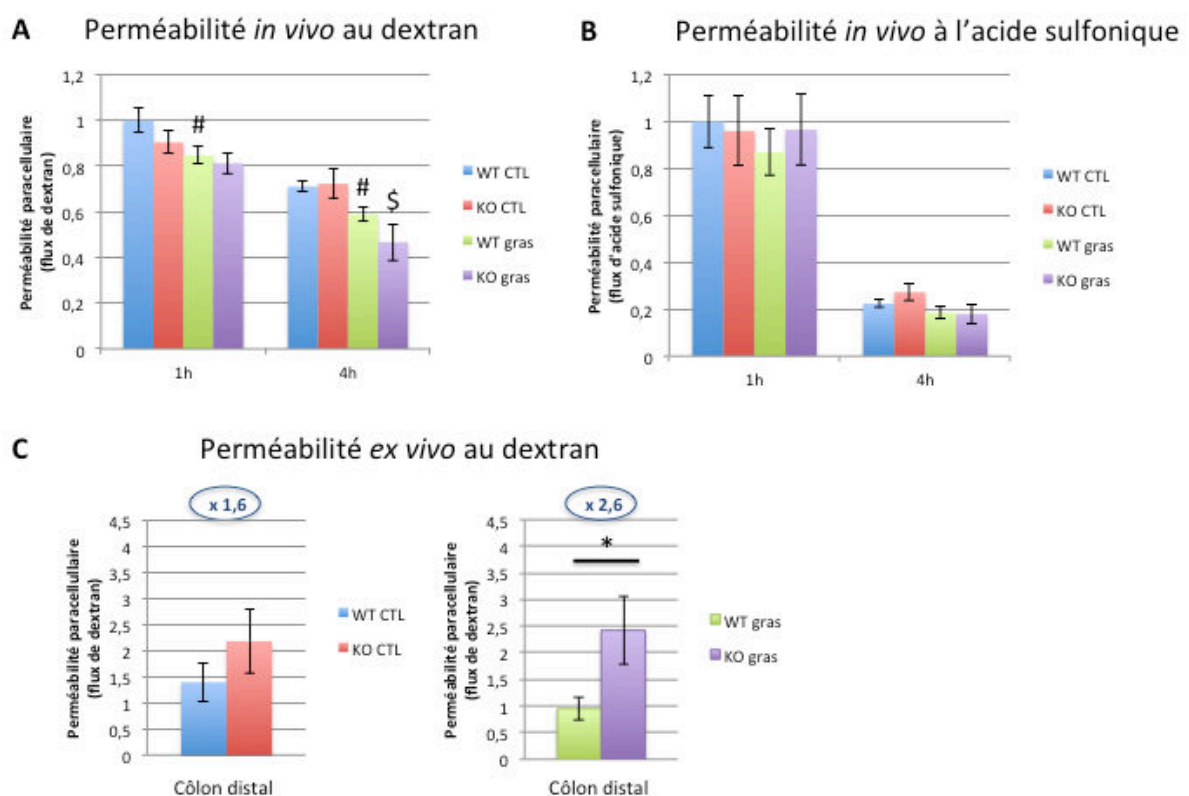


Figure 34 : Les souris AMPK KO sous régime gras présentent une perméabilité exacerbée au niveau du côlon distal.

(A) Perméabilité paracellulaire *in vivo* évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-TRITC 4 kDa et (B) la quantité d'acide sulfonique-FITC 0,4 kDa dans le sérum 1h et 4h après gavage des souris WT et AMPK KO. Les valeurs sont normalisées par rapport au groupe WT au temps 1h. (C) Perméabilité paracellulaire *ex vivo* dans le côlon distal des souris WT et AMPK KO évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-FITC durant une période de 3h. #, \$, * $P < 0,05$; # WT CTL vs WT gras, \$ KO CTL vs KO gras, * WT gras vs KO gras.

Paramètres inflammatoires et jonctions serrées

Afin de compléter ces résultats sur la perméabilité au niveau du côlon distal, nous avons mesuré, d'une part, des paramètres inflammatoires dans les cellules de la lamina propria du côlon distal et, d'autre part, l'expression transcriptionnelle des protéines des jonctions serrées dans les cellules épithéliales du côlon distal. Tout d'abord, nous avons observé un effet du régime gras sur l'altération de la barrière intestinale avec une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL1 β , et TNF α (Fig. 35A), et une diminution de l'expression des protéines occludine et ZO-1 chez les souris WT et AMPK KO (Fig. 35B). Sous régime contrôle, les souris AMPK KO présentent une diminution de l'occludine par rapport aux souris WT, et sous régime gras, les souris AMPK KO tendent à exprimer plus d'IL6 par rapport aux souris WT ; ces résultats peuvent expliquer les différences de perméabilité observées entre les deux génotypes sous chacun des régimes. Cependant, nous n'avons pas trouvé de différences pour les autres marqueurs étudiés.

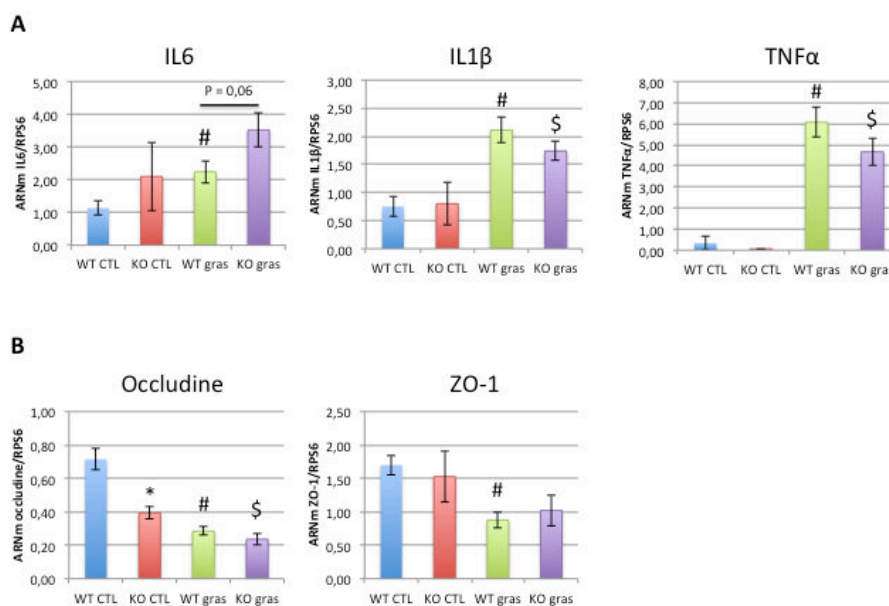


Figure 35 : Effet du régime gras et de la délétion de l'AMPK sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des protéines des jonctions serrées du côlon distal.

(A) Expression des ARNm de l'IL6, de l'IL1 β , et du TNF α dans les cellules de la lamina propria du côlon distal. (B) Expression des ARNm de l'occludine et de ZO-1 dans les cellules épithéliales du côlon distal. #, \$, * P<0,05 ; # WT CTL vs WT gras, \$ KO CTL vs KO gras, * WT CTL vs KO CTL.

Ainsi, malgré une exacerbation de la perméabilité du côlon distal chez les souris AMPK KO sous régime gras associée à une augmentation de l'IL6, ce défaut n'est pas suffisant pour induire des altérations métaboliques majeures et un développement plus rapide de l'obésité par rapport aux souris WT.

2.2.2.b) Effets de la délétion inductible de l'AMPK intestinale

Suite à ces résultats sur la lignée constitutive où peu de différences ont été mises en évidence entre les souris WT et AMPK KO sous régime gras, nous avons souhaité reproduire ce schéma expérimental sur la lignée de souris inductibles pour l'inactivation de l'AMPK au niveau des cellules épithéliales intestinales. En effet, l'utilisation d'une lignée inductible permet d'éviter d'éventuels phénomènes de compensation qui peuvent se mettre en place au cours du développement de la lignée constitutive. Dans la suite de cette partie, nous appellerons les souris invalidées pour l'AMPK de manière inductible iAMPK KO. De même que pour la lignée constitutive, nous avons nourri des souris WT et iAMPK KO selon un régime gras (60% des calories apportées par les lipides), mais sur une période plus longue de 16 semaines.

Paramètres métaboliques

De manière similaire aux souris de la lignée constitutive, nous avons observé des effets du régime gras sur le gain de poids au cours du régime (Fig. 36A) et sur le développement de la masse grasse en fin de régime (Fig. 36B). Les effets du régime gras sont à nouveau peu marqués pour la tolérance au glucose (Fig. 36C). Toutefois, les souris WT et iAMPK KO au sein de chaque régime ne présentent pas de différences majeures au niveau de ces paramètres métaboliques. Nous pouvons même noter qu'en fin de régime, les souris WT sous régime gras présentent un poids plus élevé par rapport aux souris iAMPK KO (Fig. 36A).

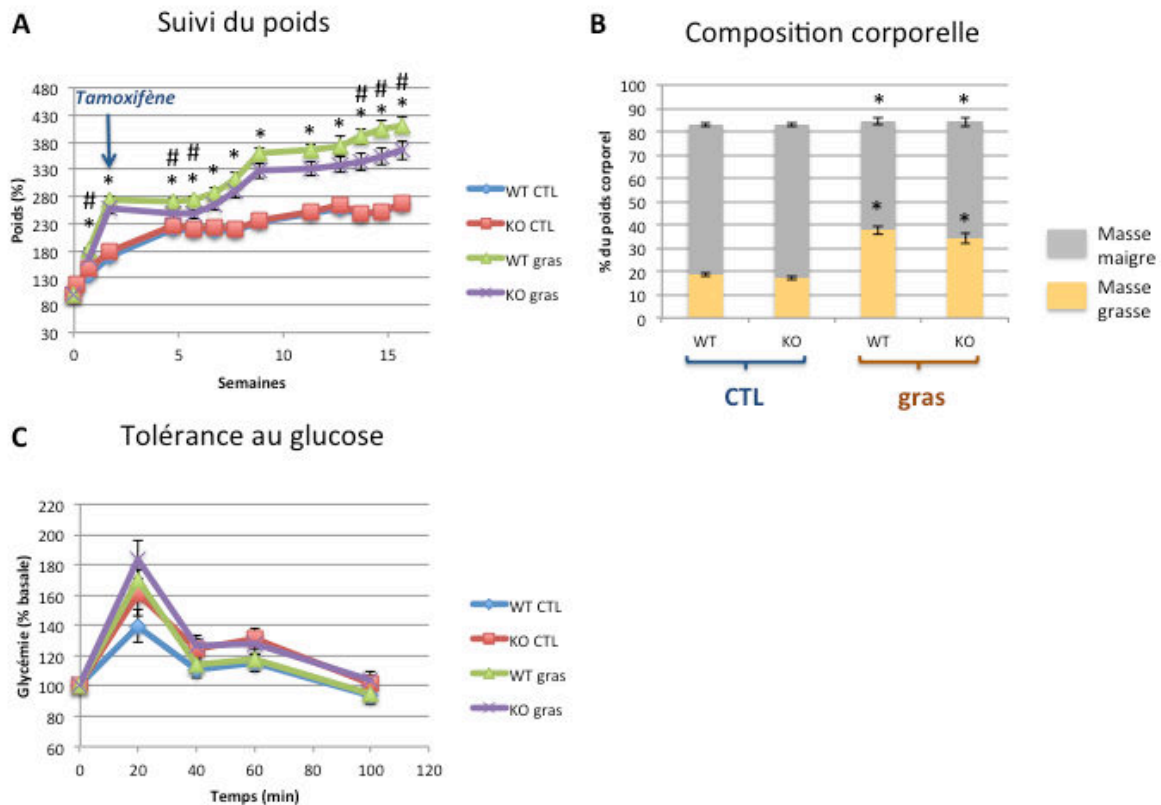


Figure 36 : Les souris WT et iAMPK KO ne présentent pas de différence dans leurs paramètres métaboliques sous régimes contrôle ou gras.

(A) Suivi de la masse corporelle des souris WT et iAMPK KO au cours des régimes exprimée en pourcentage de la masse basale. Les injections au tamoxifène sont indiquées par la flèche bleue. (B) Masses maigre et grasse des souris WT et iAMPK KO sous régimes contrôles et gras exprimées en pourcentage de la masse corporelle en fin de régime. (C) Test de tolérance au glucose chez les souris WT et iAMPK KO sous régimes contrôle et gras effectués en fin de régime. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la glycémie basale. *, # $P < 0,05$; * WT CTL vs WT gras ou KO CTL vs KO gras, # WT gras vs KO gras.

Perméabilité intestinale

De même que pour la lignée constitutive, nous avons mesuré la perméabilité paracellulaire *in vivo* et *ex vivo* au niveau du côlon distal chez les souris WT et iAMPK KO en fin de régime. Comme dans la lignée constitutive, nous n'avons pas observé d'augmentation de la perméabilité *in vivo* au dextran 4 kDa chez les souris sous régime gras (Fig. 37A), cependant la perméabilité *in vivo* à l'acide sulfonique 0,4 kDa était augmentée de manière équivalente chez les souris WT et iAMPK KO sous régime gras

par rapport aux souris sous régime contrôle (Fig. 37B). Concernant la perméabilité *ex vivo* au niveau du côlon distal, nous avons observé une augmentation de la perméabilité chez les souris iAMPK KO par rapport aux souris WT sous régime contrôle, augmentation davantage prononcée au sein de cette lignée par rapport à la lignée constitutive. Toutefois, contrairement à la lignée constitutive, les souris iAMPK KO sous régime gras ne présentent pas d'hyperperméabilité par rapport aux souris WT (Fig. 37C).

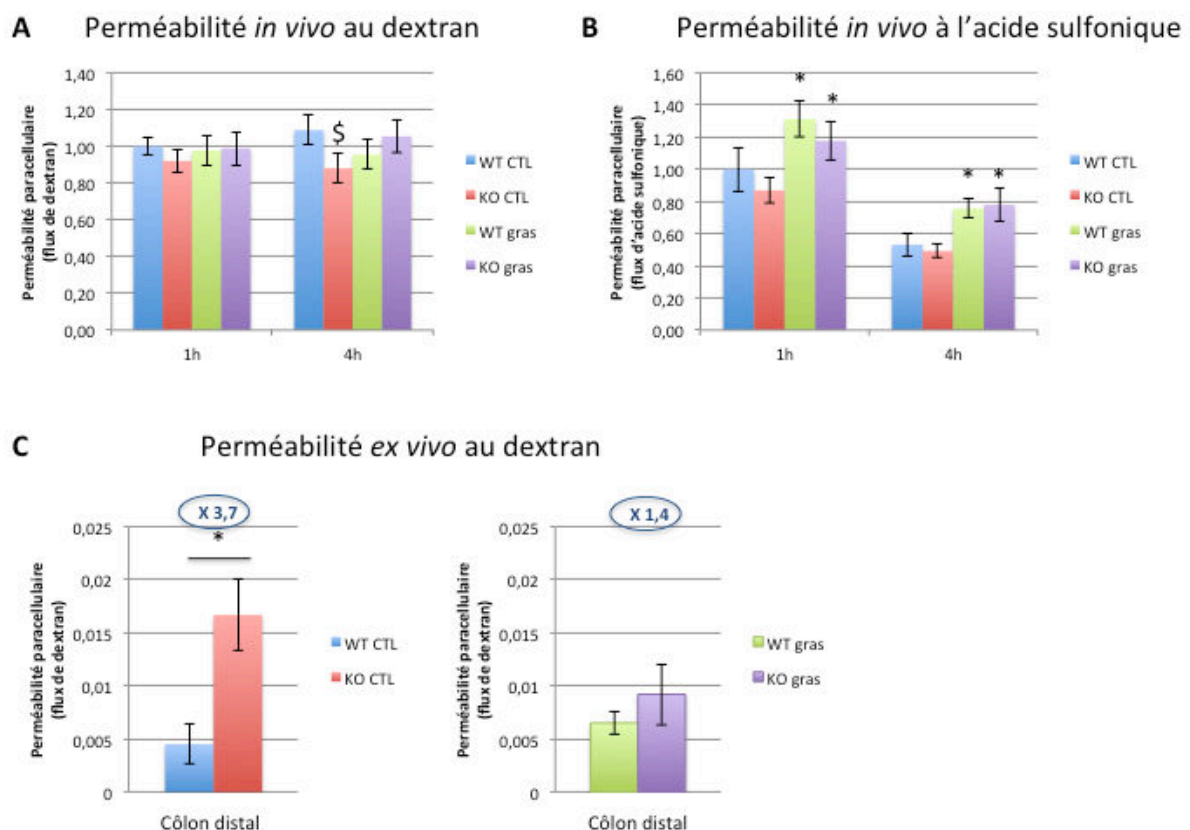


Figure 37 : Les souris iAMPK KO présentent une hyperperméabilité au niveau du côlon distal sous régime contrôle et non sous régime gras.

(A) Perméabilité paracellulaire *in vivo* évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-TRITC 4 kDa et (B) la quantité d'acide sulfonique-FITC 0,4 kDa dans le sérum 1h et 4h après gavage des souris WT et iAMPK KO. Les valeurs sont normalisées par rapport au groupe WT au temps 1h. (C) Perméabilité paracellulaire *ex vivo* dans le côlon distal des souris WT et iAMPK KO évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-FITC durant une période de 3h. \$, * P < 0,05 ; \$ WT CTL vs KO CTL, * WT CTL vs WT gras ou KO CTL vs KO gras.

Paramètres inflammatoires et jonctions serrées

Au niveau du tissu entier du côlon distal, nous avons observé sous régime gras une augmentation des cytokines IL6 et TNF α chez les souris WT et iAMPK KO par rapport aux souris sous régime contrôle, reflétant ainsi l'inflammation de bas grade dans le modèle d'obésité ; cependant il n'y a pas de différence significative entre les deux génotypes. L'expression de l'IL1 β ne semble pas être impactée par le régime gras, cependant, sous chacun des régimes, nous avons montré une diminution de son expression chez les souris iAMPK KO, ce qui pourrait constituer une caractéristique propre de ces souris (Fig. 38A). Concernant les protéines des jonctions serrées, aucune variation de ZO-1 n'a été observée, et les souris iAMPK KO présentent une diminution de l'occludine par rapport aux souris WT sous chacun des régimes, sans pour autant être plus prononcée sous régime gras (Fig. 38B). Ce dernier résultat pourrait suggérer des défauts de la barrière chez les souris iAMPK KO.

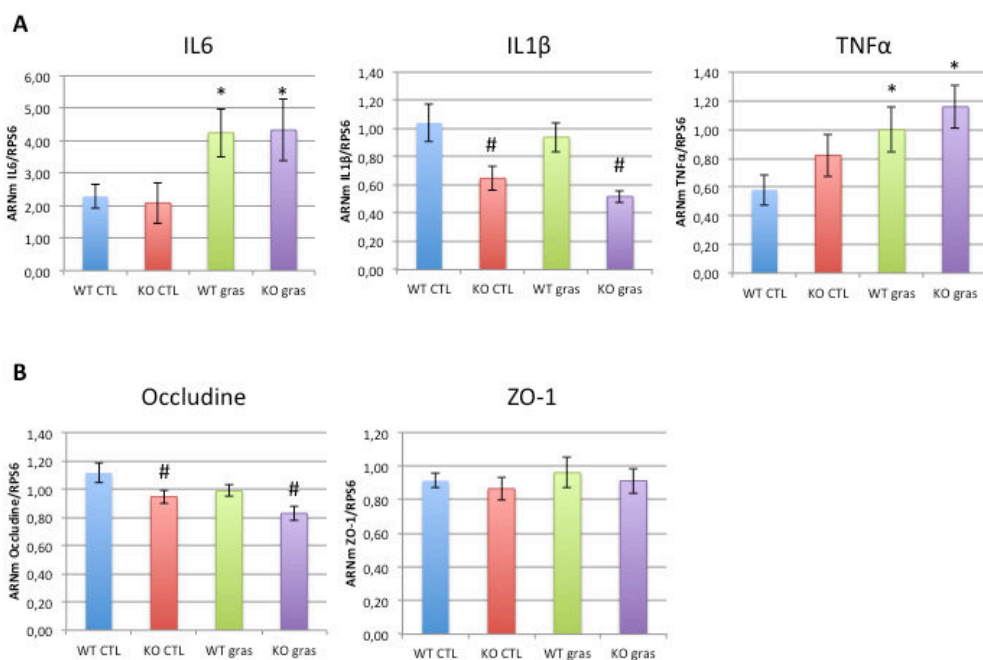


Figure 38 : *Effet du régime gras et de la délétion inducible de l'AMPK sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des protéines des jonctions serrées au niveau du côlon distal.*

(A) Expression des ARNm de l'IL6, de l'IL1 β , et du TNF α dans le tissu entier du côlon distal.

(B) Expression des ARNm de l'occludine et de ZO-1 dans le tissu entier du côlon distal. *, # $P < 0,05$; * WT CTL vs WT gras ou KO CTL vs KO gras, # WT CTL vs KO CTL ou WT gras vs KO gras.

Nous avons également évalué les effets de la délétion inductible de l'AMPK sur le développement de l'inflammation du tissu adipeux viscéral. De même que dans le côlon distal, nous avons analysé l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6, IL1 β , et TNF α . En réponse au régime gras, nous observons une augmentation du TNF α et une tendance à une augmentation de l'IL6, mais nous n'avons pas montré d'augmentation de l'IL1 β (Fig. 39). Cependant, les souris iAMPK KO sous régime gras ne présentent pas une inflammation augmentée au niveau du tissu adipeux par rapport aux souris WT.

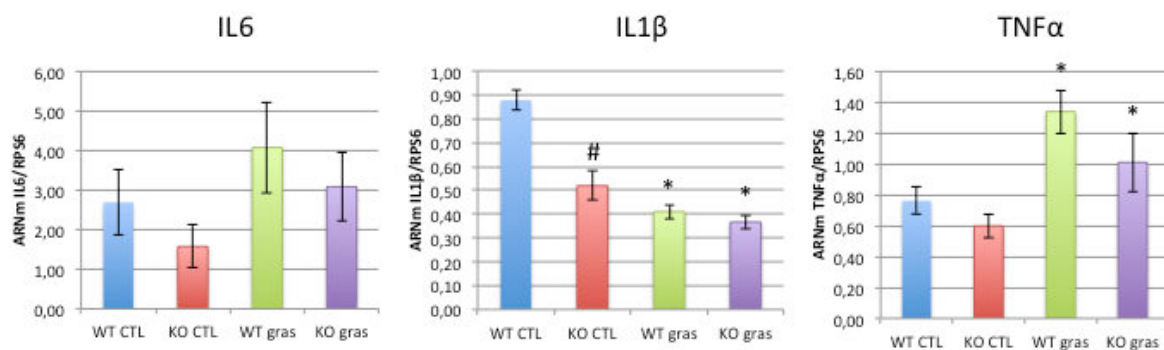
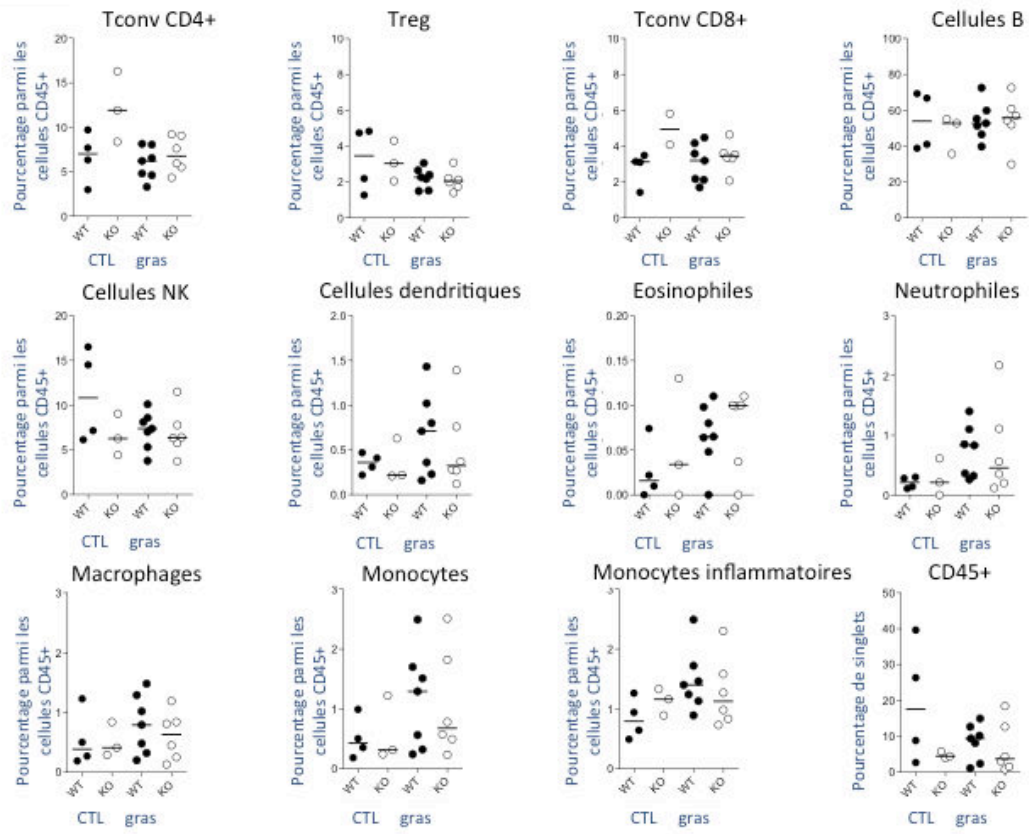


Figure 39 : Effets du régime gras et de la délétion inductible de l'AMPK sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux viscéral.

Expression des ARNm de l'IL6, de l'IL1 β , et du TNF α dans le tissu adipeux viscéral. #, * P<0,05 ; # WT CTL vs KO CTL, * WT CTL vs WT gras ou KO CTL vs KO gras.

Etude des populations immunes dans le côlon et le tissu adipeux viscéral

Dans le but de compléter ces analyses des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon et le tissu adipeux viscéral, nous avons réalisé une étude plus fine des populations des cellules immunes présentes dans ces deux tissus par cytométrie en flux. Ces expériences ont été menées en collaboration avec Benoit Salomon et Jordane Divoux au Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI) à Paris. L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence sous régime gras l'infiltration du côlon (Fig. 40A) et du tissu adipeux viscéral (Fig. 40B) par les cellules myéloïdes telles que les cellules dendritiques, les éosinophiles, les macrophages et les monocytes. Ainsi, le régime gras exerce bien un effet sur les populations de cellules immunes, mais à nouveau la délétion inductible de l'AMPK au niveau intestinal n'induit pas de variations au sein de ces populations.



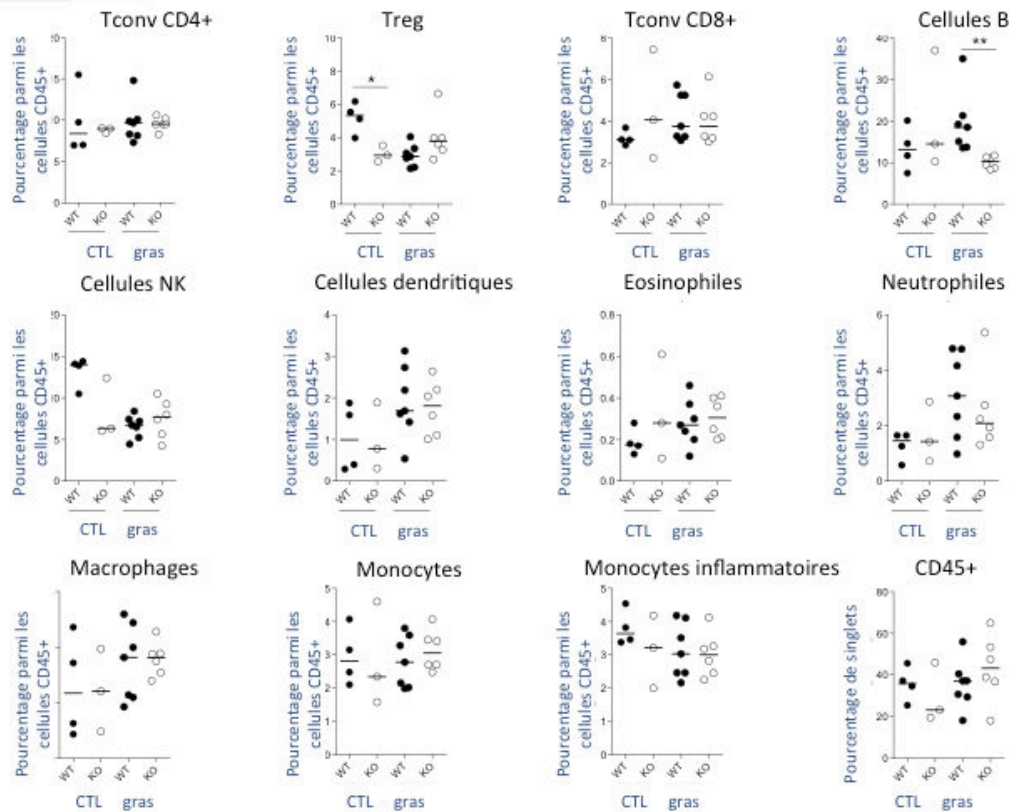


Figure 40 : Le régime gras induit une infiltration des cellules myéloïdes dans le côlon et le tissu adipeux viscéral.

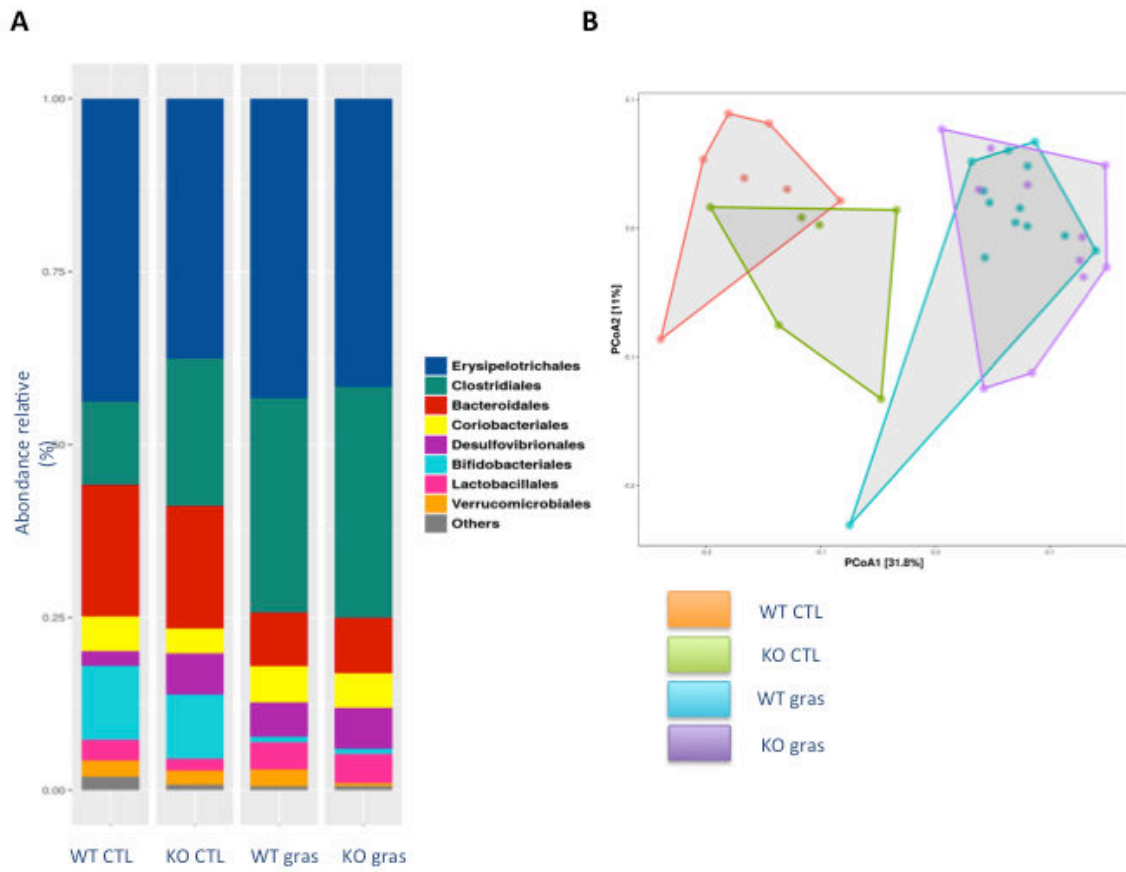
(A) Etude des cellules T conventionnelles CD4+, des lymphocytes T régulateurs, des cellules T conventionnelles CD8+, des cellules B, des cellules « natural killer » NK, des cellules dendritiques, des éosinophiles, des neutrophiles, des macrophages, des monocytes, des monocytes inflammatoires, et des cellules CD45+ dans le côlon et (B) dans le tissu adipeux viscéral. La population de chaque type de cellule est exprimée en pourcentage par rapport à l'ensemble des cellules CD45+.

Etude du microbiote

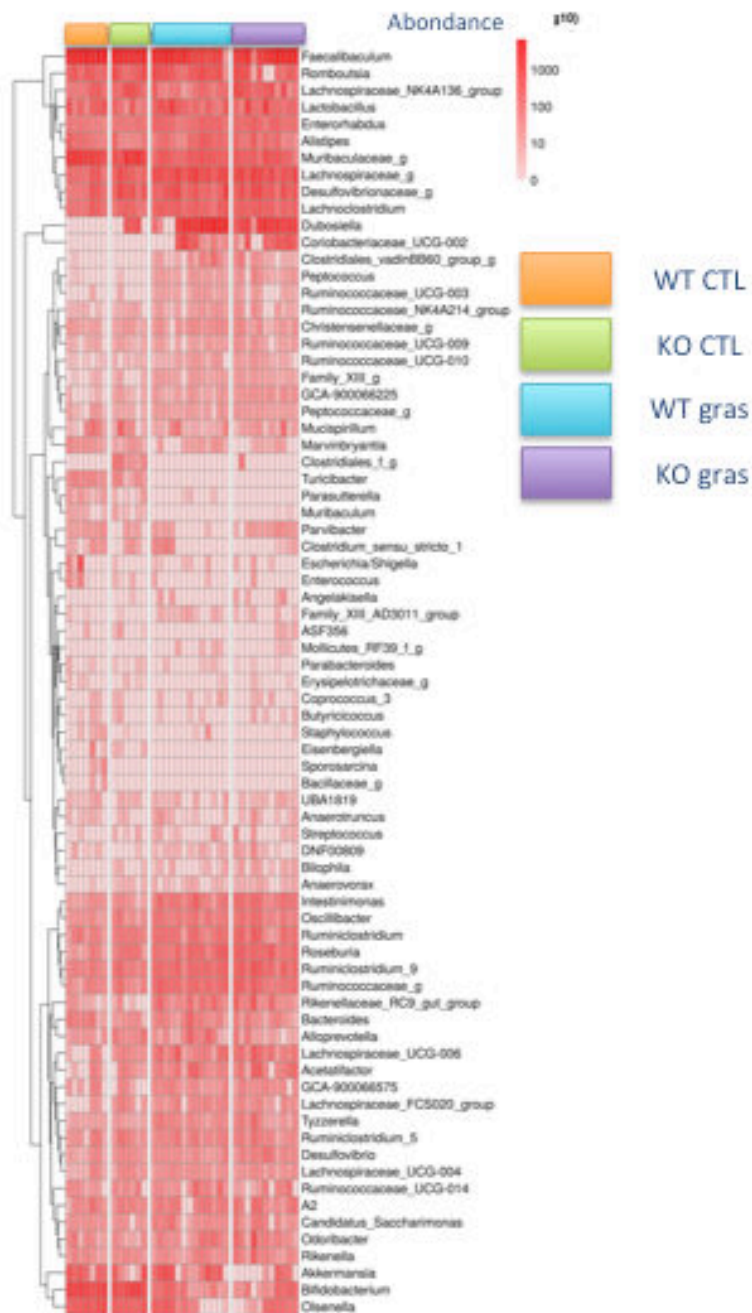
Enfin, nous avons analysé de manière globale le microbiote des souris WT et iAMPK KO sous régimes contrôle et gras, et ce en fin de régime. En effet, nous souhaitons d'une part évaluer les effets du régime gras et, d'autre part, les conséquences de l'absence de l'AMPK sur la modulation des populations bactériennes intestinales. Cette analyse a été effectuée en collaboration avec l'équipe d'André Marette, et notamment par Noémie Daniel et Thibaut Varin, à l'université de Laval, Québec.

Tout d'abord, l'étude des ordres bactériens chez les souris a permis de mettre en évidence des différences entre les souris WT et iAMPK KO sous régime contrôle. En effet, les souris iAMPK KO présentent plus de desulfovibrionales, de clostridiales, et moins d'érysipelotrichales. Le régime gras, quant à lui, induit des modifications du microbiote avec notamment une augmentation des clostridiales et une diminution des bacteroidales et des bifidobactériales ; les souris WT et iAMPK KO possèdent un profil très similaire sous régime gras. Nous pouvons toutefois noter que les souris iAMPK KO sous régime gras présentent une diminution de l'ordre verrucomicrobiales (Fig. 41A). L'Analyse en Composantes Principales (ACP) basée sur les distances Unifrac, permettant d'évaluer les différences phylogénétiques au sein d'une population microbienne d'un échantillon donné, confirme les dissimilarités observées au niveau du microbiote des souris WT et iAMPK KO sous régime contrôle, tandis que les microbiotes des souris WT et iAMPK KO sous régime gras sont davantage similaires (Fig. 41B). Une analyse plus fine des différents genres bactériens a également été réalisée, les résultats sont présentés sous la forme d'une heatmap (Fig. 41C), et les différences d'abondances entre chaque sous-groupe de souris sont représentées sous la forme d'un score d'Analyse Discriminante Linéaire (ADL) (Fig. 41D). Bien que nous n'ayons pas à ce jour investigué l'effet des bactéries qui ne présentent pas la même abondance au sein des souris WT et iAMPK KO sous chacun des régimes, nous pouvons toutefois émettre l'hypothèse que les différences entre les deux génotypes sous régime contrôle pourraient être corrélés aux défauts de la barrière intestinale observés au niveau du côlon distal chez les souris iAMPK KO. A titre d'exemples, nous pouvons citer les genres *Parasutterella* et *Parvibacter* plus abondants chez les souris WT, et les genres *Enterorhabdus*, *Alloprevotella*, *Roseburia*, et *Desulfovibrionaceae* plus abondants chez les souris iAMPK KO. Sous régime gras, le fait qu'il n'y ait pas de différences majeures entre les microbiotes des souris WT et iAMPK est concordant avec l'absence de différence majeure en termes de perméabilité intestinale et d'inflammation entre ces souris. Il est toutefois très intéressant de noter que les souris iAMPK KO sous régime gras présentent une diminution du genre *Akkermansia*, bactérie principalement connue pour son rôle dans la protection de la barrière intestinale (Everard et al. 2013). Dans la mesure où *Akkermansia* réside dans le mucus, nous avons évalué chez les souris WT et iAMPK KO l'expression transcriptionnelle de la mucine 2 au niveau du côlon distal. Nous n'avons pas observé de différence entre les deux génotypes (Fig. 42), ce qui n'est pas concordant

avec les données sur l'abondance de ce genre chez les souris. Il serait tout de même pertinent d'évaluer chez ces souris d'autres paramètres tels que l'épaisseur de mucus par exemple.



C



D

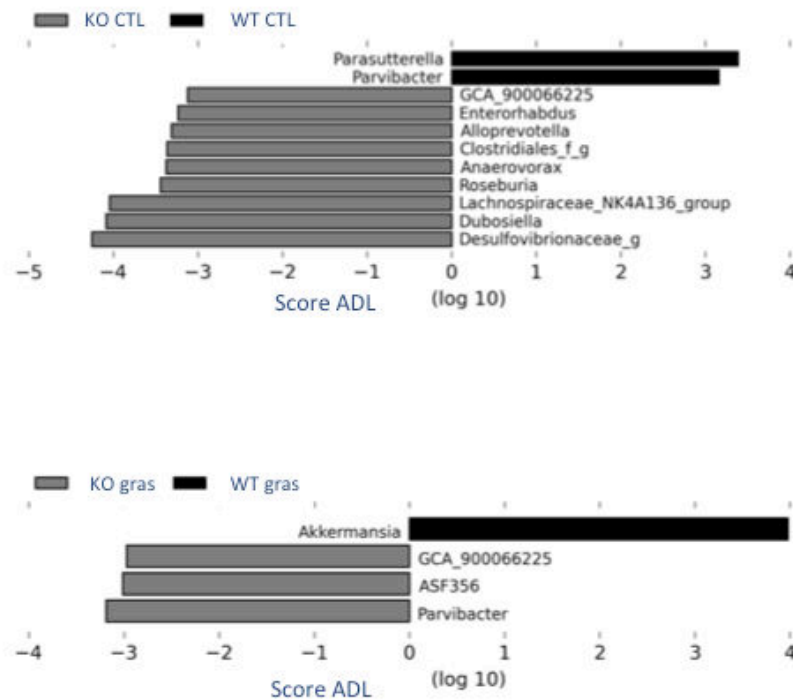


Figure 41 : Analyse du microbiote des souris WT et iAMPK KO sous régimes contrôle et gras.

(A) Abondance relative des ordres bactériens, (B) ACP basée sur les distances Unifrac, (C) heatmap des genres bactériens, et (D) scores ADL indiquant les genres bactériens surreprésentés dans un groupe par rapport à l'autre, obtenus à partir de l'analyse de l'ARN ribosomique 16S de fèces de souris WT et iAMPK KO sous régimes contrôle et gras, en fin de régime.

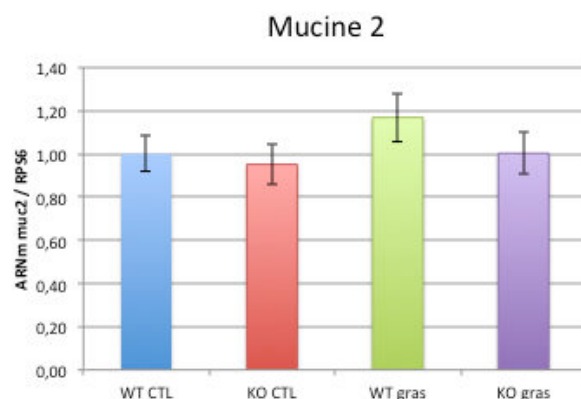


Figure 42 : Effets du régime gras et de la délétion inductible de l'AMPK sur l'expression de la mucine 2.

Expression des ARNm de la mucine 2 dans le côlon distal.

En conclusion de cette partie sur le modèle d'obésité, nos résultats indiquent que dans ce contexte pathologique l'absence de l'AMPK au niveau de l'épithélium intestinal, aussi bien dans la lignée constitutive que dans la lignée inductible, n'entraîne pas de défauts métaboliques majeurs et n'induit pas une inflammation de bas grade plus importante. Toutefois, la lignée constitutive semble être plus sensible que la lignée inductible au régime hyperlipidique dans la mesure où nous avons observé une exacerbation de la perméabilité du côlon distal chez les souris AMPK KO par rapport aux souris WT.

3) Intérêt d'utiliser l'AMPK comme cible thérapeutique pour la renforcer la barrière intestinale chez la souris

De manière similaire à notre étude sur les cellules intestinales Caco-2, nous souhaitons investiguer dans notre modèle pathologique *in vivo* les effets d'un activateur pharmacologique de l'AMPK sur la barrière épithéliale intestinale. Nous avons choisi de travailler avec la metformine en raison de sa bonne tolérance et biodisponibilité chez la souris.

3.1) Bénéfice d'un traitement à la metformine en condition basale

Nous avons dans un premier temps étudié les effets de la metformine en condition basale. A l'issue de 3 jours de traitement oral avec la metformine, nous avons mesuré la perméabilité intestinale à l'acide sulfonique 0,4 kDa chez les souris WT et AMPK KO. De manière significative, nous avons observé que suite au traitement avec la metformine, les souris WT présentaient une diminution de la perméabilité intestinale, ce qui n'était pas le cas chez les souris AMPK KO (Fig. 43). Ainsi, ces résultats indiquent que la metformine exerce un effet bénéfique sur le renforcement de la barrière intestinale en diminuant la perméabilité par un mécanisme AMPK-dépendant.

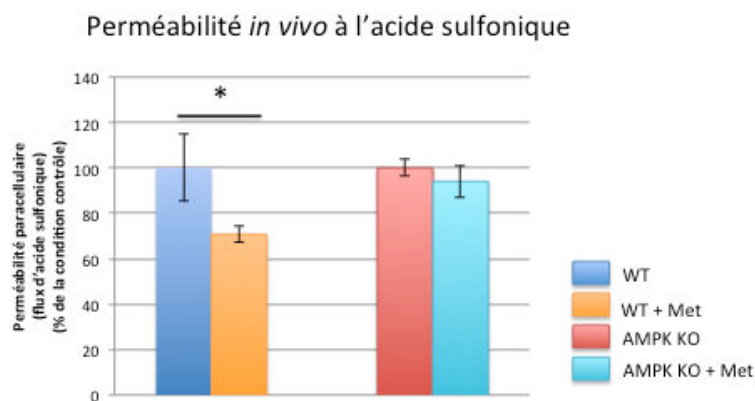


Figure 43 : La metformine diminue la perméabilité paracellulaire par un mécanisme AMPK-dépendant.

Perméabilité paracellulaire *in vivo* évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité d'acide sulfonique-FITC 0,4 kDa dans le sérum 4h après gavage des souris WT et AMPK KO, suite à un traitement de 3 jours avec la metformine dans l'eau de boisson (10 mg/mL). Pour chaque génotype, les valeurs sont exprimées en fonction de la condition contrôle sans traitement.

3.2) Bénéfice d'un traitement à la metformine dans le contexte de colite

Ensuite, dans un objectif de stratégie thérapeutique, nous avons évalué les effets de la metformine dans le contexte du modèle de colite induite par le DSS. Les souris ont été traitées avec la metformine juste après l'arrêt du traitement DSS.

Suivi du poids et perméabilité intestinale

Nous avons montré que la metformine diminuait la perte de poids et améliorait la reprise de poids chez les souris WT et AMPK KO (Fig. 44A). Nous pouvons supposer que les effets sur le poids observés chez les souris KO peuvent être dus à des mécanismes AMPK-indépendants qui améliorent l'état général des souris, comme par exemple l'augmentation de l'absorption intestinale, sans pour autant toucher la barrière physique intestinale. Cependant, à la fin du traitement, nous avons observé que la metformine diminuait la perméabilité intestinale *in vivo* au dextran 4 kDa uniquement chez les souris WT et non chez les souris KO (Fig. 44B). Ce résultat démontre à nouveau que la

metformine agit sur le renforcement de la fonction barrière de l'intestin par un mécanisme AMPK-dépendant.

Paramètres inflammatoires

Nous avons analysé l'expression des cytokines pro-inflammatoires au niveau du côlon distal. Concernant les souris WT, l'effet de la metformine est peu marqué pour l'IL6 et le TNF α car ces souris sont en phase de récupération. Toutefois, l'IL1 β tend à être diminué chez les souris traitées avec la metformine. Chez les souris AMPK KO, les cytokines IL6, TNF α , et IL1 β tendent à être diminuées par le traitement avec la metformine, suggérant des effets anti-inflammatoires de cette molécule AMPK-indépendants. Cependant, malgré le traitement à la metformine, une inflammation résiduelle persiste chez les souris AMPK KO par rapport aux souris WT (Fig. 44C).

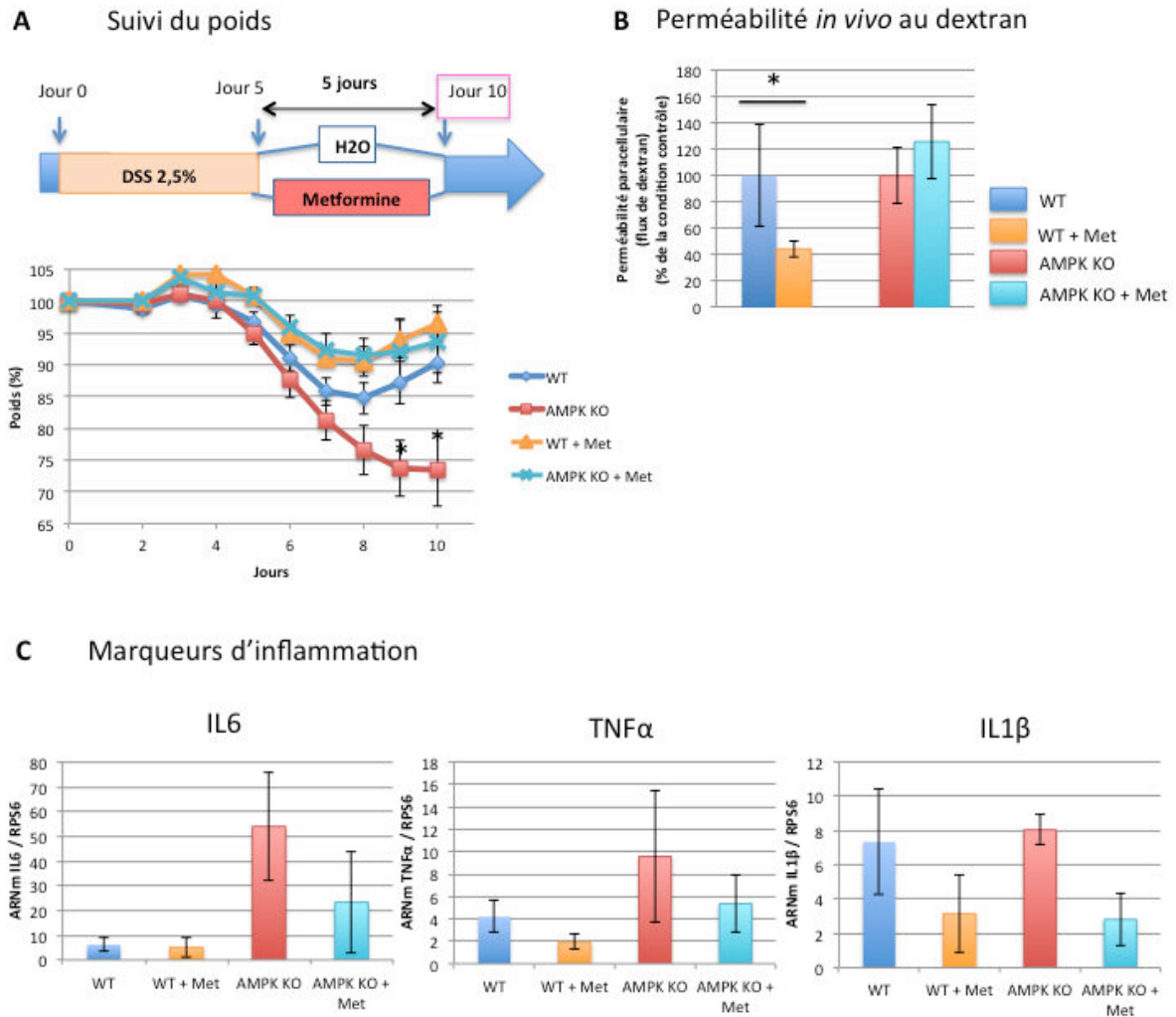


Figure 44 : La metformine atténue la colite chez les souris WT et AMPK KO mais diminue la perméabilité intestinale uniquement chez les souris WT.

(A) Suivi du poids corporel des souris WT et AMPK KO pendant le traitement au DSS suivi du traitement avec la metformine. Les résultats sont exprimés en pourcentage du poids initial. (B) Perméabilité paracellulaire *in vivo* évaluée par la mesure de fluorescence reflétant la quantité de dextran-FITC 4 kDa dans le sérum 4h après gavage des souris WT et AMPK KO. Pour chaque génotype, les valeurs sont exprimées en fonction de la condition contrôle sans traitement. (C) Expression des ARNm de l'IL6, de l'IL1 β , et du TNF α dans le tissu entier du côlon distal. * $P < 0,05$.

Activation de l'AMPK dans le côlon distal

Afin de corréliser les effets bénéfiques de la metformine au niveau de la barrière épithéliale intestinale avec son action sur l'AMPK, nous avons mesuré l'activité de

l'AMPK à la fin du traitement au sein du côlon distal en étudiant par Western blot sa forme phosphorylée (Thr-172) de même que celle de sa cible ACC (Ser-79). Nous confirmons avec cette expérience que, d'une part, la metformine atteint bien le côlon distal et d'autre part, qu'elle est capable d'activer l'AMPK dans cette partie de l'intestin puisque nous observons une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC chez les souris WT traitées, ce qui n'est pas le cas chez les souris AMPK KO (Fig. 45).

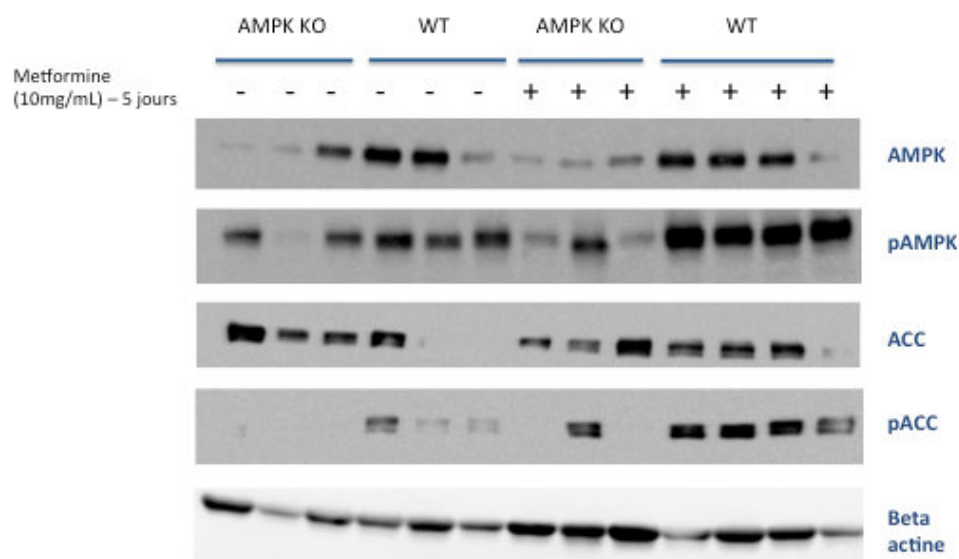


Figure 45 : La metformine induit l'activation de l'AMPK dans le côlon distal.

La phosphorylation de la Thr-172 de l'AMPK et l'expression de l'AMPK totale, ainsi que la phosphorylation de la Ser-79 de l'ACC et l'expression de l'ACC totale, ont été étudiées par Western blot sur les lysats cellulaires issus de tissu entier de côlon distal des souris WT et AMPK KO, traitées ou non avec la metformine dans l'eau de boisson (10 mg/mL) pendant une période 5 jours. La beta-actine a été utilisée comme témoin de charge.

Ainsi, la metformine permet d'atténuer la colite induite par un traitement au DSS, et son action semble plus efficace chez les souris WT par rapport aux souris AMPK KO, notamment en raison de ses effets sur la diminution de la perméabilité intestinale par un mécanisme AMPK-dépendant. Il serait intéressant d'évaluer les effets de la metformine sur l'inflammation du côlon chez les souris WT à des temps plus précoces au cours du développement de la colite.

Discussion et perspectives

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence le rôle notable joué par l'AMPK dans la régulation de la barrière épithéliale intestinale. Nous avons en particulier démontré l'importance de l'AMPK dans les mécanismes de renforcement et de reconstruction de l'épithélium suite à des altérations de la barrière intestinale. L'utilisation d'activateurs pharmacologiques de l'AMPK dans le cadre de nos modèles pathologiques nous a également permis de considérer l'AMPK comme une cible thérapeutique potentielle pour limiter les dysfonctions intestinales liées à des défauts de perméabilité.

L'AMPK contrôle le réassemblage des jonctions serrées dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2

Les protéines des jonctions serrées, localisées au pôle apical des cellules épithéliales, jouent un rôle majeur dans le maintien de la structure des épithélia et forment une véritable barrière physique protégeant l'organisme de l'environnement extérieur. La déstabilisation de ces jonctions serrées, associée à la perte de polarité des cellules épithéliales, est observée dans plusieurs pathologies telles que les maladies rénales (Basile et al. 2012) ou dans le développement de certains cancers (Wodarz and Nathke 2007). Au niveau intestinal, des dysfonctions des jonctions serrées sont notamment retrouvées dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin chez l'homme (Mankertz and Schulzke 2007). D'un point de vue thérapeutique, il semble donc pertinent de développer des stratégies ciblant les jonctions serrées pour limiter les défauts de barrière constatés dans ces pathologies.

Bien que principalement connue pour ses fonctions métaboliques, l'AMPK joue également un rôle dans le réassemblage des jonctions serrées ; cette nouvelle fonction a été découverte dans les cellules rénales MDCK (Zhang et al. 2006, Zheng and Cantley 2007). Pour évaluer ce rôle de l'AMPK au niveau de la barrière intestinale, nous avons généré un modèle de cellules épithéliales intestinales Caco-2 invalidées pour l'AMPK par la technologie CRISPR/Cas9 (Grenier et al. 2018). Pour cela, nous avons opté pour une stratégie séquentielle consistant à invalider les cellules pour l'isoforme $\alpha 1$ dans un

premier temps et l'isoforme $\alpha 2$ dans un deuxième temps, dans la mesure où les deux isoformes de la sous-unité α sont exprimées dans ces cellules et présentent une certaine redondance fonctionnelle. En effet, dans les cellules $\alpha 1$ AMPK KO, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'isoforme $\alpha 2$ par rapport aux cellules WT, et lorsque nous traitons ces cellules avec un activateur pharmacologique de l'AMPK, les niveaux de phosphorylation de l'ACC sont comparables entre les cellules $\alpha 1$ AMPK KO et WT. Ces résultats confirment la pertinence d'utiliser un double KO (AMPK dKO) pour abolir l'activité de l'AMPK et éviter un phénomène de compensation par l'isoforme $\alpha 2$ en cas d'absence de l'isoforme $\alpha 1$ uniquement. Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer le rôle fonctionnel de chacune de ces isoformes dans l'assemblage et le maintien des jonctions serrées, ce qui nécessiterait d'autres expériences sur les cellules $\alpha 1$ AMPK KO et $\alpha 2$ AMPK KO.

En condition basale, nous n'avons pas observé de différence de TEER entre les cellules WT et AMPK dKO, suggérant ainsi que l'AMPK n'est pas nécessaire au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale. De manière concordante, il a été montré que l'AMPK ne participait pas au maintien des jonctions serrées dans les cellules rénales MDCK (Zhang et al. 2006, Zheng and Cantley 2007). Cependant, dans un contexte d'altération de la barrière induite par un calcium switch, nous avons montré que l'absence de l'AMPK induisait un délai dans le réassemblage des jonctions serrées, indiquant alors un rôle de l'AMPK dans ce mécanisme. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature obtenues dans les cellules rénales MDCK et intestinales Caco-2. Dans un contexte de calcium switch, d'une part, des études ont mis en évidence un délai dans l'établissement de la TEER dans des cellules MDCK mutées surexprimant une forme inactive de l'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK (mutant dominant négatif AMPK $\alpha 2$ K45R) (Zhang et al. 2006) ou de l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK (mutant dominant négatif AMPK $\alpha 1$ D157A) (Zheng and Cantley 2007), d'autre part, une étude a montré un défaut dans la relocalisation de ZO-1 à la membrane dans des cellules Caco-2 exprimant le mutant dominant négatif AMPK $\alpha 2$ K45R (Sun et al. 2017).

Bien que les cellules AMPK dKO présentent un délai dans le processus de réassemblage des jonctions, ces cellules sont tout de même capables de reformer leurs jonctions en réponse au calcium switch. Cela suppose que ces cellules ont développé des mécanismes de compensation pour restaurer la barrière épithéliale ou bien que l'AMPK n'intervient que partiellement dans ce processus. De manière intéressante, nous avons

montré que l'inhibition de l'AMPK par le SBI-0206965 empêchait l'établissement de la TEER suite à l'ajout de calcium. L'inhibition pharmacologique de l'AMPK semble donc plus délétère que l'invalidation génétique, ce qui laisse à nouveau supposer que les cellules AMPK dKO ont probablement développé des caractéristiques particulières palliant l'absence de l'AMPK qui permettent le réassemblage des jonctions serrées. Ce processus reste tout de même moins efficace que dans les cellules WT. Une autre étude menée sur les Caco-2 en condition de calcium switch a également montré que l'inhibition de l'AMPK par le composé C ralentissait l'établissement de la TEER et la reformation des jonctions (Peng et al. 2009).

L'utilisation de modèles cellulaires invalidés pour l'AMPK, par des approches génétique ou pharmacologique, nous a donc permis de confirmer le rôle de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions. Néanmoins, nous n'avons pas cherché à identifier parmi les kinases capables de phosphoryler l'AMPK, à savoir la CaMKK β et LKB1, laquelle des deux ou les deux participaient à l'activation de l'AMPK au cours du processus de réassemblage des jonctions. Il a été suggéré dans une des études menées sur les cellules MDCK que la CaMKK β pourrait phosphoryler l'AMPK en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire lors du calcium switch. En effet, les auteurs ont montré que les niveaux de nucléotides, dont les variations tendent à favoriser l'activation de l'AMPK par LKB1, étaient inchangés dans ces conditions, supposant alors l'implication de la CaMKK β dans ce modèle (Zhang et al. 2006). Par ailleurs, d'autres études mettent également en évidence un rôle important de LKB1 dans la formation des jonctions serrées. Il a notamment été montré que LKB1 participait à la polarisation des cellules Caco-2, résultat en accord avec sa fonction de suppresseur de tumeur (Baas et al. 2004). Dans une autre étude menée sur les cellules MDCK, les auteurs ont démontré que l'activation de l'AMPK en réponse au calcium switch dépendait de LKB1. En effet, la phosphorylation de l'AMPK était fortement diminuée dans des cellules exprimant une forme inactive de LKB1 (Zheng and Cantley 2007). D'autres études semblent donc nécessaires pour déterminer le(s) mécanisme(s) de régulation de l'activité de l'AMPK en condition de calcium switch.

Suite à l'observation de l'activation de l'AMPK en réponse au calcium switch dans les cellules Caco-2, nous avons souhaité savoir si son activation pharmacologique permettait de potentialiser son action sur le réassemblage des jonctions serrées dans ces conditions. En effet, il a été montré que l'activation pharmacologique de l'AMPK

facilitait le réassemblage des jonctions serrées dans les cellules MDCK (Zhang et al. 2006, Zheng and Cantley 2007), et les cellules Caco-2 (Sun et al. 2017). Toutefois, ces études ont utilisé l'AICAR comme activateur pharmacologique de l'AMPK, lequel agit comme un activateur indirect et présente des limites dans l'interprétation des résultats en raison de ses effets AMPK-indépendants comme nous l'avons évoqué précédemment. En particulier, dans les cellules Caco-2 l'effet AMPK-dépendant de l'AICAR n'est pas démontré (Sun et al. 2017). Ces dix dernières années, un intérêt grandissant s'est manifesté pour le développement d'activateurs directs de l'AMPK capables de se lier directement au complexe AMPK. Ces recherches ont notamment pour objet de pallier la limite de l'utilisation d'activateurs indirects de l'AMPK. En effet, l'AICAR, qui a couramment été utilisé dans la littérature, a permis l'identification de nombreuses fonctions de l'AMPK *in vitro*, cependant cette molécule exerce de nombreux effets AMPK-indépendants (Guigas et al. 2007, Hunter et al. 2018). Dans notre modèle d'étude sur les cellules Caco-2, afin de cibler spécifiquement l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées, nous avons utilisé un activateur direct plus spécifique de l'AMPK, le composé 991 (Xiao et al. 2013). Nous avons montré que l'activation pharmacologique de l'AMPK avec le 991 au cours du calcium switch facilitait le réassemblage des jonctions serrées, effet qui était perdu dans les cellules AMPK dKO, indiquant un mécanisme AMPK-dépendant. Dans une étude menée sur les cellules Caco-2, une autre approche pour l'activation de l'AMPK à l'aide de composés naturels a été envisagée dans un contexte de calcium switch. Les auteurs ont montré que certains acides gras à chaîne courte, en particulier le butyrate, étaient capables d'activer l'AMPK et de favoriser le réassemblage des jonctions serrées (Peng et al. 2009). Une autre étude sur les cellules Caco-2 a mis en évidence le rôle bénéfique d'une activation de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions, mais dans un modèle d'altération de la barrière autre que le calcium switch. Il a notamment été montré que l'éthanol induisait une hyperperméabilité associée à une désorganisation des jonctions serrées dans ces cellules (Elamin et al. 2012). Dans ce modèle, les auteurs ont mis en évidence que l'activation de l'AMPK par les acides gras à chaîne courte (propionate, butyrate, acétate) facilitait également le réassemblage des jonctions serrées (Elamin et al. 2013). Ainsi, ces résultats permettent de généraliser le rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées à la suite d'une altération de la barrière épithéliale intestinale.

Quelles sont les cibles de l'AMPK dans le processus de réassemblage des jonctions serrées ?

Les mécanismes par lesquels l'AMPK facilite le réassemblage des jonctions serrées dans l'épithélium intestinal, et notamment ses cibles directes, restent encore à élucider. Nous pouvons en particulier nous demander si l'AMPK agit directement sur les protéines des jonctions serrées ou sur des protéines intervenant dans leur régulation ou leur assemblage.

Dans notre modèle, nous avons testé l'implication de deux protéines décrites comme des cibles directes de phosphorylation par l'AMPK : la cinguline phosphorylée sur la Ser137 (Yano et al. 2013, Ducommun et al. 2015) et la GIV phosphorylée sur la Ser245 (Aznar et al. 2016). En effet, ces cibles nous semblaient intéressantes dans la mesure où ce sont des protéines qui interviennent dans la régulation des jonctions serrées. Nous avons évalué leur état de phosphorylation au niveau des résidus phosphorylés par l'AMPK dans nos expériences de calcium switch menées sur les cellules Caco-2 en présence ou non du 991. Mais à ce jour nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de modulation de leur phosphorylation dans ces conditions avec les phospho-anticorps développés pour ces deux protéines phosphorylées. Il est intéressant de noter qu'il a récemment été démontré que l'AMPK pouvait phosphoryler la GIV sur la Ser245 au niveau intestinal grâce à l'utilisation d'organoïdes intestinaux traités avec la metformine, issus de côlons de souris contrôles et invalidées pour l'AMPK (Ghosh et al. 2019).

D'autres cibles de l'AMPK ont également été proposées pour expliquer ses effets bénéfiques sur les jonctions serrées. Il a été montré dans les cellules MDCK que l'inhibition par la rapamycine de la voie mTOR, connue pour être régulée de manière négative par l'AMPK (Krause et al. 2002), permettait de rétablir le réassemblage des jonctions lorsque ces cellules expriment un mutant dominant négatif de l'AMPK (Zhang et al. 2006). Cela indique donc que l'AMPK pourrait faciliter le réassemblage des jonctions serrées via le contrôle de la voie mTOR. Par ailleurs, une étude a montré que l'afadine, une protéine faisant partie de l'organisation du complexe des jonctions adhérentes, était un substrat de l'AMPK (Zhang et al. 2011). Les auteurs ont notamment mis en évidence que dans des cellules MDCK invalidées pour l'afadine, l'activation de

l'AMPK ne permettait plus la relocalisation des jonctions serrées ZO-1 et occludine à la membrane suite à l'altération de la barrière épithéliale.

Dans le cadre de notre approche globale pour identifier les voies de signalisation impliquées dans le processus de réassemblage des jonctions serrées en réponse au calcium switch dans les cellules Caco-2 WT, nous avons montré qu'en présence du 991 plusieurs protéines PKCs étaient plus fortement activées. Ces résultats suggèrent que l'action de l'AMPK sur le réassemblage des jonctions serrées pourrait dépendre d'une signalisation via les PKCs. Ces résultats sont concordants avec des études qui ont mis en évidence l'implication des PKCs, en particulier PKC η et PKC ζ , dans le renforcement de la barrière épithéliale et la localisation des protéines de jonctions à la membrane (Suzuki et al. 2009, Jain et al. 2011). Une étude menée sur les cellules Caco-2 a montré que l'activation de l'AMPK par le butyrate de sodium entraînait la phosphorylation de la PKC β , permettant ainsi une meilleure restauration de l'intégrité de l'épithélium (Miao et al. 2016). Cette même étude a également mis en évidence que l'activation de l'AMPK diminuait l'activité de la MLCK et de fait la phosphorylation de MLC2, laquelle est impliquée dans la régulation de la perméabilité paracellulaire en favorisant la contraction du cytosquelette (Miao et al. 2016). En complément, afin d'identifier de nouvelles cibles de phosphorylation de l'AMPK dans le mécanisme de réassemblage des jonctions serrées, une approche plus globale de phosphoprotéomique serait également envisageable. Une telle approche dans des hépatocytes en culture primaire a d'ailleurs révélé que la protéine ZO-2 pourrait être une cible directe de l'AMPK, indiquant alors que l'AMPK pourrait agir directement au niveau des jonctions serrées (Ducommun et al. 2015). Il serait donc pertinent d'évaluer la phosphorylation de ZO-2 dans notre modèle.

D'autres modèles d'études in vitro

Afin de conforter le rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales, il serait intéressant d'utiliser des systèmes de culture cellulaire plus complexes pour se rapprocher d'un contexte cellulaire plus physiologique. En effet, bien que la culture des cellules Caco-2 sur filtre permette de mimer la fonction de l'épithélium intestinal, ces cellules ne reproduisent que la fonction des entérocytes, et non des autres types de cellules présentes dans l'épithélium

intestinal. De plus, la culture des Caco-2 en deux dimensions est artificiel et ne permet pas de reproduire l'environnement physiologique de l'intestin.

La culture d'organoïdes apparaît comme un bon outil d'une part, pour reproduire tous les types de cellules épithéliales et l'architecture crypto-villositaire, et d'autre part, pour travailler dans un système non tumoral, en comparaison avec les cellules Caco-2. Pour étudier le rôle de l'AMPK dans ce système, nous pourrions générer des organoïdes à partir de cellules souches intestinales prélevées sur des souris WT et AMPK KO, et ce à partir de chacun des segments de l'intestin. Cela nous permettrait de ce fait d'étudier l'implication de l'AMPK dans la mise en place des jonctions serrées à l'échelle globale de l'intestin. Nous pourrions également induire des altérations de la barrière intestinale, et évaluer les effets d'activateurs de l'AMPK sur la reformation des jonctions par la mesure de la perméabilité (Hill et al. 2017).

D'autres systèmes de culture mimant davantage les conditions *in vivo* pourraient également être utilisés. Des puces ont récemment été développées dans le but de reproduire la structure et les conditions physiologiques de l'intestin (<https://www.emulatebio.com/>). En effet, il s'agit de puces microfluidiques qui permettent de cultiver des cellules en présence de deux flux dynamiques, l'un mimant les fluides riches en nutriments arrivant dans la lumière intestinale, l'autre mimant la circulation sanguine (Fig. 46). Ces systèmes sont également capables de reproduire le péristaltisme intestinal grâce à des forces mécaniques qui peuvent être exercées sur les puces. De plus, il est possible de co-cultiver des cellules épithéliales avec des cellules endothéliales microvasculaires ou encore avec des bactéries commensales. Les cellules Caco-2 peuvent être cultivées dans ce système, et par rapport à la culture sur filtre, les cellules peuvent se différencier rapidement de manière spontanée et former des villosités intestinales en trois dimensions. Ces systèmes sont tout à fait adaptés pour l'étude de l'altération de la barrière intestinale, une étude a notamment utilisé cet outil dans un modèle d'altération par radiation (Jalili-Firoozinezhad et al. 2018).

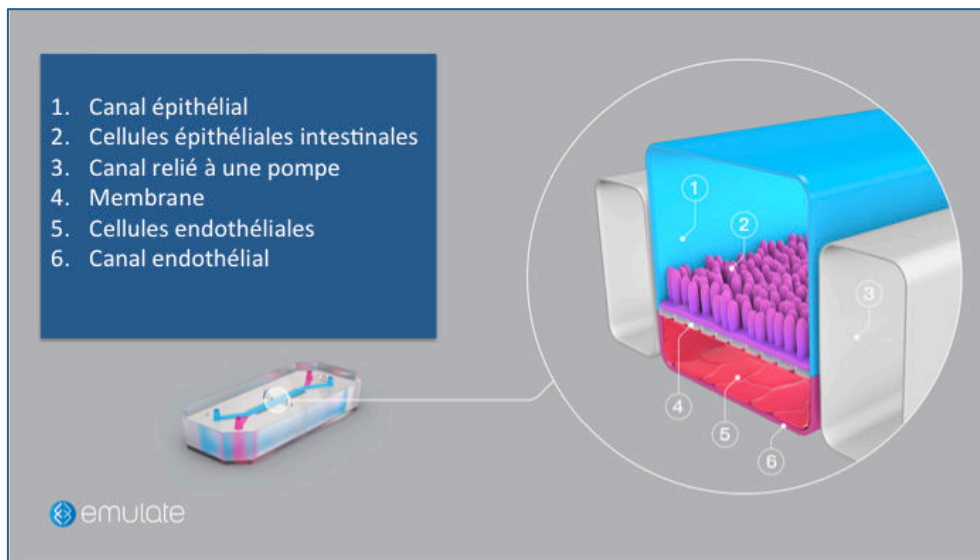


Figure 46 : Représentation d'une puce microfluidique pour mimer les conditions physiologiques intestinales.

(D'après <https://www.emulatebio.com/>).

Conséquences pathologiques de l'absence de l'AMPK sur la fonction de la barrière épithéliale intestinale chez la souris

Suite à l'identification du rôle de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées *in vitro* dans les cellules Caco-2, nous avons évalué son rôle au niveau de la barrière intestinale *in vivo* chez la souris. Pour cela, nous avons travaillé sur un modèle de souris invalidées pour l'AMPK spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales.

En condition basale, nous avons mis en évidence une augmentation de la perméabilité paracellulaire au niveau du côlon distal des souris AMPK KO, indiquant un rôle potentiel de l'AMPK dans le maintien de la barrière intestinale. Malgré cette observation, les souris ne présentaient pas de défauts majeurs intestinaux par rapport aux souris WT. Il est intéressant de constater que ces résultats diffèrent des effets observés suite à l'inactivation des gènes *PRKAA1* et *PRKAA2* dans les cellules intestinales Caco-2. En effet, nous avons montré que les cellules WT et AMPK dKO ne présentaient pas de différence au niveau de l'intégrité de la barrière épithéliale à l'état basal. Nous pouvons supposer que ces différences entre les résultats *in vitro* et *in vivo* peuvent être expliqués par la plus grande complexité du modèle animal présentant un

renouvellement constant des cellules épithéliales par rapport au modèle statique *in vitro*, et probablement par la présence du microbiote. En effet, les bactéries commensales sont connues pour moduler la fonction barrière intestinale (Hooper and Gordon 2001). Les effets des bactéries sur l'intégrité de la barrière et la perméabilité intestinale ont notamment été démontrés dans le cadre de l'utilisation des probiotiques, lesquels sont des bactéries vivantes qui lorsqu'elles sont ingérées exercent des effets bénéfiques sur l'organisme. A titre d'exemples, une étude a montré que l'administration orale des probiotiques *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus rhamnosus* diminuaient les altérations de la barrière intestinale et la translocation bactérienne induite par un stress psychologique chez le rat (Zareie et al. 2006). Une autre étude a mis en évidence l'action bénéfique du probiotique *Escherichia coli* Nissle 1917 sur l'augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées et l'atténuation de la colite induite par le DSS chez la souris (Ukena et al. 2007). Dans notre modèle de souris, nous avons observé des variations dans la composition du microbiote des souris WT et AMPK KO sous régime contrôle, en conséquence cela pourrait potentiellement expliquer les différences de perméabilité observées au niveau du côlon distal entre les deux génotypes. De manière intéressante, nous avons observé une abondance plus importante du genre *Desulfovibrionaceae* dans les fèces des souris AMPK KO. Or ce genre bactérien a été identifié dans la composition du microbiote de patients atteints de colite ulcéreuse (Rowan et al. 2010), qui est une pathologie associée à des phénomènes d'hyperperméabilité. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce genre bactérien pourrait faire partie des paramètres régulant l'intégrité de la barrière intestinale et pourrait participer à l'augmentation de la perméabilité du côlon distal chez les souris AMPK KO.

Nous avons par la suite travaillé sur des modèles pathologiques connus pour présenter des altérations de la barrière intestinale dans le but d'évaluer l'impact de l'absence de l'AMPK sur le développement de ces pathologies. Nous nous sommes intéressés à deux types de pathologies qui constituent des problèmes majeurs de santé publique, à savoir l'obésité et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Nous avons utilisé des modèles murins de ces pathologies consistant à soumettre les animaux à un régime hyperlipidique ou à un traitement au DSS pour induire respectivement une obésité ou une colite. Nous pouvons noter qu'il existe d'autres modèles pour altérer la barrière intestinale, tels que l'alcool (Rocco et al. 2014), le stress de la séparation

maternelle (Gareau et al. 2007) ou encore l'infection à *Citrobacter rodentium* (Skinn et al. 2006). Il pourrait être également intéressant d'évaluer le rôle de l'AMPK dans la régulation de la fonction barrière de ces différents modèles.

Dans notre modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique, nous avons montré une exacerbation de la perméabilité intestinale au niveau du côlon distal chez les souris AMPK KO par rapport aux souris WT de la lignée constitutive. Cette perméabilité était notamment associée à une augmentation de l'inflammation intestinale. Toutefois, ce défaut de barrière n'était pas suffisant pour induire un développement plus précoce et plus important de l'obésité chez les souris AMPK KO. Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandé si l'inactivation constitutive de l'AMPK au niveau intestinal pouvait entraîner des phénomènes de compensation chez les souris AMPK KO dans la mesure où ces souris ne présentent pas des altérations des paramètres métaboliques plus importantes par rapport aux souris WT sous régime hyperlipidique. Nous avons en conséquence évalué les effets du régime hyperlipidique sur une lignée de souris inductibles pour l'inactivation de l'AMPK. Cependant, nous n'avons pas observé davantage de différences au niveau de la perméabilité et de l'inflammation, ni au niveau des paramètres métaboliques entre les souris WT et iAMPK KO. De manière générale, nous avons bien observé un effet du régime gras au sein de nos lignées constitutive et inductible, notamment sur le développement de la masse grasse et de l'inflammation dans le côlon et le tissu adipeux viscéral. Au niveau de la barrière intestinale, nous avons constaté une diminution des protéines des jonctions serrées, cependant les effets du régime sur la perméabilité semblaient minimes. Nous pensons donc que ce modèle d'obésité induite par un régime hyperlipidique n'est pas forcément le modèle le plus efficace pour altérer la barrière intestinale et étudier le rôle de l'AMPK dans ce cadre. Dans la littérature, il a pourtant été démontré que des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique présentaient une nette augmentation de la perméabilité intestinale, associée à une diminution de l'expression transcriptionnelle des protéines des jonctions serrées. Les auteurs ont notamment mis en évidence que la modulation du microbiote par le régime hyperlipidique, à savoir la diminution des espèces de *Lactobacillus*, de *Bifidobacterium*, et de *Bacteroides*, était à l'origine de l'augmentation de la perméabilité intestinale dans ce modèle (Cani et al. 2008). A la place du régime gras, nous pourrions envisager une administration chronique de LPS sur une période d'un mois par un système de pompe sous-cutanée. En effet, il a été montré que l'endotoxémie

chronique pouvait induire une obésité chez la souris semblable à celle induite par un régime hyperlipidique (Cani et al. 2007), et que le LPS pouvait entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale (Guo et al. 2013). Un tel traitement pourrait donc avoir un effet plus marqué sur la barrière intestinale que le régime hyperlipidique. La transposition des résultats sur ce modèle d'obésité chez la souris vers l'homme semble présenter toutefois quelques limites. En effet, les données concernant le lien entre obésité et perméabilité intestinale chez l'homme ne sont pas toujours concordantes (Brignardello et al. 2010, Teixeira et al. 2012). Cependant une étude récente a mis en évidence de légers défauts de perméabilité chez des patients atteints d'obésité sévère associés à une altération des protéines des jonctions serrées (Genser et al. 2018). Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour préciser les phénotypes associés à l'intégrité de la barrière intestinale chez les patients obèses.

Chez l'homme, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et colite ulcéreuse) sont clairement associées à des dysfonctions de la barrière intestinale (Mankertz and Schulzke 2007). Chez la souris, l'induction de la colite par un traitement au DSS permet de mimer ces pathologies. Dans ce contexte, nous avons montré que l'absence d'AMPK intestinale induisait un retard dans le processus de ré-épithélisation. En effet, lors de la phase de regain de poids, les souris AMPK KO présentent une tendance à une perméabilité augmentée et une inflammation du côlon plus importante par rapport aux souris WT, laquelle est associée à des défauts histologiques plus marqués et à une diminution de l'expression des jonctions serrées dans le côlon. Nous pouvons supposer que dans ce contexte, l'AMPK localisée dans les cellules épithéliales intestinales pourrait agir sur l'assemblage des jonctions serrées, et par cette fonction participer ainsi à la reconstruction de l'épithélium. De manière intéressante, une étude récente a démontré que la seule invalidation de l'isoforme $\alpha 1$ de l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris entraînait une exacerbation de la colite induite par le DSS (Sun et al. 2017). Cependant, ce modèle d'étude présente des limites puisque nous avons montré que l'isoforme $\alpha 2$ de l'AMPK était également exprimée dans les cellules épithéliales intestinales et pouvait compenser l'absence d'activité de l'isoforme $\alpha 1$ dans les cellules Caco-2 (Olivier et al. 2019). Il est toutefois possible que les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK exercent des rôles différents dans le contrôle et le réassemblage des jonctions serrées dans un contexte pathologique *in vivo*, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre notre modèle de

cellules Caco-2 et le modèle de souris invalidées pour l'isoforme $\alpha 1$ décrit précédemment. Outre le rôle potentiel de l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales sur les jonctions serrées, d'autres mécanismes pourraient également intervenir et expliquer les défauts liés à l'absence d'AMPK intestinale. Tout d'abord, il est possible que les souris AMPK KO présentent un défaut de prolifération et de migration des cellules dans ce contexte de colite, ce qui pourrait expliquer le retard de ré-épithélisation chez ces souris. En effet, une étude a mis évidence que des souris $\alpha 1$ AMPK KO présentaient un ralentissement de la migration des cellules le long des villosités par rapport à des souris WT en condition basale, et que cela était lié à une diminution de l'expression du facteur de transcription CDX2, lequel joue un rôle majeur dans la différenciation des cellules épithéliales (Sun et al. 2017). Ensuite, le microbiote des souris pourrait jouer un rôle sur le développement de la colite et sur le processus de cicatrisation de l'intestin. Nous avons montré que nos souris WT et AMPK KO présentaient des microbiotes différents à l'état basal. En particulier, le genre bactérien *Desulfovibrionaceae* est plus abondant dans le microbiote des souris AMPK KO, lequel est retrouvé dans le microbiote de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Rowan et al. 2010). La présence de ce genre chez les souris AMPK KO pourrait expliquer une capacité moindre à restaurer l'intégrité de la barrière intestinale suite au traitement DSS. De manière plus générale, une étude a démontré l'impact des variations du microbiote en basal sur la sévérité de la colite induite par un traitement DSS chez la souris (Li et al. 2018). Une autre étude a mis en évidence que le transfert de microbiote de souris après un traitement au DSS chez des souris saines induisait une colite plus importante chez ces souris (Spalinger et al. 2019). Ces travaux démontrent donc l'importance de considérer le microbiote dans le développement de la pathologie. Enfin, notre modèle de colite constitue un modèle d'inflammation, ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que l'AMPK, de par ses propriétés anti-inflammatoires (Salt and Palmer 2012), pourrait également jouer un rôle dans la résolution de la réponse inflammatoire. En effet, une étude a notamment montré que l'activation de l'AMPK par l'AICAR permettait d'atténuer la colite chez la souris en inhibant la voie NF- κ B dans les macrophages et en diminuant les populations cellulaires Th17 (Bai et al. 2010). Nous pourrions ainsi envisager d'évaluer le rôle de l'AMPK dans d'autres types de cellules, différents des cellules épithéliales intestinales, comme par exemple les cellules immunes, dans le modèle de colite induite par le DSS. En particulier des études ont mis

en évidence dans des modèles de colite chez la souris que la régulation de la balance lymphocytes Th17/lymphocytes T régulateurs, à savoir la diminution des Th17 et l'augmentation des T régulateurs (Xu et al. 2019), ainsi que la diminution de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T régulateurs (Ohno et al. 2017) atténuait la pathologie. Ces résultats nous confortent dans l'idée qu'il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de l'AMPK dans les cellules T dans ce contexte.

L'AMPK, une cible thérapeutique intestinale ?

Nos modèles de souris invalidées pour l'AMPK intestinale nous ont permis de mettre en évidence l'importance de l'AMPK dans la restauration de l'intégrité de la barrière intestinale suite à des altérations de l'épithélium, en particulier dans le cas de la colite induite par le DSS. Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'AMPK, nous avons voulu tester l'effet d'un activateur de l'AMPK, la metformine, dans ce contexte de colite. Bien que la metformine constitue un activateur indirect de l'AMPK, de part son action sur l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Foretz et al. 2019), nous avons choisi de travailler avec cette molécule dans un premier temps pour la simplicité de son utilisation *in vivo*.

En condition basale, nous avons montré que la metformine diminuait la perméabilité intestinale uniquement chez les souris WT, et non chez les souris AMPK KO, indiquant alors un mécanisme AMPK-dépendant. Dans le modèle de colite, nous avons montré que la metformine diminuait la perte de poids et favorisait le regain de poids des souris WT et AMPK KO, cependant la metformine ne diminuait la perméabilité intestinale que chez les souris WT. De plus, malgré l'effet bénéfique sur le poids des souris AMPK KO, nous avons observé une inflammation résiduelle chez ces souris traitées avec la metformine par rapport aux souris WT. En conséquence, ces résultats démontrent que la metformine est plus efficace chez les souris WT et agit sur le renforcement de la barrière intestinale par un mécanisme AMPK-dépendant. Nos résultats sont concordants avec une autre étude qui a montré le bénéfice d'un traitement avec la metformine sur le développement de la colite chez la souris via l'activation de l'AMPK. De manière intéressante, les auteurs ont montré que l'activité de l'AMPK était diminuée lors de l'induction de la colite. Toutefois ils ont mis en évidence que le

traitement avec la metformine permettait de rétablir l'activité de l'AMPK au cours de la colite et que cela était notamment associé à l'augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées, assurant ainsi une atténuation de la pathologie. Les effets de la metformine sur les jonctions serrées étaient notamment diminués en présence du composé C (Chen et al. 2018).

La metformine pourrait donc activer l'AMPK située dans les cellules épithéliales intestinales et exercer un rôle bénéfique sur les jonctions serrées, mais elle exerce probablement des effets anti-inflammatoires via des mécanismes dépendants ou non de l'AMPK. En effet, une étude a montré que la metformine permettait d'atténuer la colite chez des souris invalidées pour l'IL10, laquelle est une cytokine anti-inflammatoire, en diminuant la voie NF- κ B dans les cellules épithéliales intestinales. Les auteurs ont corrélé ces effets avec l'activation de l'AMPK dans ces cellules (Koh et al. 2014). Une autre étude a montré que la metformine permettait également de diminuer l'inflammation intestinale dans un modèle de colite chez la souris via l'activation de l'AMPK dans les cellules épithéliales et dans les cellules de la lamina propria. L'inhibition de l'AMPK dans ce modèle avec le composé C réduisait les effets anti-inflammatoires de la metformine sans pour autant les inhiber complètement, suggérant ainsi l'implication d'autres voies de signalisation (Di Fusco et al. 2018). La metformine exerce donc ses effets anti-inflammatoires dans plusieurs types cellulaires.

Par ailleurs, la metformine pourrait également exercer ses effets bénéfiques sur la barrière intestinale via la modulation du microbiote (Foretz et al. 2019). En effet, il a été mis en évidence qu'un traitement avec la metformine chez des patients diabétiques assurait un enrichissement du microbiote de ces patients via l'augmentation de bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte qui sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la barrière intestinale (Tong et al. 2018).

Ces premiers résultats portant sur les effets bénéfiques d'un traitement à la metformine suggèrent que l'AMPK intestinale pourrait constituer une cible potentielle pour limiter les altérations de la barrière intestinale notamment dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Une étude s'est intéressée aux effets de la metformine sur l'intégrité de la barrière chez des patients diabétiques atteints de colite ulcéreuse, la metformine étant utilisée dans ces conditions comme traitement anti-diabétique. De manière intéressante, les auteurs ont observé sur des biopsies de côlon une augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées ZO-1 et

occludine chez les sujets traités à la metformine par rapport aux sujets non traités, suggérant alors un rôle de la metformine sur les jonctions serrées. Toutefois, l'activité de l'AMPK n'a pas été évaluée dans ces échantillons, de fait il n'est pas possible de conclure quant au lien entre les effets bénéfiques de la metformine et l'activation de l'AMPK dans l'intestin (Deng et al. 2018).

Dans notre étude sur le modèle de colite, nous avons utilisé la metformine qui est un activateur indirect de l'AMPK. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences avec des activateurs directs de l'AMPK pour cibler spécifiquement l'action de l'AMPK sur la barrière intestinale. Nous pourrions utiliser les activateurs directs tels que le MK8722 (Cokorinos et al. 2017) ou le PF739 (Myers et al. 2017), qui présentent une meilleure biodisponibilité *in vivo* que le 991 que nous avons utilisé *in vitro* sur les cellules Caco-2.

Par ailleurs, nous pourrions également envisager d'évaluer l'intégrité de la barrière intestinale au cours de la colite dans des modèles de souris génétiquement modifiées présentant une forme d'AMPK constitutivement active. En effet, des études ont montré qu'il était possible de générer une forme active de l'AMPK par la mutation de l'isoforme $\gamma 1$, et ce de manière tissu spécifique (Woods et al. 2017, Garcia et al. 2019). De manière très intéressante, une étude a notamment développé un système inductible qui permet d'activer l'AMPK à tout moment dans un tissu spécifique, activation qui peut également être annulée à tout moment (Garcia et al. 2019). Ce système permet ainsi de mimer les effets préventifs ou curatifs des activateurs de l'AMPK, puisque l'activation de l'AMPK peut être induite à n'importe quel moment de la pathologie. Dans le cadre de notre problématique sur le rôle de l'AMPK dans l'intestin, il pourrait être intéressant d'évaluer les effets d'une forme active de l'AMPK dans les cellules épithéliales intestinales dans des contextes pathologiques.

[Cibler l'AMPK par la voie nutritionnelle ?](#)

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes uniquement intéressés à l'activation de l'AMPK par la voie pharmacologique. Comme énoncé au début de cette discussion, des études menées sur les cellules Caco-2 ont montré que des acides gras à chaîne courte, en particulier le butyrate, étaient capables d'activer l'AMPK, et de ce fait facilitaient le réassemblage des jonctions serrées (Peng et al. 2009, Elamin et al. 2012).

Or, il est connu que les acides gras à chaîne courte (butyrate, acétate, propionate) peuvent être issus de la fermentation bactérienne des fibres alimentaires non digestibles, également appelées prébiotiques. En conséquence, nous pourrions envisager d'activer l'AMPK dans nos modèles pathologiques par la voie nutritionnelle en traitant les souris avec des prébiotiques. Dans le cadre de notre modèle de colite, un traitement thérapeutique ne paraît pas forcément pertinent dans la mesure où il s'agit d'une expérience relativement courte et que cette durée ne permet probablement pas aux prébiotiques de moduler le microbiote de manière suffisamment importante pour induire des effets bénéfiques. Toutefois, nous pourrions envisager un traitement préventif. En effet, une étude a mis en évidence le bénéfice d'un régime riche en fibres administré en préventif à des souris sur le développement de la colite (Silveira et al. 2017). Dans le cadre de notre modèle d'obésité, un traitement avec des prébiotiques paraîtrait également intéressant. En effet, même si le régime hyperlipidique que nous avons utilisé n'entraîne pas de défauts majeurs de perméabilité, il induit tout de même une altération de l'expression des protéines des jonctions serrées au niveau du côlon, associée à une inflammation intestinale au sein de la lignée constitutive. Il serait donc pertinent d'étudier l'impact des prébiotiques sur le renforcement de la barrière intestinale dans le cas d'une obésité induite par un hyperlipidique, et d'identifier si les effets des prébiotiques sont perdus ou non en absence de l'AMPK intestinale. Une telle étude permettrait d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'AMPK dans le contexte des maladies métaboliques.

Il existe également d'autres composés nutritionnels qui permettraient de renforcer la barrière intestinale via l'activation de l'AMPK. A titre d'exemple, une étude a montré que dans un modèle de colite chez la souris induite par le DSS, un régime enrichi en framboise rouge, qui contient des anthocyanosides, permet d'atténuer le développement de la pathologie. En particulier, ce régime permet l'augmentation de l'expression des jonctions serrées et diminue la perméabilité intestinale. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme pourrait dépendre de l'AMPK, puisque ces effets bénéfiques sont associés à l'activation de l'AMPK (Bibi et al. 2018). D'autres molécules naturelles issues des plantes, telles que l'eupatiline et la géniposide, permettent également d'atténuer la colite chez la souris et le rat en jouant sur la barrière intestinale par un mécanisme potentiellement AMPK-dépendant (Xu et al. 2017, Zhou et al. 2018).

Conclusion

Ainsi, les résultats *in vivo* et *in vitro* obtenus lors de ma thèse montrent que l'AMPK joue un rôle important dans le maintien et la reconstruction de la barrière épithéliale intestinale, notamment au niveau du côlon. En effet, nous avons mis en évidence dans des modèles invalidés pour l'AMPK au niveau intestinal une exacerbation de la perméabilité intestinale au niveau du côlon distal dans un contexte pathologique d'obésité et un délai dans le processus de ré-épithélisation de la barrière dans un contexte de colite. Grâce à l'utilisation d'activateurs pharmacologiques dans nos modèles, nos résultats indiquent que l'AMPK pourrait constituer une cible thérapeutique dans des situations pathologiques et exercer des effets bénéfiques sur le renforcement de la barrière intestinale. Nous avons notamment démontré l'implication de l'AMPK dans le réassemblage des jonctions serrées, et en particulier dans le mécanisme de relocalisation de ZO-1 à la membrane dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2. De plus en plus de maladies sont maintenant associées à des altérations de la barrière intestinale, ainsi la validation de nouvelles cibles pour limiter l'hyperperméabilité intestinale, comme l'AMPK, apparaît comme très prometteuse.

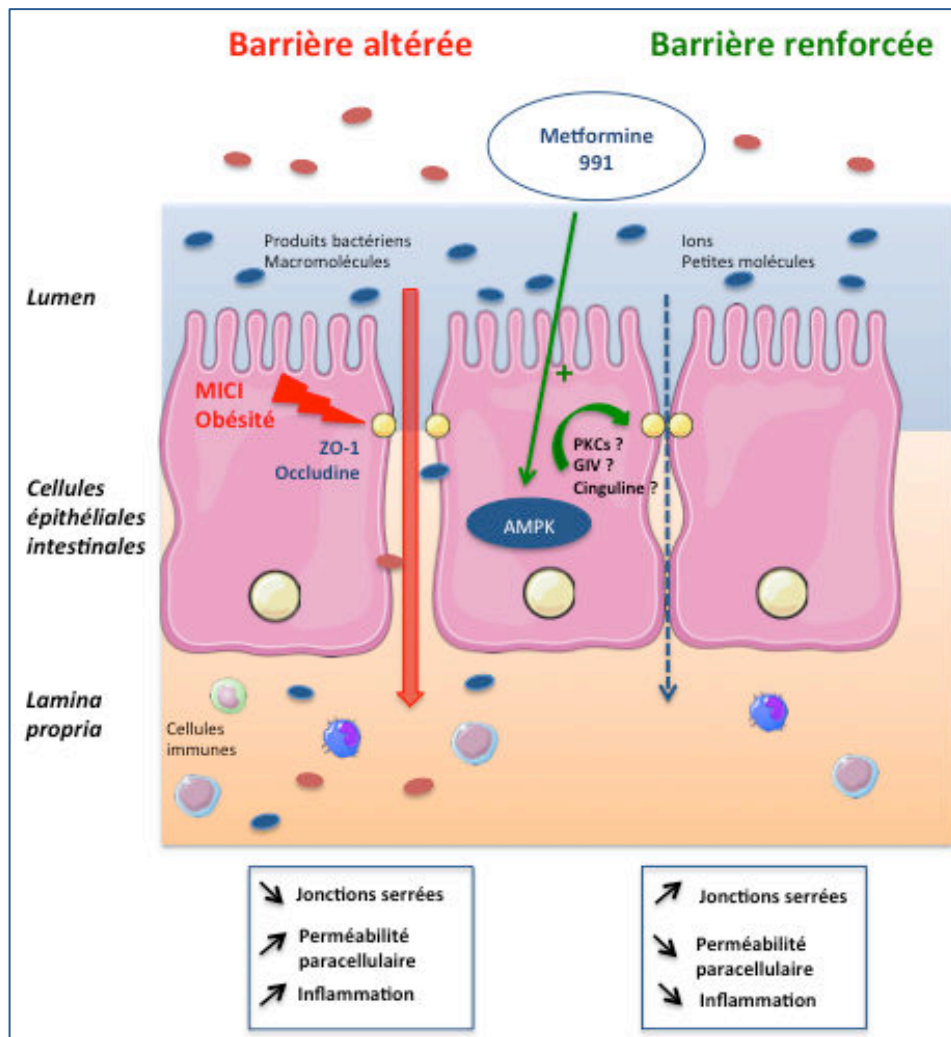


Figure 47 : Le rôle de l'AMPK dans le maintien et la reconstruction de la barrière épithéliale intestinale.

Annexe 1

Article 3 :

Promise and challenges for direct small molecule AMPK activators.

Séverine Olivier, Marc Foretz, Benoit Viollet. *Biochem Pharmacol.* 2018 Jul ;153 :147-158. (Olivier et al. 2018)



Review

Promise and challenges for direct small molecule AMPK activators

Séverine Olivier^{a,b,c}, Marc Foretz^{a,b,c}, Benoit Viollet^{a,b,c,*}^a INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France^b CNRS, UMR8104, Paris, France^c Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

ARTICLE INFO

Keywords:

AMPK
Energy metabolism
Small molecule activator
Therapeutics
Drug discovery

ABSTRACT

AMP-activated protein kinase (AMPK) is an evolutionary conserved and ubiquitously expressed serine/threonine kinase playing a central role in the coordination of energy homeostasis. Based on the beneficial outcomes of its activation on metabolism, AMPK has emerged as an attractive target for the treatment of metabolic diseases. Identification of novel downstream targets of AMPK beyond the regulation of energy metabolism has renewed considerable attention in exploiting AMPK signaling for novel therapeutic targeting strategies including treatment of cancer and inflammatory diseases. The complexity of AMPK system with tissue- and species-specific expression of multiple isoform combination regulated by various inputs, post-translational modifications and subcellular locations presents unique challenges for drug discovery. Here, we review the most recent advances in the understanding of the mechanism(s) of action of direct small molecule AMPK activators and the potential therapeutic opportunities.

1. Introduction

AMP-activated protein kinase (AMPK) is mainly known as a highly conserved and ubiquitously expressed energy sensor that is highly sensitive to changes in cellular energy levels (by sensing increases in AMP:ATP and ADP:ATP ratios) and makes appropriate adjustment to balance the consumption of ATP with its synthesis [1]. In this context, the overall effect of AMPK activation is to increase the rate of catabolic (ATP-generating) processes and decrease the rate of anabolic (ATP-consuming) processes in an attempt to restore cellular energy homeostasis. This is accomplished by the phosphorylation of downstream targets involved in the regulation of numerous metabolic pathways as well as long-term adaptive changes through transcriptional regulation. In addition to its role in maintaining intracellular energy homeostasis, AMPK also coordinates metabolism at the whole-body level [2]. Therefore, AMPK represents a point of conversion of regulatory signals monitoring systemic and cellular energy status, making AMPK signaling an obvious target for the treatment of several metabolic disorders [1,3]. The discovery that muscle contraction activates AMPK in skeletal muscle leading to increased glucose uptake and evidence supporting that skeletal muscle AMPK signaling network is not compromised in type 2 diabetic individuals reinforced the interest for targeting AMPK via physical exercise or pharmacological interventions [3,4]. Moreover, a growing number of downstream targets that are phosphorylated when AMPK is activated independently of the canonical AMP and ADP inputs

have been recently identified, expanding AMPK function beyond its critical role in the regulation of energy homeostasis [5–7]. It was recently demonstrated that AMPK is able to sense glucose availability independently of changes in adenine nucleotides by a mechanism involving the formation of complexes with axin on the surface of the lysosome [8]. Given recent reports highlighting the critical regulatory role played by AMPK in autophagy, anti-inflammatory response and cell growth [9,10], it is not surprising to see the heightened interest in the development of AMPK-targeted therapeutics for the potential to offer significant human health benefits.

In this review, we explore the promise and potential challenges of exploiting the versatility of AMPK signaling for novel therapeutic targeting strategies. We provide here an update on recently developed direct AMPK activators, notably focusing on their mechanisms of action and therapeutic opportunities. A detailed description of the role of AMPK in the regulation of whole body and cellular functions is out of scope of the current review and the reader is invited to consult other recent reviews dealing with this specific topic [5,9,11,12].

2. Structure and regulation of AMPK

AMPK is a heterotrimeric protein kinase comprised of an alpha (α) catalytic subunit in combination with scaffolding beta (β) and regulatory gamma (γ) subunits (Fig. 1). These subunits are encoded by seven genes (*PRKAA1*, *PRKAA2*, *PRKAB1*, *PRKAB2*, *PRKAG1*, *PRKAG2*,

* Corresponding author at: INSERM U1016, Institut Cochin, Dpt Endocrinology, Metabolism and Diabetes, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
E-mail address: benoit.viollet@inserm.fr (B. Viollet).

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.049>

Received 6 December 2017; Accepted 31 January 2018

Available online 03 February 2018

0006-2952/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

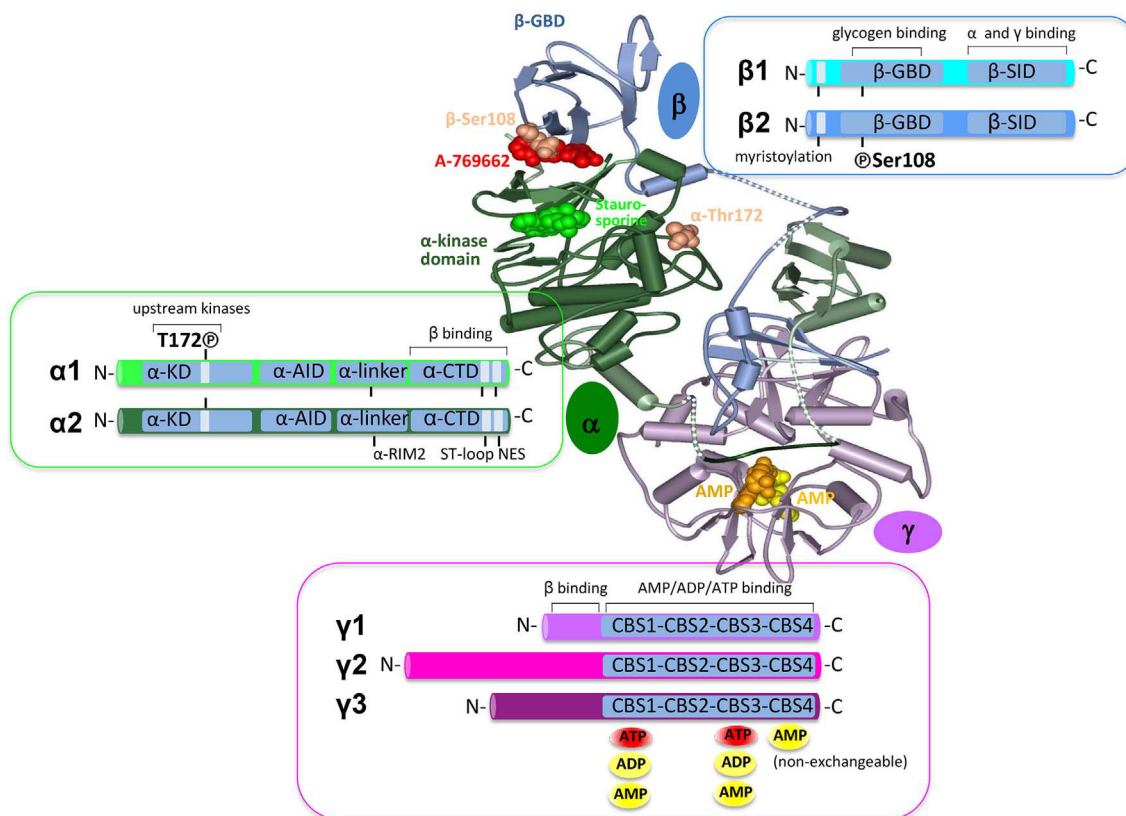


Fig. 1. Domains of the mammalian AMPK α , β and γ subunits. The crystal structure of AMPK heterotrimeric complex is shown with α subunit (green), β subunit (dark blue) and γ subunit (mauve) (PDB 1CF7; [82]). The structure shows the activation-relevant phosphosites α -Thr172 and β -Ser108 (brown), two AMP (orange/yellow) molecules bound to CBS-3 and CBS-4 in the γ subunit, the allosteric activator A-769662 (red) bound to a pocket formed by the interface between the α -kinase domain and the β -GBD and the kinase inhibitor staurosporine (green) in the active site. Domain structure for AMPK subunit isoforms (α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1, γ 2, and γ 3) is presented alongside the structure. AMPK α contains a kinase domain (α -KD) phosphorylated by upstream kinases on the residue Thr172, an autoinhibition domain (α -AID), and a C-terminus domain (α -CTD) that interacts with the β subunits. AMPK β subunit presents a myristoylation site at the N-terminus, a glycogen-binding domain (β -GBD) phosphorylated on the residue Ser108 and a α and γ subunit interaction domain (β -SID). AMPK γ contains 4 β -synthase (CBS) domains binding AMP, ADP, and ATP, but only three of the four potential nucleotide-binding sites contribute to nucleotide regulation, with CBS-2 always unoccupied, CBS-4 permanently bound to AMP (non exchangeable) and CBS-1 and -3 binding AMP, ADP, and ATP interchangeably. NES, nuclear export sequence; RIM, regulatory-subunit-interacting motif; ST-loop, serine/threonine-enriched loop.

PRKAG3), enabling the formation of a diverse collection of $\alpha\beta\gamma$ heterotrimer combinations. The seven isoforms (α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1, γ 2 and γ 3) can theoretically combine to form up to 12 possible heterotrimers with eventually different regulation (expression, turnover, subcellular localization), regulatory properties (sensitivity to various inputs), and functions (specific substrate phosphorylation, different outputs) for unique impact on cellular homeostasis. In addition, reported *PRKAG2* transcript variants differentially expressed in adult tissues (with a transcript predominantly expressed in the heart) may also add to the diversity in the composition of AMPK heterotrimers [13,14].

2.1. Structural features and role of the catalytic α subunits

The α catalytic subunits contain the conventional serine/threonine kinase domain (α -KD) at the N-terminus while the C-terminus is required for binding the β and γ subunits (Fig. 1). Phosphorylation of the conserved threonine residue (Thr172) within the activation loop of the α -KD is required for full activation of AMPK. Two principal upstream kinases have been identified, the tumor suppressor LKB1 [15–17] and the Ca²⁺/calmodulin-activated kinase 2 (CaMKK2) [18–20]. LKB1 is constitutively active but can be further modulated by posttranslational modifications [2,21]. Moreover, LKB1 appears to be a major regulator of AMPK α 2, at least in skeletal and cardiac muscle [22,23]. Activation by CaMKK2 is mediated by increases in cytosolic Ca²⁺ concentrations, thus providing an alternate pathway to activate AMPK independent of changes in adenine nucleotide concentration. In addition, TGF- β activated kinase 1 (TAK1) was proposed as an alternative upstream kinase

[24] but only few studies further investigated its physiological relevance [25,26]. The identity of phosphatase regulating AMPK phosphorylation is largely unknown and may depend on the cell type [27,28]. The α -KD is immediately followed by an auto-inhibitory domain (α -AID) that maintains the α -KD in an inactive conformation in the absence of AMP [29,30]. The α -AID is connected to the globular C-terminal domain (α -CTD) by a flexible regulatory segment (α -linker) playing a key role in allosteric activation of AMPK by AMP [31]. In the presence of AMP, interactions between the α -linker with the γ subunit restricts its flexibility and results in tighter association of the catalytic and nucleotide binding modules, which physically protects Thr172 from dephosphorylation. Moreover, the binding of the α -linker to the γ subunit shifts the α -AID away from the α -KD, thus releasing its negative effects on the α -KD. Within the α -CTD, a flexible serine/threonine-rich loop termed as the ST loop (only conserved in vertebrates) appears to play a regulatory role in the inhibition of AMPK by other kinases. Phosphorylation of the ST loop reduces the activity of AMPK by decreasing the net phosphorylation of Thr172. Phosphorylation of AMPK α 1 at Ser485 and AMPK α 2 at Ser491 by PKA [32,33], Akt [34,35] and S6K [36] antagonizes AMPK activation. Phosphorylation at other sites within the ST-loop by GSK3 [37], PKC [38] and PKD1 [39] has been also involved in the reduction of AMPK activity. In addition to phosphorylation, AMPK activity is also modulated via post-translational ubiquitination and degradation by ubiquitin ligases specifically targeting the α 1-isoform [40] or the α 2-isoform [41]. The α -CTD terminates with a nuclear export signal [42]. The α 2-isoform is found more enriched in the nucleus than the α 1-isoform [43]. This may allow the

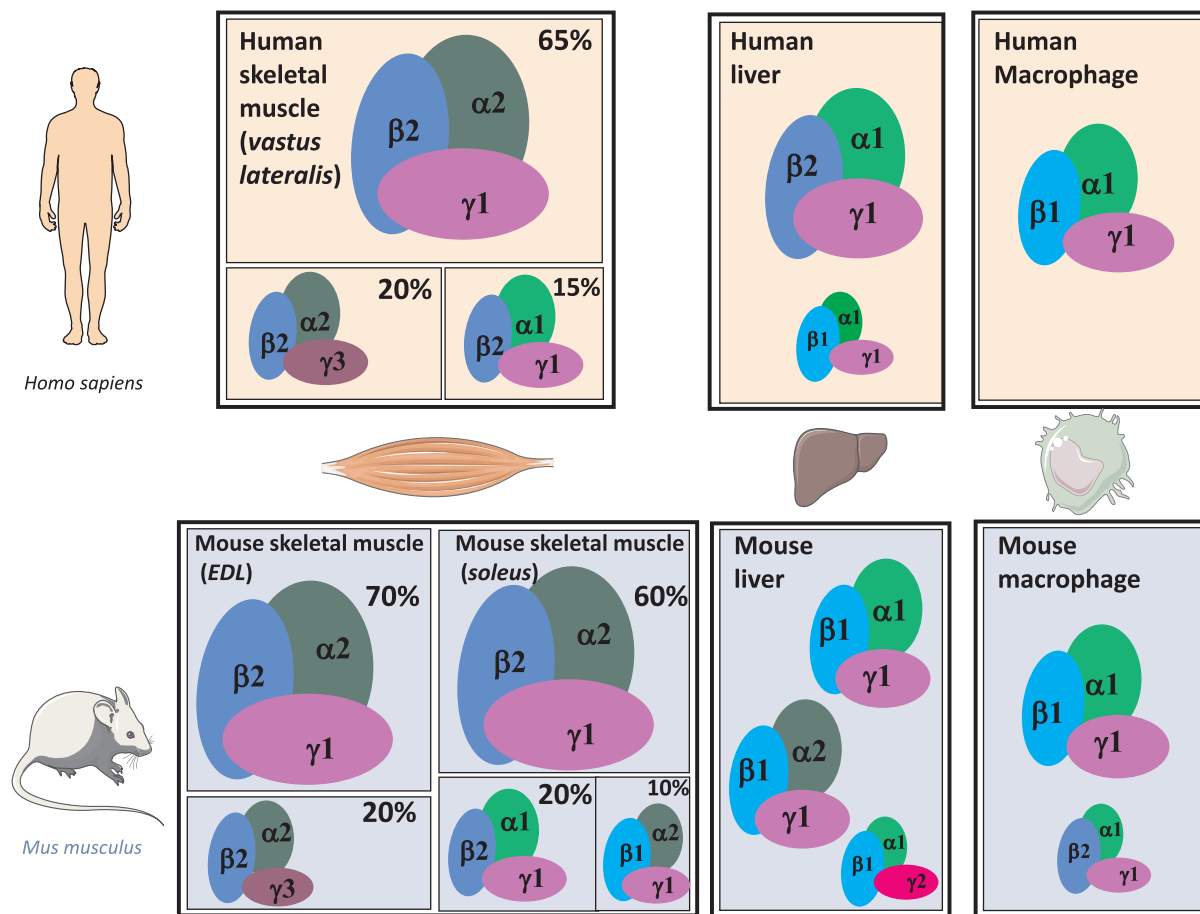


Fig. 2. AMPK heterotrimer composition in skeletal muscle, liver and macrophage from human and mouse. A cartoon of the distribution of major AMPK heterotrimeric complexes in human (*vastus lateralis*) and murine (fast-twitch glycolytic *extensor digitorum longus* [EDL] and slow-twitch oxidative *soleus*) skeletal muscle (left panels). The predominant AMPK heterotrimeric complexes are also shown in human and mouse liver and macrophage (right panels). The AMPK heterotrimeric protein composition in human and mouse skeletal muscle was determined and quantified by performing co-immunoprecipitation experiments followed by Western blots using antibodies against all the known AMPK subunit isoforms [62–64]. The relative abundance of the AMPK subunit isoforms in human and mouse liver was estimated by chemical proteomics [67], quantitative ELISA (108) and Western blots analysis [68,96,139]. The relative abundance of the AMPK subunit isoforms in human and mouse macrophage was estimated by Western blots analysis [101,140–142]. Note that the differences in the affinity of the antibodies used to recognize the different AMPK isoforms may result in underestimation or overestimation in the distribution of heterotrimers.

fine-tuning of gene transcription in responses to AMPK activation.

2.2. Structural features and role of the regulatory β subunits

The β regulatory subunits contain a myristoylation site at the N-terminus that serves to localize AMPK to membranes allowing translocation to mitochondria and targeting to developing phagosome [44–47]. In addition, myristoylation also enhances the effect of AMP on the phosphorylation by upstream kinases, suggesting possible preferential activation of AMPK at membrane sites. At the C-terminus, a subunit interaction domain (β -SID) acts as a scaffold to link the α -CTD to the N-terminus of the γ subunit (Fig. 1). The β -subunits also contains a central glycogen binding domain (β -GBD) which modulates AMPK activity and causes AMPK to bind to glycogen particles and co-localization with specific targets [48–50]. The GBD of the $\beta 2$ -isoform appears to have a higher affinity for glycogen than that of $\beta 1$ [51]. Autophosphorylation at Thr148 that is centrally located in the carbohydrate-binding pocket of the β -GBD was described to prevent AMPK binding to glycogen, suggesting that the binding affinity of AMPK to glycogen is regulated in response to glycogen content and AMPK activation [52]. However, this mechanism has been challenged in the context of AMPK activation in response to skeletal muscle contraction [53] and the regulation of AMPK via glycogen is likely to occur by an indirect mechanism [54].

2.3. Structural features and role of the regulatory γ subunits

The γ subunits contain a conserved core of four tandem repeats known as cystathionine β synthase (CBS) domain forming four potential nucleotide binding sites (Fig. 1). Only three of the CBS repeats are known to bind AMP, ADP or ATP interchangeably, enabling AMPK to sense fluctuations in cellular energy state. While AMP and ADP act as activators of AMPK, binding of ATP antagonizes this effect. Thus, AMP:ATP and ADP:ATP ratios are the intracellular modulators of AMPK activity [55]. Whereas CBS2 is unoccupied because it is not competent to bind any of the adenine nucleotides, CBS 4 retains AMP with high affinity and is described as a “non-exchangeable” site [56]. CBS1 and 3 are the regulatory sites for AMPK activation. Activation of AMPK is mediated through complementary mechanisms mainly based on the flexibility of the α -linker that connects the catalytic and nucleotide-binding modules. In the active AMP or ADP bound conformation, phosphorylated AMPK α -Thr172 lies in a narrow cleft between the two modules and is protected from dephosphorylation by phosphatases [57,58]. However, only binding of AMP but not ADP can drive allosteric activation of the enzyme [57]. These two nucleotides have also been shown to promote phosphorylation of AMPK by upstream kinases although the effect of CaMKK2 is controversial [55,59]. One possible explanation for why AMP binding promotes phosphorylation by LKB1 came from recent studies showing interaction between AMP bound AMPK and the axin/LKB1 complex at the lysosomal surface [60,61].

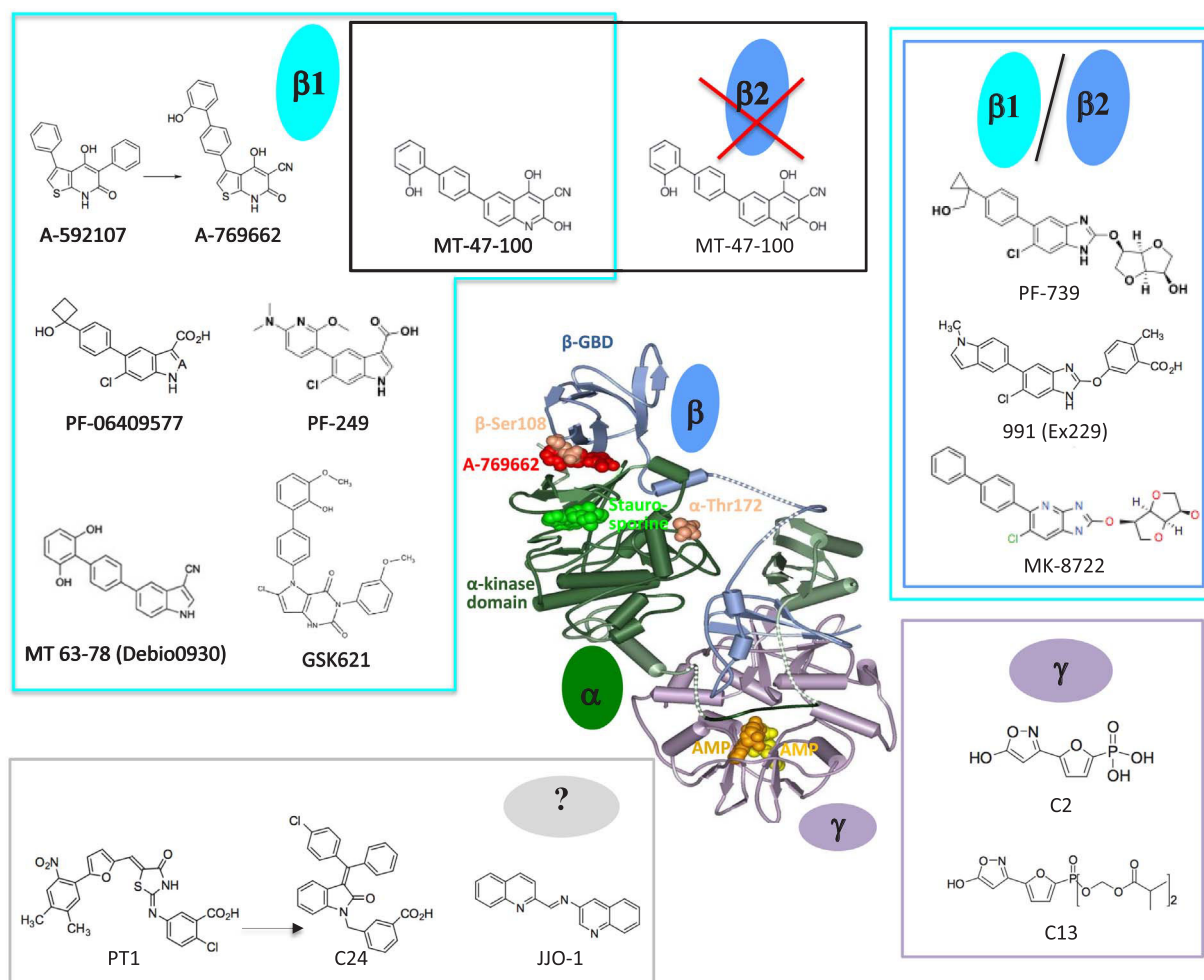


Fig. 3. Structures of allosteric direct small molecule AMPK activators and inhibitors. Structure of direct small molecule activators binding to the AdAM site located between the β -GBD and the small lobe of the α -kinase domain [selective for complexes containing the β 1-isoform (turquoise frame) or both β 1- and β 2-isoforms (turquoise/blue frame), to the γ -isoform (purple frame) or with unknown interaction site (grey frame)]. Direct small molecule inhibitor selective for complexes containing the β 2-isoform (dark frame) is also shown. The crystal structure of AMPK heterotrimeric complex is shown with α subunit (green), β subunit (dark blue) and γ subunit (mauve) (PDB 1CFF; [82]). The structure shows the activation-relevant phosphosites α -Thr172 and β -Ser108 (brown), two AMP (orange/yellow) molecules bound to CBS-3 and CBS-4 in the γ subunit, the allosteric activator A-769662 (red) bound to a pocket formed by the interface between the α -kinase domain and the β -GBD and the kinase inhibitor stauroporine (green) in the active site.

3. Diversity of the AMPK heterotrimers

The complexity of AMPK system with multiple isoform combination presents unique challenges for drug discovery because each AMPK heterotrimer can be viewed as a potential and specific drug target. In addition, there has been only limited knowledge on the AMPK heterotrimeric complexes tissue-specific distribution and specific roles. The question of whether the different isoform combinations have distinct functions remains only partially answered. However, insights in human AMPK molecular diversity and specificity are beginning to emerge and will help to better define therapeutic modalities. In human skeletal muscle, although all seven subunit isoforms of AMPK are expressed at mRNA level, a limited number of distinct combinations of AMPK heterotrimeric complexes have been detected [62]. Only 3 of the 12 possible AMPK heterotrimeric complexes are present to a significant extent (α 2/ β 2/ γ 1 \gg α 2/ β 2/ γ 3 \geq α 1/ β 2/ γ 1), with a high degree of consistency between species (Fig. 2) [62,63]. However, although present at one-fifth of all heterotrimers, α 2/ β 2/ γ 3 is the primary complex to be activated in response to high-intensity exercise protocols, indicating differential regulation and distinct responsibilities of heterotrimers in the control of cellular response to energy stress [64]. The activation of AMPK in the skeletal muscle has been shown to play a role in the regulation of the glucose uptake by enhancing, similarly to insulin, the

translocation of GLUT4 to the surface membrane [65]. Like Akt which is involved in the signaling of insulin, AMPK is able to phosphorylate the Rab GTPase-activating proteins Tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family, member 1 (TBC1D1) and TBC1D4 [66]. Once phosphorylated, these downstream targets are inhibited, which leads to the translocation of GLUT4 to the membrane and then enables the entry of glucose in muscle cells. Interestingly, there is a differential phosphorylation of these targets according to the nature of AMPK heterotrimeric complex activated in response to physical activity. In exercised human skeletal muscle, activity of AMPK α 2 β 2 γ 3 heterotrimer has been correlated with the phosphorylation of TBC1D1 at Ser237 and Thr596, whereas activity of AMPK α 2 β 2 γ 1 heterotrimer correlated to the phosphorylation of TBC1D4 at Ser341 and Ser704 [66]. Similar TBC1D1 phosphorylation signature was reported in exercised skeletal muscle from type 2 diabetic subjects indicating the competence of insulin resistant skeletal muscle for AMPK activation [4]. It is noteworthy that the nature of the different AMPK heterotrimeric complexes also varies between organs (Fig. 2), raising the possibility to target AMPK pharmacologically in a tissue-specific manner. In human hepatocytes, AMPK α 1 β 2 γ 1 was identified as the predominant complex [67,68]. In contrast, in rodent hepatocytes, the expression of AMPK isoforms was clearly different leading to multiple possible combination of heterotrimers containing either α 1 or α 2 and β 1, γ 1 and γ 2 (Fig. 1) [67,68]. This observation of

interspecies divergence with respect to the tissue specificity of AMPK heterotrimers is of particular interest for drug discovery purposes as it questions the translation of preclinical data to clinical studies.

4. AMPK as a druggable target

AMPK signaling has attracted considerable attention within the past decades, owing to the capacity of pharmacological compounds (e.g., 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside [AICAR] and metformin) or natural compounds (e.g., resveratrol) to activate AMPK indirectly via altered cellular energy charge or accumulation of AMP analogs inside cells [1]. However, the development and use of indirect AMPK activators acting via inhibition of mitochondrial complex I is not recommended due to the potential systemic toxicity and life-threatening lactate acidosis risk, as recently reported for the indirect AMPK activator R118 [69,70]. In addition, since some of the effects of indirect activators could be mediated through off-target effects independently of AMPK activation [71,72], intense interest has been focused on the development of more specific AMPK activators by using relevant screening systems for identifying compounds that interact directly to activate the AMPK heterotrimeric complex [73,74]. In 2006, high-throughput screen (HTS) efforts drove the discovery of the first non-nucleotide direct small molecule AMPK activator, A-592107, optimized to generate the more potent compound A-769662 [75] (Fig. 3), demonstrating that AMPK activation with non-nucleotide ligands is possible. This important breakthrough in AMPK research leads to the development of more specific and potent small molecule AMPK activators and an increasing collection of compounds with diverse chemical structures is now available from the patent and published literature [76–79] (Fig. 3). Recent crystallographic studies of AMPK have provided molecular insights into the mechanism and site of action for most of these compounds [80–83]. The interface between the GBD and the small lobe of the α -KD forms a discrete pocket that has been recently identified as a new allosteric binding site, referred to as the allosteric drug and metabolite (ADaM) site [82]. The ADaM site is depicted as an “orphan” allosteric site since no endogenous AMPK ligand has been identified yet. This site appears to be necessary to promote AMPK α -Thr172 phosphorylation induced by agents that increase cellular AMP/ADP [84] and thus, represents an attractive site for the pharmacological modulation of AMPK activity. Indeed, it is also accessible to various synthetic activators derived from HTS, including A-769662 and 991 [81,82] (Fig. 3), and the natural product salicylate [81]. Reports of alternative binding sites include the γ subunit with compounds identified after screening an AMP mimetic library [80,85] (Fig. 3).

5. Small molecule AMPK activators

Here, we only illuminated some representative compounds confirmed to directly influence AMPK activity (Fig. 3). These small molecules directly bind to specific sites on the AMPK heterotrimeric complex. This binding induces conformational changes leading to AMPK activation through multiple modalities such as allosteric modulation, increase in AMPK α -Thr172 phosphorylation, protection against Thr172 dephosphorylation or a combination of these mechanisms.

5.1. Direct AMPK activation through binding to the ADaM site

5.1.1. β 1-Selective compounds

The first synthetic compound in this class is the thienopyridone derivative A-769662 (Fig. 3) [75]. A-769662 stimulated partially purified rat liver AMPK or recombinant AMPK α 1 β 1 γ 1 heterotrimer with similar potency (EC_{50} = 0.8 and 0.7 μ M, respectively) [75]. A-769662 activates AMPK both allosterically and by inhibiting AMPK α subunit dephosphorylation at Thr172 [86,87]. However, its ability to activate AMPK complexes containing AMP-insensitive AMPK- γ 1R298G or AMPK- γ 2R531Q mutants indicates binding to a different site than AMP

on the AMPK heterotrimeric complex [87,88]. In addition, A-769662 does not change cellular AMP:ATP and ADP:ATP ratios in intact cells [71,72]. Important insights of how A-769662 regulates AMPK activity came from crystal structure of AMPK α 1 β 1 γ 1 and α 2 β 1 γ 1 complexes bound to A-769662 [81,82]. These studies revealed that A-769662 binds to ADaM site to mediate β -GBD/ α -KD interaction, and stabilize the α -KD in an active conformation. Interestingly, A-769662 exhibits selectivity towards AMPK complexes containing the β 1- rather than the β 2-isoform [89] and requires phosphorylation of β 1-Ser-108 for full activation of AMPK heterotrimers [87]. These observations opened up the possibility of developing small molecule activators with AMPK heterotrimer specificity. In addition, as the first direct AMPK activator available to the scientific community, A-769662 gained much interest to investigate the effect of pharmacological AMPK activation in the absence of changes in cellular energy balance. Of note, few reports indicate that A-769662 can interfere with various biological pathways unrelated to AMPK through multiple off-target effects; thereby, calling into question the use of A-769662 as a specific AMPK activator [63,71,90,91]. Hence, pharmacological studies should be combined with genetic studies examining the role of AMPK in mediating the observed pharmacological outcomes. Since then, numerous studies reporting the therapeutic effects of A-769662 in various preclinical mouse models have provided meaningful advances regarding the potential use of small molecule AMPK activators in therapeutics (a select of few is provided below). AMPK activators may be beneficial for the treatment of a variety of diseases including liver, kidney, cardiovascular and inflammatory diseases as well as diabetes and cancer. The most relevant studies indicating the utility of AMPK activators for the treatment of a number of pathologies are listed in Table 1.

Given clear isoform selectivity for β 1-containing AMPK complexes and poor expression of β 1-isoform in skeletal muscle, it is not surprising that A-769662 is unable to stimulate glucose uptake in mouse skeletal muscle [89,92]. Thus, administration of A-769662 in rodents should offer beneficial metabolic effects that are expected from a specific AMPK activation via β 1-containing complexes such as in the liver with induction of a switch from glucose to fatty acid utilization and protection against hepatic triglyceride accumulation [93,94]. Indeed, acute treatment of rats with A-769662 at a dose of 30 mg/kg i.p. significantly reduces respiratory exchange ratio (RER) after a high carbohydrate bolus consistent with a switch from carbohydrate to fat utilization [75]. These effects were lost in AMPK β 1 KO mice [95]. In addition, chronic treatment of *ob/ob* mice with 30 mg/kg b.i.d. A-769662 for 5 days showed a dramatic decrease in liver triglyceride content [75]. The inhibition of hepatic lipid accumulation in response to A-769662 treatment was lost in liver-specific AMPK KO mice fed a high fat diet, demonstrating an AMPK-dependent mechanism [96].

Beside these effects on hepatic lipid metabolism, A-769662-induced AMPK activation specifically in the small intestine through intraduodenal infusion (A-769662 at 3 mg/kg) in rat resulted in the reduction of hepatic glucose production in a non-autonomous manner (inter-organ crosstalk), mimicking the effects of intraduodenal metformin infusion on the control of glucose plasma level [97]. It was hypothesized that activation of duodenal AMPK contributes in a duodenal glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor/protein kinase A (PKA) signaling and a neuronal-mediated gut-brain-liver pathway to control hepatic glucose production. These findings highlight the potential development of specific gut-targeted treatments to improve the glycemic control of individuals with diabetes and obesity.

AMPK has a recognized role in promoting an anti-inflammatory response, reinforcing the interest in AMPK activation for treating inflammatory diseases [98–100]. Because AMPK activity in macrophage is predominately dependent on the β 1-isoform (Fig. 2) [101], the effect of A-769662 was tested in mouse models of inflammatory arthritis. Activation of AMPK by A-769662 at 60 mg/kg, b.i.d. reduced inflammatory cell infiltration and joint damage as well as IL-6 secretion, showing the potential for targeted activation of AMPK in IL-6

Table 1Small molecule AMPK activators and their perspectives in health: *in vivo* evidence. A summary table of the main *in vivo* effects of small molecule activators. nt: not tested.

Compound name	Binding site	Isoform selectivity	Targeted tissues	Health benefits	Animal models	Specificity for AMPK	References
A-769662	ADaM	β 1	Liver	\ Hepatic lipid accumulation	Mice	nt	[75]
			Liver	/ Fatty acids utilization	Mice	Liver-specific AMPK KO	[96]
			Heart	/ Cardioprotection	Rats	nt	[75]
			Macrophage	\ Inflammation	Mice	Heart-specific AMPK α 2 KD	[103]
			Small intestine	\ Hepatic glucose production	Mice	AMPK α 1 KO	[102]
					Rats	Ad-DN-AMPK duodenal infection	[97]
PF-06409577 PF-249	ADaM	β 1	Kidney	\ Diabetic nephropathy	Rats	nt	[107]
MT63-78	ADaM	β 1	Prostate	\ Prostate cancer growth	Mice	AMPK α 2 KO	[105]
GSK621	ADaM	β 1/ β 2	Acute Myeloid Leukemia cells	/ Cancer cell death	Mice	AMPK α 1 CRISPR	[143]
MK8722	ADaM	β 1/ β 2	Skeletal muscle	/ Glucose uptake	Mice/rats	nt	[111]
					Non human primates	nt	[111]
PF739	ADaM	β 1/ β 2	Skeletal muscle	/ Glucose uptake	Mice	Inducible skeletal muscle AMPK α 1 α 2 KO	[108]
					Non human primates	nt	[108]

dependent inflammatory arthritis [102].

Support for the potential of A-769662 as an effective treatment to protect the heart against ischemia-reperfusion injury in mice has also been reported [103]. A-769662-induced AMPK activation promoted cardioprotection through phosphorylation and inactivation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) and also phosphorylation and activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), which plays several protective effects following ischemia. These effects are abrogated in mouse hearts with genetically inactivated AMPK, indicating that A-769662 cardioprotective action is AMPK-dependent [103]. A-769662 also contributes to the cardioprotection via the overstimulation of glucose uptake and glycolysis, subsequently decreasing ROS and cardiomyocyte death [104]. These data support the possibility that pharmacological activation of AMPK might be a potential therapeutic strategy to reduce ischemic injury.

Discovery of indole- and indazole-acid-based AMPK synthetic activators led to the development of compounds MT 63–73 (also called Debio 0930) [105], PF-06409577 [106] and PF-249 [107,108] (Fig. 3). These compounds allosterically activate AMPK and protect AMPK- α Thr172 against dephosphorylation [105–107]. As for A-769662, all these compounds activate AMPK through binding at the ADaM site and display high selectivity for complexes containing the AMPK- β 1 isoform compared to the AMPK- β 2 isoform [84,105–107].

MT 63–78 was able to exert robust growth-inhibitory effects in prostate cancer cells *in vitro* as well as suppress tumor growth *in vivo* [105]. Treatment with MT 63–78 (30 mg/kg, i.p.) daily for 14 days of xenograft models promoted AMPK activation in xenograft tumors and significant reduced tumor volume. Prolonged treatment for 21 days with higher dose of MT 63–78 (60 mg/kg, i.p.) resulted in a more robust inhibition of xenograft growth. MT 63–78-mediated AMPK activation was associated with inhibition of *de novo* phospholipid production and a marked decrease in the generation of neutral lipids, suggesting AMPK as a therapeutic target especially for lipogenesis-driven prostate cancers. In addition, it was reported that low doses of MT 63–78 in combination treatment with androgen receptor antagonists/androgen synthesis inhibitors resulted in increased therapeutic response [105].

PF-06409577 and PF-249 showed efficacy in a rat model of diabetic nephropathy, suggesting the potential utility of AMPK activators for the treatment of renal diseases [107] (Table 1). Of note, PF-06409577 was used in a phase I clinical trial for the treatment of diabetic nephropathy but the trial was terminated prematurely for business reasons [109]. Chronic treatment of the ZSF1 rat model of diabetic nephropathy with 100 mg/kg PF-06409577 or 30 mg/kg PF-249 significantly decreased

proteinuria in a dose dependent manner following 68 days of dosing, resulting in improvement of kidney function. Beneficial glomerular AMPK activation was associated with reduction of enhanced mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling, an established pathological factor leading to podocyte hypertrophy and compromised filtration barrier [107].

5.1.2. pan-AMPK compounds

A series of cyclic benzimidazole derivatives have been identified as relevant AMPK activators. In this class, the first compound to be described is the synthetic compound 991 (also known as Ex229) (Fig. 3). It was found to bind the ADaM site but it is 5- to 10-fold more potent than A-769662 [82]. It allosterically activates AMPK complexes and enhances protection of the activation loop against dephosphorylation. AMPK complexes containing the β 1-isoform bind 991 about 10 times stronger than β 2-isoform. This may explain the weaker activation displayed towards β 2-containing complexes [82,110]. However, 991 dose-dependently increased AMPK activity of both β 1- and β 2-containing complexes in rat skeletal muscle and stimulated glucose uptake in myotubes by an AMPK-dependent mechanism [92]. As a potent AMPK activator, 991 also strongly inhibited hepatic lipogenesis and stimulated fatty acid oxidation in primary mouse hepatocytes [96].

Two related benzimidazole derivatives PF-739 and MK-8722, were recently discovered as potent pan-AMPK activator (Fig. 3) [108,111]. They bind to the ADaM site and activate both β 1- and β 2-containing complexes. The clinical relevance for the use of these nonselective pan-AMPK activators in a therapeutic strategy for type 2 diabetes was tested in diabetic mice and non human primates. Acute administration of PF-739 and MK-8722 resulted in activation of AMPK in skeletal muscle associated with glucose lowering effect and increased muscle glucose disposal but without impact on hepatic glucose production. Consistently, the blood glucose-lowering effect of PF-739 was attenuated in the absence of AMPK α 1 and α 2 in skeletal muscle, whereas it was not affected by the absence of AMPK α 1 and α 2 in the liver. In addition, chronic pharmacological pan-AMPK activation resulted in sustainable improvements in glucose homeostasis, including the amelioration of insulin resistance and hyperglycemia [108,111]. These studies established the powerful therapeutic benefit of AMPK activation in skeletal muscle as a potential type 2 diabetes therapy (Table 1).

5.2. Direct AMPK activation through binding to the γ -subunit

A synthetic compound C2 (5-(5-hydroxy-isoxazol-3-yl)-furan-2-

phosphonic acid) has been identified after screening an AMP mimetic library as a potent allosteric activator of AMPK (Fig. 3) [112]. C2 activates AMPK with an EC₅₀ in the low nanomolar range, which is 1000-fold lower than AMP. As AMP, it protects against AMPK α -Thr172 dephosphorylation. However, it does not modulate other AMP-regulated enzymes such as glycogen phosphorylase, phosphofructokinase or fructose-1,6-bisphosphatase [80]. This compound showed high potency for activation of AMPK in cells when delivered as a pro-drug, C13, a phosphonate diester converted by cellular esterases into C2. It has been reported that C13 potently inhibited hepatic lipogenesis and stimulated fatty acid oxidation in primary mouse hepatocytes [80,96] and reduced lipogenesis in mice [112].

Crystal structures of C2 bound to AMPK revealed two C2-binding sites in the AMPK γ subunit distinct from nucleotide-binding sites [85]. The two C2 molecules bind at the interface of CBS 1, 3, and 4, with the phosphate groups of both C2 molecules overlapping the phosphate binding sites of AMP in sites 1 and 4. These findings demonstrate that it is possible to develop compounds binding outside the ADaM site and open exciting possibility for developing isoform-selective γ -binding AMPK activators. C2 activates complexes containing the γ 1- and γ 2-isoforms but not the γ 3-isoform, suggesting different structural features between the γ isoforms that can be exploited in future rational drug design.

Interestingly, C2, like AMP, worked synergistically with A-769662 to activate dephosphorylated AMPK [85]. Unexpectedly, C2 is selective for AMPK complexes containing the α 1-isoform rather than α 2-isoform [80]. Mutagenesis studies demonstrated the critical role of the regulatory α -RIM2 segment in the α 1-selectivity of C2. This was confirmed by swapping the α -RIM2 from AMPK- α 1 to the α 2 isoform which was sufficient to confer full allosteric activation and protection against AMPK α -Thr172 dephosphorylation [80].

5.3. Direct AMPK activation through binding to unknown site

AMPK activity is modulated by interaction between the α -AID and α -KD. In an effort to activate AMPK through modulation of this auto-regulatory mechanism, a HTS was performed against an inactive, truncated AMPK- α construct containing only the α -KD and α -AID. The iminothiazolidinone PT-1 was discovered (Fig. 3) [113] and its optimization led to the identification of C24 (Fig. 3) [114]. PT-1 allosterically stimulates inactive truncated AMPK- α construct and activates full AMPK heterotrimers by antagonizing auto-inhibition of the α -KD. It was proposed that PT-1 antagonizes the auto-inhibitory conformation of AMPK- α by binding in the cleft between AMPK- α AID and AMPK- α KD [113]. In intact cells, this compound was shown to stimulate AMPK signaling without any significant change in cellular energy charge. However, recent work suggest that PT1 action on AMPK is indirect via inhibition of the respiratory chain and consequent increase in cellular AMP/ATP ratio [115]. In line with the notion that PT-1 is an indirect activator, PT-1 failed to activate AMPK complexes containing AMP-insensitive AMPK- γ 1R299G mutant [115].

The bi-quinoline compound JJO-1 (Fig. 3) was shown to allosterically activate complexes containing the γ 1- and γ 2-isoforms only at low ATP concentrations [116]. JJO-1 has no effect on the protection against AMPK- α Thr172 dephosphorylation and does not synergize with AMP on the allosteric activation of AMPK. Intriguingly, JJO-1 allosterically activates AMPK independently of all identified effector domains, α -AID, β -GBD and γ -nucleotide-binding sites. These findings suggest that alternate modes of allosteric activation exist and further studies are required to gain insight into the molecular details of JJO-1 action. Hence, other binding sites besides the ADaM site could impact isoform selectivity and highlights the complex cross-talk between binding sites on AMPK.

5.4. Direct allosteric inhibition of AMPK

The dihydroxyquinoline drug MT47-100 belongs to a novel class of compounds with dual AMPK regulatory properties (Fig. 3). It acts simultaneously as an allosteric activator of AMPK complexes containing the β 1-isoform and an allosteric inhibitor of AMPK complexes containing the β 2-isoform [117]. MT47-100 activates all AMPK β 1-containing complexes and this activation is dependent on the β 1-GBD and phosphorylation of AMPK β 1 Ser108. At the opposite, MT47-100 directly inhibits all AMPK β 2-containing complexes through a β 2-GBD allosteric site. Three non-conserved residues within the β -GBD determine the agonistic/antagonistic properties of MT47-100: Phe82, Tyr92, and Leu93 in AMPK β 1 and the corresponding residues Ile81, Phe91, and Ile92 in AMPK β 2. The therapeutic potential of this allosteric inhibitor has been demonstrated on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from pancreatic β cells. Whereas MT47-100 increased GSIS from wild-type isolated mouse islets, MT47-100-mediated effect was lost in islets from AMPK β 2 knockout mice [117]. These findings provide novel insight into the development of direct AMPK inhibitors by demonstrating that AMPK inhibition with small molecules is possible. The use of pharmacological AMPK inhibitors could be beneficial in some disease settings including obesity and neurodegenerative diseases [118,119].

6. Challenges to small AMPK activators

The past decade witnessed successful development of therapeutically useful small molecule direct AMPK activators, powered by tremendous progress in both academic and industrial settings. Existing results to date offer encouragement to further pursue research on AMPK as a drug target for the treatment of diseases associated with metabolic syndrome [107,108,111]. However, while using small molecule AMPK activators to treat a number of human pathologies appears now feasible, some challenging questions might serve as directions for future development of subtype- or tissue-selective AMPK activators and for improving therapeutic applicability.

First, a central challenge is the complexity related to the distinct combinations of the AMPK subunit isoforms in different tissues and species with distinct regulatory properties and functions. Characterization of the distribution of AMPK heterotrimeric complexes in humans and relevant preclinical models appears critical for both therapeutic and drug discovery purposes. Another important determinant of AMPK action is the subcellular localization of the different isoform combinations. Indeed, there is emerging evidence showing that AMPK isoform selectivity to specific substrates comes from their distinct subcellular localizations, rather than their intrinsic specificity [120]. In addition, localization of AMPK at cellular organelle membranes might also play a role in sensitizing AMPK to allosteric ligands [47]. Thus, more knowledge needs to be gained to further understand the multifaceted regulation and distinct function of AMPK complexes.

Second, the phosphorylation events (e.g., α -Thr172 and β -Ser108) needed for AMPK activation by small molecules binding at the ADaM or other sites remains unclear. Within the β -GBD, phosphorylation of β 1-Ser108 was shown to be required for the activation by small molecules binding in the ADaM site, such as salicylate, A-769662 and 991 [82,87,95]. In contrast to β 1-Ser108, phosphorylation of β 2-Ser108 is not required for AMPK activation by 991 [121], reflecting subtle changes between the β 1 and β 2 subunits in the topology of the β -GBD/ α -KD interface in interaction with the activating ligand in the ADaM site. It is known that β 1- and β 2-GBD adopt different docking onto the α -KD. In addition, presence of different amino acids near the ADaM site between the two β -isoforms may explain why some of the small molecule activators (e.g., benzimidazole derivatives) are able to activate either β 1-containing or both β 1- and β 2-containing AMPK isoforms [78]. Consistently, generation of chimeras in which nonconserved amino acids proximal to this interface have been swapped from β 1 to

$\beta 2$ leads to altered ligand specificity [81]. Crystal structure of a $\beta 2$ -containing isoform that contains a bound ligand at the ADaM site will help to better understand the molecular basis of these differences and may bring novel knowledge on the pharmacological regulation of AMPK. This information might be useful to design novel isoform or tissue-selective compounds minimizing unwanted side effects.

Third, it was originally reported that $\beta 1$ -Ser108 is an autophosphorylation site [122], but it was recently reported as a substrate for ULK1 under conditions associated with elevated AMP [47]. In an aspect relevant to therapeutics, these findings are significant given the importance of this post-translational modification in the mechanism of action of most AMPK synthetic activators and could impact on AMPK drug sensitization independently of autophosphorylation. Interestingly, ULK1 phosphorylation of Ser108 was shown to be specific to the AMPK $\beta 1$ -isoform due to divergence in the sequence surrounding Ser108 in the $\beta 2$ -isoform [47]. It is not known whether other kinases can phosphorylate $\beta 2$ -Ser108.

Fourth, an exception for the requirement of both α -Thr172 and β -Ser108 phosphorylation is synergistic activation of “naive” unphosphorylated AMPK with compounds binding simultaneously at the ADaM site and γ subunit (e.g., A-769662 or 991 and AMP, respectively) as shown in cell-free essays [121–123]. Binding of small molecule in the ADaM site appears to be sufficient to stabilize the activation loop in an active conformation [121]. Interestingly, combination of A-769662 with C2 also resulted in a synergistic allosteric activation of AMPK bypassing the need for AMPK- α Thr172 phosphorylation [85]. These findings have important implications for development of AMPK-targeting therapeutics and point to possible combinatorial therapies based on synergistic activation of AMPK by direct small molecule allosteric activators independent of AMP and in the absence of upstream phosphorylation (e.g., due to genetic loss or downregulation of LKB1 signaling [96,124]). Discovery of a mechanism that induces AMPK drug sensitization independently of autophosphorylation also provides a potential strategy to treat non-small-cell lung and cervical carcinomas, associated with genetic loss of LKB1. However, whether phosphorylation of Thr172 is absolutely required for AMPK signaling in intact cells remains controversial. While Dite *et al.* reported that combination of A-769662 and phenformin can trigger AMPK cellular signaling independently of α -Thr172 phosphorylation [47], Willows *et al.* failed to activate AMPK signaling in the presence of 991 and 2-deoxyglucose in cells lacking both LKB1 and CaMKK2 [121].

Fifth, while small molecule AMPK activators hold promise for the treatment of a number of human pathologies, concerns about adverse effects of systemic and chronic AMPK activation were raised by studies from naturally occurring single point mutations within the human *PRKAG2* gene [125,126]. These mutations have been associated with increased basal activity of AMPK and are associated with deleterious metabolic cardiac phenotype and hypertrophy. In addition, a genetic mouse model with analogous mutation showed hyperphagia, obesity and impaired β -cell function, questioning the safety of chronic and generalized AMPK activators [118]. Henceforth, establishing efficacy and safety would be essential before AMPK activators would be appropriate for introduction into clinical studies. The potential cardiac safety concerns associated with chronic systemic AMPK activation with MK-8722 have been recently evaluated in rhesus monkeys dosed for up to 8 months [111]. Although increased cardiac glycogen content and hypertrophy was observed but without any changes in electrocardiogram and apparent functional cardiac sequelae, any safety issues associated with AMPK activators remains to be carefully determined in phase I trials. However, the exciting possibility of safe AMPK-driven therapeutics is encouraged by the recently reported advancement and successful completion of phase I trials for two novel small molecule AMPK activators, PXL770 and O304, from Poxel SA and Betagenon AB, respectively [127,128].

Sixth, significant progress has been made during the last few years regarding the molecular mechanisms underlying the activation of

AMPK and this should aid to develop more potent and specific compounds. Information from crystallographic structures combined with computer-based drug design hold promise as a rational approach for discovering isoform-specific small molecule AMPK activators [129,130]. Identification of novel $\beta 1$ -selective AMPK activators by virtual screening using molecular docking was recently reported [131] and holds promise on structure-based design of novel isoform-selective AMPK activators. In addition, improvement of screening methods based on the measure of direct allosteric activation, protection from dephosphorylation or a combination of both can contribute to fasten the identification of new hits [73,74,132]. Also, the use of specially-configured biosensors to monitor AMPK activation or conformational changes induced by ligands opens possibilities for identification and characterization of AMPK activators in cell-based assays [133].

7. Conclusion

Given the pleiotropic action of AMPK signaling on many cellular processes (e.g., increase glucose uptake in skeletal muscle), AMPK has gained much attention as a therapeutic target and there has been a major drive to develop pharmacological activators. The first described pharmacological AMPK activator was the pro-drug AICAR, metabolized into ZMP to mimic the allosteric effects of AMP on the AMPK system owing to its structural analogy with the adenine nucleotide. However, its therapeutic use in humans have so far been inconclusive, given to its relatively high threshold for AMPK activation in skeletal muscle [134]. In 2006, discovery of the first direct AMPK activator, A-769662, provided a novel insight into the development of direct AMPK activators by demonstrating that AMPK activation with non-nucleotide ligands was possible [75]. Several new direct AMPK activators have been reported (Fig. 3). They exhibit different mechanisms of action through binding to a novel allosteric site formed between the small lobe of the α -KD and the β -GBD (ADaM site) or a site located within the solvent-accessible core of the AMPK- γ subunit. Interestingly, combination strategies involving compounds binding at these different sites resulted in a synergistic effect on the phosphorylation of AMPK and physiological effects in intact cells [71,96,135–138]. These findings are highly relevant from a pharmaceutical point of view for the development of combined treatment of various AMPK agonists such as direct small molecule AMPK activators and the indirect AMPK activator metformin. These combinatorial treatments would be of value to enhance AMPK activation in patients and could help to reduce the amount of drugs administered for a better tolerability and efficacy. While some small molecules are potent pan-activators for all 12 heterotrimeric AMPK complexes, other show isoform-specific activation for AMPK complexes containing the $\alpha 1$ - or $\beta 1$ -isoforms. These findings indicate the possibility of developing isoform-selective AMPK activators for tissue-specific therapeutic interventions. For instance, one interesting therapeutic aspect will be to target the AMPK $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ heterotrimer which is specifically expressed in skeletal muscle and is predominantly activated by exercise compared to other AMPK heterotrimers [64] and thus, limit potential adverse effect on cardiac hypertrophy [111].

In conclusion, there has been a dramatic progress over the last few years in the development of direct small molecule AMPK activators and in the understanding of their mechanism of action. The ultimate challenge will be to translate the promising therapeutic findings from pre-clinical animal studies into practical clinical applications.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Inserm, CNRS, Université Paris Descartes, Société Francophone du Diabète (SFD) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) grant number DEQ20150934718. This work was performed within the Département Hospitalo-Universitaire (DHU) AUTOimmune and HORMonal diseasesS (AUTHORS). S.O. holds a doctoral fellowship from the Région Ile-de-

France (CORDDIM).

The authors have no conflict of interest related to this work.

References

- [1] D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley, AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern, *Chem. Biol.* 19 (10) (2012) 1222–1236.
- [2] D.G. Hardie, M.L. Ashford, AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels, *Physiology (Bethesda)* 29 (2) (2014) 99–107.
- [3] W.W. Winder, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes, *Am. J. Physiol.* 277 (1 Pt. 1) (1999) E1–E10.
- [4] R. Kjobsted, A.J. Pedersen, J.R. Hingst, R. Sabaratnam, J.B. Birk, J.M. Kristensen, K. Hojlund, J.F. Wojtaszewski, Real-time regulation of the AMPK signaling network in response to exercise and insulin in skeletal muscle of male patients with type 2 diabetes: illumination of AMPK activation in recovery from exercise, *Diabetes* 65 (5) (2016) 1219–1230.
- [5] D.G. Hardie, S.C. Lin, AMP-activated protein kinase – not just an energy sensor, *F1000Res* 6 (2017) 1724.
- [6] S.C. Lin, D.G. Hardie, AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status, *Cell Metab.* (2017).
- [7] D.G. Hardie, B.E. Schaffer, A. Brunet, AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs, *Trends Cell Biol.* 26 (3) (2016) 190–201.
- [8] C.S. Zhang, S.A. Hawley, Y. Zong, M. Li, Z. Wang, A. Gray, T. Ma, J. Cui, J.W. Feng, M. Zhu, Y.Q. Wu, T.Y. Li, Z. Ye, S.Y. Lin, H. Yin, H.L. Piao, D.G. Hardie, S.C. Lin, Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK, *Nature* 548 (7665) (2017) 112–116.
- [9] E.A. Day, R.J. Ford, G.R. Steinberg, AMPK as a therapeutic target for treating metabolic diseases, *Trends Endocrinol. Metab.* 28 (8) (2017) 545–560.
- [10] D. Garcia, R.J. Shaw, AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance, *Mol. Cell.* 66 (6) (2017) 789–800.
- [11] M.D. Fullerton, AMP-activated protein kinase and its multifaceted regulation of hepatic metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 27 (2) (2016) 172–180.
- [12] I.P. Salt, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase: an ubiquitous signaling pathway with key roles in the cardiovascular system, *Circ. Res.* 120 (11) (2017) 1825–1841.
- [13] T. Lang, L. Yu, Q. Tu, J. Jiang, Z. Chen, Y. Xin, G. Liu, S. Zhao, Molecular cloning, genomic organization, and mapping of PRKAG2, a heart abundant gamma2 subunit of 5'-AMP-activated protein kinase, to human chromosome 7q36, *Genomics* 70 (2) (2000) 258–263.
- [14] K. Pinter, R.T. Grignani, G. Czibik, H. Farza, H. Watkins, C. Redwood, Embryonic expression of AMPK gamma subunits and the identification of a novel gamma2 transcript variant in adult heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53 (3) (2012) 342–349.
- [15] S.A. Hawley, J. Boudeau, J.L. Reid, K.J. Mustard, L. Udd, T.P. Makela, D.R. Alessi, D.G. Hardie, Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade, *J. Biol.* 2 (4) (2003) 28.
- [16] A. Woods, S.R. Johnstone, K. Dickerson, F.C. Leiper, L.G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, D. Carling, LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade, *Curr. Biol.* 13 (22) (2003) 2004–2008.
- [17] R.J. Shaw, M. Kosmatka, N. Bardeesy, R.L. Hurlley, L.A. Witters, R.A. DePinho, L.C. Cantley, The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (10) (2004) 3329–3335.
- [18] S.A. Hawley, D.A. Pan, K.J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A.M. Edelman, B.G. Frenguelli, D.G. Hardie, Calmodulin-dependent protein kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase, *Cell Metab.* 2 (1) (2005) 9–19.
- [19] A. Woods, K. Dickerson, R. Heath, S.P. Hong, M. Momcilovic, S.R. Johnstone, M. Carlson, D. Carling, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells, *Cell Metab.* 2 (1) (2005) 21–33.
- [20] R.L. Hurlley, K.A. Anderson, J.M. Franzone, B.E. Kemp, A.R. Means, L.A. Witters, The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases, *J. Biol. Chem.* 280 (32) (2005) 29060–29066.
- [21] S.M. Jeon, Regulation and function of AMPK in physiology and diseases, *Exp. Mol. Med.* 48 (7) (2016) e245.
- [22] K. Sakamoto, A. McCarthy, D. Smith, K.A. Green, D. Grahame Hardie, A. Ashworth, D.R. Alessi, Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction, *EMBO J.* 24 (10) (2005) 1810–1820.
- [23] K. Sakamoto, E. Zarrinpashneh, G.R. Budas, A.C. Pouleur, A. Dutta, A.R. Prescott, J.L. Vanoverschelde, A. Ashworth, A. Jovanovic, D.R. Alessi, L. Bertrand, Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPKalpha2 but not AMPKalpha1, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290 (5) (2006) E780–E788.
- [24] M. Xie, D. Zhang, J.R. Dyck, Y. Li, H. Zhang, M. Morishima, D.L. Mann, G.E. Taffet, A. Baldini, D.S. Khoury, M.D. Schneider, A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (46) (2006) 17378–17383.
- [25] G. Herrero-Martin, M. Hoyer-Hansen, C. Garcia-Garcia, C. Fumarola, T. Farkas, A. Lopez-Rivas, M. Jaattela, TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells, *EMBO J.* 28 (6) (2009) 677–685.
- [26] S. Inokuchi-Shimizu, E.J. Park, Y.S. Roh, L. Yang, B. Zhang, J. Song, S. Liang, M. Pimental, K. Taniguchi, X. Wu, K. Asahina, W. Lagakos, M.R. Mackey, S. Akira, M.H. Ellisman, D.D. Sears, J.M. Olefsky, M. Karin, D.A. Brenner, E. Seki, TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis, *J. Clin. Invest.* 124 (8) (2014) 3566–3578.
- [27] L. Garcia-Haro, M.A. Garcia-Gimeno, D. Neumann, M. Beullens, M. Bollen, P. Sanz, The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells, *FASEB J.* 24 (12) (2010) 5080–5091.
- [28] B.K. Joseph, H.Y. Liu, J. Francisco, D. Pandya, M. Donigan, C. Gallo-Ebert, C. Giordano, A. Bata, J.T. Nickels Jr., Inhibition of AMP kinase by the protein phosphatase 2A heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}, *J. Biol. Chem.* 290 (17) (2015) 10588–10598.
- [29] L. Chen, Z.H. Jiao, L.S. Zheng, Y.Y. Zhang, S.T. Xie, Z.X. Wang, J.W. Wu, Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase, *Nature* 459 (7250) (2009) 1146–1149.
- [30] L. Chen, F.J. Xin, J. Wang, J. Hu, Y.Y. Zhang, S. Wan, L.S. Cao, C. Lu, P. Li, S.F. Yan, D. Neumann, U. Schlattner, B. Xia, Z.X. Wang, J.W. Wu, Conserved regulatory elements in AMPK, *Nature* 498 (7453) (2013) E8–E10.
- [31] F.J. Xin, J. Wang, R.Q. Zhao, Z.X. Wang, J.W. Wu, Coordinated regulation of AMPK activity by multiple elements in the alpha-subunit, *Cell Res.* 23 (10) (2013) 1237–1240.
- [32] R.L. Hurlley, L.K. Barre, S.D. Wood, K.A. Anderson, B.E. Kemp, A.R. Means, L.A. Witters, Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP, *J. Biol. Chem.* 281 (48) (2006) 36662–36672.
- [33] N. Djouder, R.D. Tuerk, M. Suter, P. Salvioni, R.F. Thali, R. Scholz, K. Vaahotmeri, Y. Auchli, H. Rechsteiner, R.A. Brunisholz, B. Viollet, T.P. Makela, T. Wallimann, D. Neumann, W. Krek, PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis, *EMBO J.* 29 (2) (2010) 469–481.
- [34] S.A. Hawley, F.A. Ross, G.J. Gowans, P. Tibarewal, N.R. Leslie, D.G. Hardie, Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK-alpha1 down-regulates its activation in tumour cells, *Biochem. J.* 459 (2) (2014) 275–287.
- [35] S. Horman, D. Vertommen, R. Heath, D. Neumann, V. Mouton, A. Woods, U. Schlattner, T. Wallimann, D. Carling, L. Hue, M.H. Rider, Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491, *J. Biol. Chem.* 281 (9) (2006) 5335–5340.
- [36] Y. Dagon, E. Hur, B. Zheng, K. Wellenstein, L.C. Cantley, B.B. Kahn, p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake, *Cell Metab.* 16 (1) (2012) 104–112.
- [37] T. Suzuki, D. Bridges, D. Nakada, G. Skiniotiotis, S.J. Morrison, J.D. Lin, A.R. Saltiel, K. Inoki, Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3, *Mol. Cell.* 50 (3) (2013) 407–419.
- [38] H.R. Heathcote, S.J. Mancini, A. Strembitska, K. Jamal, J.A. Reihill, T.M. Palmer, G.W. Gould, I.P. Salt, Protein kinase C phosphorylates AMP-activated protein kinase alpha1 Ser487, *Biochem. J.* 473 (24) (2016) 4681–4697.
- [39] K.A. Coughlan, R.J. Valentine, B.S. Sudit, K. Allen, Y. Dagon, B.B. Kahn, N.B. Ruderman, A.K. Saha, PKD1 Inhibits AMPKalpha2 through phosphorylation of serine 491 and impairs insulin signaling in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 291 (11) (2016) 5664–5675.
- [40] C.T. Pineda, S. Ramanathan, K. Fon Tacer, J.L. Weon, M.B. Potts, Y.H. Ou, M.A. White, P.R. Potts, Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase, *Cell* 160 (4) (2015) 715–728.
- [41] I.K. Vila, Y. Yao, G. Kim, W. Xia, H. Kim, S.J. Kim, M.K. Park, J.P. Hwang, E. Gonzalez-Billalabeitia, M.C. Hung, S.J. Song, M.S. Song, A UBE2O-AMPKalpha2 axis that promotes tumor initiation and progression offers opportunities for therapy, *Cancer Cell* 31 (2) (2017) 208–224.
- [42] N. Kazgan, T. Williams, L.J. Forsberg, J.E. Brenman, Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase, *Mol. Biol. Cell.* 21 (19) (2010) 3433–3442.
- [43] I. Salt, J.W. Celler, S.A. Hawley, A. Prescott, A. Woods, D. Carling, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform, *Biochem. J.* 334 (Pt 1) (1998) 177–187.
- [44] S.M. Warden, C. Richardson, J. O'Donnell Jr., D. Stapleton, B.E. Kemp, L.A. Witters, Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization, *Biochem. J.* 354 (Pt. 2) (2001) 275–283.
- [45] J.S. Oakhill, Z.P. Chen, J.W. Scott, R. Steel, L.A. Castelli, N. Ling, S.L. Macaulay, B.E. Kemp, Beta-subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (45) (2010) 19237–19241.
- [46] J. Liang, Z.X. Xu, Z. Ding, Y. Lu, Q. Yu, K.D. Werle, G. Zhou, Y.Y. Park, G. Peng, M.J. Gambello, G.B. Mills, Myristoylation confers noncanonical AMPK functions in autophagy selectivity and mitochondrial surveillance, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7926.
- [47] T.A. Dite, N.X.Y. Ling, J.W. Scott, A. Hoque, S. Galic, B.L. Parker, K.R.W. Ngoei, C.G. Langendorf, M.T. O'Brien, M. Kundu, B. Viollet, G.R. Steinberg, K. Sakamoto, B.E. Kemp, J.S. Oakhill, The autophagy initiator ULK1 sensitizes AMPK to allosteric drugs, *Nat. Commun.* 8 (1) (2017) 571.
- [48] S.B. Jorgensen, J.N. Nielsen, J.B. Birk, G.S. Olsen, B. Viollet, F. Andreelli, P. Schjerling, S. Vaulont, D.G. Hardie, B.F. Hansen, E.A. Richter, J.F. Wojtaszewski, The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading, *Diabetes*

- 53 (12) (2004) 3074–3081.
- [49] L. Bultot, B. Guigas, A. Von Wilamowitz-Moellendorff, L. Maisin, D. Vertommen, N. Hussain, M. Beullens, J.J. Guinovart, M. Foretz, B. Viollet, K. Sakamoto, L. Hue, M.H. Rider, AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase, *Biochem. J.* 443 (1) (2012) 193–203.
- [50] G. Polekhina, A. Gupta, B.J. Michell, B. van Denderen, S. Murthy, S.C. Feil, I.G. Jennings, D.J. Campbell, L.A. Witters, M.W. Parker, B.E. Kemp, D. Stapleton, AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen, *Curr. Biol.* 13 (10) (2003) 867–871.
- [51] A. Koay, B. Woodcroft, E.J. Petrie, H. Yue, S. Emanuelle, M. Bieri, M.F. Bailey, M. Hargreaves, J.T. Park, K.H. Park, S. Ralph, D. Neumann, D. Stapleton, P.R. Gooley, AMPK beta subunits display isoform specific affinities for carbohydrates, *FEBS Lett.* 584 (15) (2010) 3499–3503.
- [52] Y. Oligschlaeger, M. Miglianico, D. Chanda, R. Scholz, R.F. Thali, R. Tuerk, D.I. Stapleton, P.R. Gooley, D. Neumann, The recruitment of AMP-activated protein kinase to glycogen is regulated by autophosphorylation, *J. Biol. Chem.* 290 (18) (2015) 11715–11728.
- [53] H. Xu, N.T. Frankenberg, G.D. Lamb, P.R. Gooley, D.I. Stapleton, R.M. Murphy, When phosphorylated at Thr148, the beta2-subunit of AMP-activated kinase does not associate with glycogen in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 311 (1) (2016) C35–C42.
- [54] H. Sakoda, M. Fujishiro, J. Fujio, N. Shojima, T. Ogihara, A. Kushiyama, Y. Fukushima, M. Anai, H. Ono, M. Kikuchi, N. Horike, A.Y. Viana, Y. Uchijima, H. Kurihara, T. Asano, Glycogen debranching enzyme association with beta-subunit regulates AMP-activated protein kinase activity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289 (3) (2005) E474–E481.
- [55] J.S. Oakhill, R. Steel, Z.P. Chen, J.W. Scott, N. Ling, S. Tam, B.E. Kemp, AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase, *Science* 332 (6036) (2011) 1433–1435.
- [56] B. Xiao, R. Heath, P. Saiu, F.C. Leiper, P. Leone, C. Jing, P.A. Walker, L. Haire, J.F. Eccleston, C.T. Davis, S.R. Martin, D. Carling, S.J. Gamblin, Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase, *Nature* 449 (7161) (2007) 496–500.
- [57] G.J. Gowans, S.A. Hawley, F.A. Ross, D.G. Hardie, AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation, *Cell Metab.* 18 (4) (2013) 556–566.
- [58] B. Xiao, M.J. Sanders, E. Underwood, R. Heath, F.V. Mayer, D. Carmena, C. Jing, P.A. Walker, J.F. Eccleston, L.F. Haire, P. Saiu, S.A. Howell, R. Aasland, S.R. Martin, D. Carling, S.J. Gamblin, Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP, *Nature* 472 (7342) (2011) 230–233.
- [59] F.A. Ross, T.E. Jensen, D.G. Hardie, Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms, *Biochem. J.* 473 (2) (2016) 189–199.
- [60] Y.L. Zhang, H. Guo, C.S. Zhang, S.Y. Lin, Z. Yin, Y. Peng, H. Luo, Y. Shi, G. Lian, C. Zhang, M. Li, Z. Ye, J. Ye, J. Han, P. Li, J.W. Wu, S.C. Lin, AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation, *Cell Metab.* 18 (4) (2013) 546–555.
- [61] C.S. Zhang, B. Jiang, M. Li, M. Zhu, Y. Peng, Y.L. Zhang, Y.Q. Wu, T.Y. Li, Y. Liang, Z. Lu, G. Lian, Q. Liu, H. Guo, Z. Yin, Z. Ye, J. Han, J.W. Wu, H. Yin, S.Y. Lin, S.C. Lin, The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism, *Cell Metab.* 20 (3) (2014) 526–540.
- [62] J.F. Wojtaszewski, J.B. Birk, C. Frogis, M. Holten, H. Pilegaard, F. Dela, 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes, *J. Physiol.* 564 (Pt 2) (2005) 563–573.
- [63] J.T. Trebak, J.B. Birk, B.F. Hansen, G.S. Olsen, J.F. Wojtaszewski, A-769662 activates AMPK beta1-containing complexes but induces glucose uptake through a PI3-kinase-dependent pathway in mouse skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297 (4) (2009) C1041–C1052.
- [64] J.B. Birk, J.F. Wojtaszewski, Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle, *J. Physiol.* 577 (Pt. 3) (2006) 1021–1032.
- [65] E.J. Kurth-Kraczek, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, W.W. Winder, 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle, *Diabetes* 48 (8) (1999) 1667–1671.
- [66] J.T. Trebak, C. Pehmoller, J.M. Kristensen, R. Kjobsted, J.B. Birk, P. Schjerling, E.A. Richter, L.J. Goodyear, J.F. Wojtaszewski, Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle, *J. Physiol.* 592 (2) (2014) 351–375.
- [67] J. Wu, D. Puppala, X. Feng, M. Monetti, A.L. Lapworth, K.F. Geoghegan, Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated protein kinase (AMPK), *J. Biol. Chem.* 288 (50) (2013) 35904–35912.
- [68] X. Stephenne, M. Foretz, N. Taleux, G.C. van der Zon, E. Sokal, L. Hue, B. Viollet, B. Guigas, Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status, *Diabetologia* 54 (12) (2011) 3101–3110.
- [69] E.P. Brass, C.L. Hoppel, Mitochondria as targets of drug toxicity: lessons from the R118 phase 1 experience, *Clin. Pharmacol. Ther.* 98 (5) (2015) 464–466.
- [70] C.C. Low Wang, J.L. Galinkin, W.R. Hiatt, Toxicity of a novel therapeutic agent targeting mitochondrial complex I, *Clin. Pharmacol. Ther.* 98 (5) (2015) 551–559.
- [71] M. Foretz, S. Hebrard, J. Leclerc, E. Zarrinpashneh, M. Soty, G. Mithieux, K. Sakamoto, F. Andreelli, B. Viollet, Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state, *J. Clin. Invest.* 120 (7) (2010) 2355–2369.
- [72] B. Guigas, K. Sakamoto, N. Taleux, S.M. Reyna, N. Musi, B. Viollet, L. Hue, Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators, *IUBMB Life* 61 (1) (2009) 18–26.
- [73] S.E. Sinnott, J.E. Brenman, Past strategies and future directions for identifying AMP-activated protein kinase (AMPK) modulators, *Pharmacol. Ther.* 143 (1) (2014) 111–118.
- [74] J. Kim, J. Shin, J. Ha, Screening methods for AMP-activated protein kinase modulators: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.* 25 (3) (2015) 261–277.
- [75] B. Cool, B. Zinker, W. Chiou, L. Kifle, N. Cao, M. Perham, R. Dickinson, A. Adler, G. Gagne, R. Iyengar, G. Zhao, K. Marsh, P. Kym, P. Jung, H.S. Camp, E. Frevort, Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome, *Cell Metab.* 3 (6) (2006) 403–416.
- [76] B. Guigas, B. Viollet, Targeting AMPK: from ancient drugs to new small-molecule activators, *Exs* 107 (2016) 327–350.
- [77] J. Kim, G. Yang, Y. Kim, J. Ha, AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities, *Exp. Mol. Med.* 48 (2016) e224.
- [78] K.O. Cameron, R.G. Kurumbail, Recent progress in the identification of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activators, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (21) (2016) 5139–5148.
- [79] H. Yun, J. Ha, AMP-activated protein kinase modulators: a patent review (2006–2010), *Expert Opin. Ther. Pat.* 21 (7) (2011) 983–1005.
- [80] R.W. Hunter, M. Foretz, L. Bultot, M.D. Fullerton, M. Deak, F.A. Ross, S.A. Hawley, N. Shpiro, B. Viollet, D. Barron, B.E. Kemp, G.R. Steinberg, D.G. Hardie, K. Sakamoto, Mechanism of action of compound-13: an alpha1-selective small molecule activator of AMPK, *Chem. Biol.* 21 (7) (2014) 866–879.
- [81] M.F. Calabrese, F. Rajamohan, M.S. Harris, N.L. Caspers, R. Magyar, J.M. Withka, H. Wang, K.A. Borzilleri, P.V. Sahasrabudhe, L.R. Hoth, K.F. Geoghegan, S. Han, J. Brown, T.A. Subashi, A.R. Reyes, R.K. Frisbie, J. Ward, R.A. Miller, J.A. Landro, A.T. Londregan, P.A. Carpino, S. Cabral, A.C. Smith, E.L. Conn, K.O. Cameron, X. Qiu, R.G. Kurumbail, Structural basis for AMPK activation: natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms, *Structure* 22 (8) (2014) 1161–1172.
- [82] B. Xiao, M.J. Sanders, D. Carmena, N.J. Bright, L.F. Haire, E. Underwood, B.R. Patel, R.B. Heath, P.A. Walker, S. Hallen, F. Giordanetto, S.R. Martin, D. Carling, S.J. Gamblin, Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators, *Nat. Commun.* 4 (2013) 3017.
- [83] X. Li, L. Wang, X.E. Zhou, J. Ke, P.W. de Waal, X. Gu, M.H. Tan, D. Wang, D. Wu, H.E. Xu, K. Melcher, Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen, *Cell Res.* 25 (1) (2015) 50–66.
- [84] F.A. Ross, S.A. Hawley, F.R. Auciello, G.J. Gowans, A. Atrih, D.J. Lamont, D.G. Hardie, Mechanisms of paradoxical activation of AMPK by the kinase inhibitors SU6656 and sorafenib, *Cell Chem. Biol.* 24 (7) (2017) 813–824 e4.
- [85] C.G. Langendorf, K.R. Ngoei, J.W. Scott, N.X. Ling, S.M. Issa, M.A. Gorman, M.W. Parker, K. Sakamoto, J.S. Oakhill, B.E. Kemp, Structural basis of allosteric and synergistic activation of AMPK by furan-2-phosphonic derivative C2 binding, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10912.
- [86] O. Goransson, A. McBride, S.A. Hawley, F.A. Ross, N. Shpiro, M. Foretz, B. Viollet, D.G. Hardie, K. Sakamoto, Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 282 (45) (2007) 32549–32560.
- [87] M.J. Sanders, Z.S. Ali, B.D. Hegarty, R. Heath, M.A. Snowden, D. Carling, Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family, *J. Biol. Chem.* 282 (45) (2007) 32539–32548.
- [88] S.A. Hawley, F.A. Ross, C. Chevztzoff, K.A. Green, A. Evans, S. Fogarty, M.C. Towler, L.J. Brown, O.A. Ogunbayo, A.M. Evans, D.G. Hardie, Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation, *Cell Metab.* 11 (6) (2010) 554–565.
- [89] J.W. Scott, B.J. van Denderen, S.B. Jorgensen, J.E. Honeyman, G.R. Steinberg, J.S. Oakhill, T.J. Iseli, A. Koay, P.R. Gooley, D. Stapleton, B.E. Kemp, Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes, *Chem. Biol.* 15 (11) (2008) 1220–1230.
- [90] B. Benziane, M. Bjornholm, L. Lantier, B. Viollet, J.R. Zierath, A.V. Chibalin, AMP-activated protein kinase activator A-769662 is an inhibitor of the Na(+)-K(+) ATPase, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297 (6) (2009) C1554–C1566.
- [91] D. Moreno, E. Knecht, B. Viollet, P. Sanz, A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism, *FEBS Lett.* 582 (17) (2008) 2650–2654.
- [92] Y.C. Lai, S. Kviklyte, D. Vertommen, L. Lantier, M. Foretz, B. Viollet, S. Hallen, M.H. Rider, A small-molecule benzimidazole derivative that potently activates AMPK to increase glucose transport in skeletal muscle: comparison with effects of contraction and other AMPK activators, *Biochem. J.* 460 (3) (2014) 363–375.
- [93] B. Viollet, B. Guigas, J. Leclerc, S. Hebrard, L. Lantier, R. Mounier, F. Andreelli, M. Foretz, AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives, *Acta Physiol.* 196 (1) (2009) 81–98.
- [94] B.K. Smith, K. Marcinko, E.M. Desjardins, J.S. Lally, R.J. Ford, G.R. Steinberg, Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 311 (4) (2016) E730–E740.
- [95] S.A. Hawley, M.D. Fullerton, F.A. Ross, J.D. Schertzer, C. Chevztzoff, K.J. Walker, M.W. Peggie, D. Zibrova, K.A. Green, K.J. Mustard, B.E. Kemp, K. Sakamoto, G.R. Steinberg, D.G. Hardie, The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase, *Science* 336 (6083) (2012) 918–922.
- [96] N. Boudaba, A. Marion, C. Huet, R. Pierre, B. Viollet, M. Foretz, AMPK re-activation suppresses hepatic steatosis but its downregulation does not promote fatty liver development, *EBioMedicine* (2018).

- [97] F.A. Duca, C.D. Cote, B.A. Rasmussen, M. Zadeh-Tahmasebi, G.A. Rutter, B.M. Filippi, T.K. Lam, Metformin activates a duodenal AMPK-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats, *Nat. Med.* 21 (5) (2015) 506–511.
- [98] R. Mounier, M. Theret, L. Arnold, S. Cuvellier, L. Bultot, O. Goransson, N. Sanz, A. Ferry, K. Sakamoto, M. Foretz, B. Viollet, B. Chazaud, AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration, *Cell Metab.* 18 (2) (2013) 251–264.
- [99] S.J. Mancini, A.D. White, S. Bijland, C. Rutherford, D. Graham, E.A. Richter, B. Viollet, R.M. Touyz, T.M. Palmer, I.P. Salt, Activation of AMP-activated protein kinase rapidly suppresses multiple pro-inflammatory pathways in adipocytes including IL-1 receptor-associated kinase-4 phosphorylation, *Mol. Cell Endocrinol.* 440 (2017) 44–56.
- [100] C. Rutherford, C. Speirs, J.J. Williams, M.A. Ewart, S.J. Mancini, S.A. Hawley, C. Delles, B. Viollet, A.P. Costa-Pereira, G.S. Baillie, I.P. Salt, T.M. Palmer, Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling, *Sci. Signal.* 9 (453) (2016) ra109.
- [101] S. Galic, M.D. Fullerton, J.D. Schertzer, S. Sikkema, K. Marcinko, C.R. Walkley, D. Izon, J. Honeyman, Z.P. Chen, B.J. van Denderen, B.E. Kemp, G.R. Steinberg, Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity, *J. Clin. Invest.* 121 (12) (2011) 4903–4915.
- [102] M. Guma, Y. Wang, B. Viollet, R. Liu-Bryan, AMPK activation by A-769662 controls IL-6 expression in inflammatory arthritis, *PLoS One* 10 (10) (2015) e0140452.
- [103] A.S. Kim, E.J. Miller, T.M. Wright, J. Li, D. Qi, K. Atsina, V. Zaha, K. Sakamoto, L.H. Young, A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51 (1) (2011) 24–32.
- [104] A.D. Timmermans, M. Balteau, R. Gelinas, E. Renguet, A. Ginion, C. de Meester, K. Sakamoto, J.L. Balligand, F. Bontemps, J.L. Vanoverschelde, S. Horman, C. Beauloye, L. Bertrand, A-769662 potentiates the effect of other AMP-activated protein kinase activators on cardiac glucose uptake, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306 (12) (2014) H1619–H1630.
- [105] G. Zadra, C. Photopoulos, S. Tyekucheva, P. Heidari, Q.P. Weng, G. Fedele, H. Liu, N. Scaglia, C. Priolo, E. Scinska, U. Mahmood, S. Signoretti, N. Birnberg, M. Loda, A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis, *EMBO Mol. Med.* 6 (4) (2014) 519–538.
- [106] K.O. Cameron, D.W. Kung, A.S. Kalgutkar, R.G. Kurumbail, R. Miller, C.T. Salatto, J. Ward, J.M. Withka, S.K. Bhattacharya, M. Boehm, K.A. Borzilleri, J.A. Brown, M. Calabrese, N.L. Caspers, E. Cokorinos, E.L. Conn, M.S. Dowling, D.J. Edmonds, H. Eng, D.P. Fernando, R. Frisbie, D. Hepworth, J. Landro, Y. Mao, F. Rajamohan, A.R. Reyes, C.R. Rose, T. Ryder, A. Shavnya, A.C. Smith, M. Tu, A.C. Wolford, J. Xiao, Discovery and preclinical characterization of 6-chloro-5-[4-(1-hydroxycyclobutyl)phenyl]-1*H*-indole-3-carboxylic acid (PF-06409577), a direct activator of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), for the potential treatment of diabetic nephropathy, *J. Med. Chem.* 59 (17) (2016) 8068–8081.
- [107] C.T. Salatto, R.A. Miller, K.O. Cameron, E. Cokorinos, A. Reyes, J. Ward, M.F. Calabrese, R.G. Kurumbail, F. Rajamohan, A.S. Kalgutkar, D.A. Tess, A. Shavnya, N.E. Genung, D.J. Edmonds, A. Jatkar, B.S. Maciejewski, M. Amaro, H. Gandhok, M. Monetti, K. Cialdea, E. Bollinger, J.M. Kreeger, T.M. Coskran, A.C. Opsahl, G.G. Boucher, M.J. Birnbaum, P. DaSilva-Jardine, T. Rolph, Selective activation of AMPK β 1-containing isoforms improves kidney function in a rat model of diabetic nephropathy, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 361 (2) (2017) 303–311.
- [108] E.C. Cokorinos, J. Delmore, A.R. Reyes, B. Albuquerque, R. Kjobsted, N.O. Jorgensen, J.L. Tran, A. Jatkar, K. Cialdea, R.M. Esquejo, J. Meissen, M.F. Calabrese, J. Cordes, R. Moccia, D. Tess, C.T. Salatto, T.M. Coskran, A.C. Opsahl, D. Flynn, M. Blatnik, W. Li, E. Kindt, M. Foretz, B. Viollet, J. Ward, R.G. Kurumbail, A.S. Kalgutkar, J.F.P. Wojtaszewski, K.O. Cameron, R.A. Miller, Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-human primates and mice, *Cell Metab.* 25 (5) (2017) 1147–1159e10. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02286882?term=PF-06409577&rank=1>.
- [109] R. Willows, N. Navaratnam, A. Lima, J. Read, D. Carling, Effect of different gamma-subunit isoforms on the regulation of AMPK, *Biochem. J.* 474 (10) (2017) 1741–1754.
- [110] R.W. Myers, H.P. Guan, J. Ehrhart, A. Petrov, S. Prahalada, E. Tozzo, X. Yang, M.M. Kurtz, M. Trujillo, D. Gonzalez Trotter, D. Feng, S. Xu, G. Eiermann, M.A. Holahan, D. Rubins, S. Conarello, X. Niu, S.C. Souza, C. Miller, J. Liu, K. Lu, W. Feng, Y. Li, R.E. Painter, J.A. Milligan, H. He, F. Liu, A. Ogawa, D. Wisniewski, R.J. Rohm, L. Wang, M. Bunzel, Y. Qian, W. Zhu, H. Wang, B. Bennet, L. LaFranco Scheuch, G.E. Fernandez, C. Li, M. Klimas, G. Zhou, M. van Heek, T. Biftu, A. Weber, D.E. Kelley, N. Thornberry, M.D. Erion, D.M. Kemp, I.K. Sebat, Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy, *Science* 357 (6350) (2017) 507–511.
- [111] J.E. Gomez-Galeno, Q. Dang, T.H. Nguyen, S.H. Boyer, M.P. Grote, Z. Sun, M. Chen, W.A. Craig, P.D. van Poelje, D.A. MacKenna, E.E. Cable, P.A. Rolzin, P.D. Finn, B. Chi, D.L. Linemeyer, S.J. Hecker, M.D. Erion, A potent and selective AMPK activator that inhibits de novo lipogenesis, *ACS Med. Chem. Lett.* 1 (9) (2010) 478–482.
- [112] T. Pang, Z.S. Zhang, M. Gu, B.Y. Qiu, L.F. Yu, P.R. Cao, W. Shao, M.B. Su, J.Y. Li, F.J. Nan, J. Li, Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells, *J. Biol. Chem.* 283 (23) (2008) 16051–16060.
- [113] Y.Y. Li, L.F. Yu, L.N. Zhang, B.Y. Qiu, M.B. Su, F. Wu, D.K. Chen, T. Pang, M. Gu, W. Zhang, W.P. Ma, H.W. Jiang, J.Y. Li, F.J. Nan, J. Li, Novel small-molecule AMPK activator orally exerts beneficial effects on diabetic db/db mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273 (2) (2013) 325–334.
- [114] T.E. Jensen, F.A. Ross, M. Kleinert, L. Sylow, J.R. Knudsen, G.J. Gowans, D.G. Hardie, E.A. Richter, PT-1 selectively activates AMPK- γ 1 complexes in mouse skeletal muscle, but activates all three gamma subunit complexes in cultured human cells by inhibiting the respiratory chain, *Biochem. J.* 467 (3) (2015) 461–472.
- [115] J.W. Scott, J.S. Oakhill, N.X. Ling, C.G. Langendorf, R.C. Foitzik, B.E. Kemp, O.G. Issinger, ATP sensitive bi-quinolinyl activator of the AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2) (2014) 435–440.
- [116] J.W. Scott, S. Galic, K.L. Graham, R. Foitzik, N.X. Ling, T.A. Dite, S.M. Issa, C.G. Langendorf, Q.P. Weng, H.E. Thomas, T.W. Kay, N.C. Birnberg, G.R. Steinberg, B.E. Kemp, J.S. Oakhill, Inhibition of AMP-activated protein kinase at the allosteric drug-binding site promotes islet insulin release, *Chem. Biol.* 22 (6) (2015) 705–711.
- [117] A. Yavari, C.J. Stocker, S. Ghaffari, E.T. Wargent, V. Steeples, G. Czibik, K. Pinter, M. Bellahcene, A. Woods, P.B. Martinez de Morentin, C. Cansell, B.Y. Lam, A. Chuster, K. Petkevicius, M.S. Nguyen-Tu, A. Martinez-Sanchez, T.J. Pullen, P.L. Oliver, A. Stockenhuber, C. Nguyen, M. Lazdam, J.F. O'Dowd, P. Harikumar, M. Toth, C. Beall, T. Kyriakou, J. Parnis, D. Sarma, G. Katritsis, D.D. Wortmann, A.R. Harper, L.A. Brown, R. Willows, S. Gandra, V. Poncio, M.J. de Oliveira Figueiredo, N.R. Qi, S.N. Peirson, R.J. McCrimmon, B. Gereben, L. Tretter, C. Fekete, C. Redwood, G.S. Yeo, L.K. Heisler, G.A. Rutter, M.A. Smith, D.J. Withers, D. Carling, E.B. Sternick, J.R. Arch, M.A. Cawthorne, H. Watkins, H. Ashrafian, Chronic activation of gamma2 AMPK induces obesity and reduces beta cell function, *Cell Metab.* 23 (5) (2016) 821–836.
- [118] M. Domise, V. Vingtdoux, AMPK in neurodegenerative diseases, *Exs* 107 (2016) 153–177.
- [119] F.A. Ross, C. MacKintosh, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours, *FEBS J.* 283 (16) (2016) 2987–3001.
- [120] R. Willows, M.J. Sanders, B. Xiao, B.R. Patel, S.R. Martin, J. Read, J.R. Wilson, J. Hubbard, S.J. Gamblin, D. Carling, Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells, *Biochem. J.* 474 (17) (2017) 3059–3073.
- [121] J.W. Scott, N. Ling, S.M. Issa, T.A. Dite, M.T. O'Brien, Z.P. Chen, S. Galic, C.G. Langendorf, G.R. Steinberg, B.E. Kemp, J.S. Oakhill, Small molecule drug A-769662 and AMP synergistically activate naive AMPK independent of upstream kinase signaling, *Chem. Biol.* 21 (5) (2014) 619–627.
- [122] B. Viollet, M. Foretz, U. Schlattner, Bypassing AMPK phosphorylation, *Chem. Biol.* 21 (5) (2014) 567–569.
- [123] D.B. Shackelford, R.J. Shaw, The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression, *Nat. Rev. Cancer* 9 (8) (2009) 563–575.
- [124] E. Blair, C. Redwood, H. Ashrafian, M. Oliveira, J. Broxholme, B. Kerr, A. Salmon, I. Ostman-Smith, H. Watkins, Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis, *Hum. Mol. Genet.* 10 (11) (2001) 1215–1220.
- [125] M.H. Gollub, M.S. Green, A.S. Tang, T. Gollob, A. Karibe, A.S. Ali Hassan, F. Ahmad, R. Lozado, G. Shah, L. Fananapazir, L.L. Bachinski, R. Roberts, Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome, *N. Engl. J. Med.* 344 (24) (2001) 1823–1831.
- [126] https://www.poxelpharma.com/en_us/product-pipeline/pxl770.
- [127] <http://betagenon.se/wp-content/uploads/2017/04/Betagenon-O304-2016.pdf>.
- [128] J. Kim, G. Yang, J. Ha, Targeting of AMP-activated protein kinase: prospects for computer-aided drug design, *Expert Opin. Drug Discovery* 12 (1) (2017) 47–59.
- [129] M. Miglianico, G.A. Nicolaes, D. Neumann, Pharmacological targeting of AMP-activated protein kinase and opportunities for computer-aided drug design, *J. Med. Chem.* 59 (7) (2016) 2879–2893.
- [130] T. Huang, J. Sun, S. Zhou, J. Gao, Y. Liu, Identification of direct activator of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) by structure-based virtual screening and molecular docking approach, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (7) (2017).
- [131] J. Ward, A.R. Reyes, R.G. Kurumbail, Allosteric modulation of AMPK enzymatic activity: in vitro characterization, *Methods Enzymol.* 587 (2017) 481–509.
- [132] M. Pelosse, C. Cottet-Rousselle, A. Grichine, I. Berger, U. Schlattner, Genetically encoded fluorescent biosensors to explore AMPK signaling and energy metabolism, *Exs* 107 (2016) 491–523.
- [133] M. Bosselaar, P. Smits, L.J. van Loon, C.J. Tack, Intravenous AICAR during hyperinsulinemia induces systemic hemodynamic changes but has no local metabolic effect, *J. Clin. Pharmacol.* 51 (10) (2011) 1449–1458.
- [134] A.J. O'Brien, L.A. Villani, L.A. Broadfield, V.P. Houde, S. Galic, G. Blandino, B.E. Kemp, T. Tsakiridis, P. Muti, G.R. Steinberg, Salicylate activates AMPK and synergizes with metformin to reduce the survival of prostate and lung cancer cells ex vivo through inhibition of de novo lipogenesis, *Biochem. J.* 469 (2) (2015) 177–187.
- [135] S. Ducommun, R.J. Ford, L. Bultot, M. Deak, L. Bertrand, B.E. Kemp, G.R. Steinberg, K. Sakamoto, Enhanced activation of cellular AMPK by dual-small molecule treatment: AICAR and A769662, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306 (6) (2014) E688–E696.
- [136] R.J. Ford, M.D. Fullerton, S.L. Pinkosky, E.A. Day, J.W. Scott, J.S. Oakhill, A.L. Bujak, B.K. Smith, J.D. Crane, R.M. Blumer, K. Marcinko, B.E. Kemp, H.C. Gerstein, G.R. Steinberg, Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity, *Biochem. J.* 468 (1) (2015) 125–132.
- [137] L. Bultot, T.E. Jensen, Y.C. Lai, A.L. Madsen, C. Collodet, S. Kviklyte, M. Deak, A. Yavari, M. Foretz, S. Ghaffari, M. Bellahcene, H. Ashrafian, M.H. Rider, E.A. Richter, K. Sakamoto, Benzimidazole derivative small-molecule 991 enhances AMPK activity and glucose uptake induced by AICAR or contraction in skeletal

- muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 311 (4) (2016) E706–E719.
- [139] S. Fraser, P. Mount, R. Hill, V. Levidiotis, F. Katsis, D. Stapleton, B.E. Kemp, D.A. Power, Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase in the kidney by dietary salt intake and osmolality, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288 (3) (2005) F578–F586.
- [140] S. Obba, Z. Hizir, L. Boyer, D. Selimoglu-Buet, A. Pfeifer, G. Michel, M.A. Hamouda, D. Goncalves, M. Cerezo, S. Marchetti, S. Rocchi, N. Droin, T. Cluzeau, G. Robert, F. Luciano, B. Robaye, M. Foretz, B. Viollet, L. Legros, E. Solary, P. Auberger, A. Jacquel, The PRKAA1/AMPK α 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML, *Autophagy* 11 (7) (2015) 1114–1129.
- [141] J. Kanellis, R.K. Kandane, D. Etemadmoghadam, S.A. Fraser, P.F. Mount, V. Levidiotis, B.E. Kemp, D.A. Power, Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells, *Immunol. Cell Biol.* 84 (1) (2006) 6–12.
- [142] D. Sag, D. Carling, R.D. Stout, J. Suttles, Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype, *J. Immunol.* 181 (12) (2008) 8633–8641.
- [143] P. Sujobert, L. Poulain, E. Paubelle, F. Zylbersztejn, A. Grenier, M. Lambert, E.C. Townsend, J.M. Brusq, E. Nicodeme, J. Decroocq, I. Nepstad, A.S. Green, J. Mondesir, M.A. Hospital, N. Jacque, A. Christodoulou, T.A. Desouza, O. Hermine, M. Foretz, B. Viollet, C. Lacombe, P. Mayeux, D.M. Weinstock, I.C. Moura, D. Bouscary, J. Tamburini, Co-activation of AMPK and mTORC1 induces cytotoxicity in acute myeloid leukemia, *Cell Rep.* 11 (9) (2015) 1446–1457.

Annexe 2 : Liste des publications

- **2019**

Olivier, S., Leclerc, J., Grenier, A., Foretz, M., Tamburini, J., & Viollet, B. (2019). AMPK Activation Promotes Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5171. doi: 10.3390/ijms20205171.

- **2018**

Olivier, S., Foretz, M., & Viollet, B. (2018). Promise and challenges for direct small molecule AMPK activators. *Biochem Pharmacol*, 153, 147-158. doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.049.

Grenier, A.*, Sujobert, P.*, Olivier, S.*, Guermouche, H., Mondésir, J., Kosmider, O., Viollet, B., Tamburini, J. (2018). Knockdown of human AMPK using the CRISPR/Cas9 genome-editing system. *Methods Mol Bio*, 1732 :171-194. doi: 10.1007/978-1-4939-7598-3_11.

* Premiers co-auteurs

Annexe 3 : Communications orales et affichées

Communications orales :

- **2019**

- 4th European Workshop on AMPK, Septembre 2019. Louvain-la-Neuve, Belgique
"Benefits of AMPK activation on intestinal barrier integrity"
- Club d'Etudes des Cellules Epithéliales et Digestives (CECED), mars 2019. Toulouse, France.
"Benefits of AMPK activation on intestinal barrier integrity"
- Journée des doctorants à l'Institut Cochin, Février 2019. Paris, France
"Benefits of AMPK activation on intestinal barrier integrity"

- **2018**

- Séminaire de département interne à l'Institut Cochin, Décembre 2018. Paris, France
"Benefits of AMPK following alterations of gut barrier"
- 3^{ème} symposium international de la chaire J.A. DeSève de recherche en nutrition, Novembre 2018. Paris, France
« Quel est le rôle de l'AMPK dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale ? »
- Séminaire de département interne à l'Institut Cochin, Avril 2018. Paris, France
"What is the contribution of AMPK in the maintenance of intestinal barrier integrity?"
- Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète (SFD), Mars 2018. Nantes, France
« Quel est le rôle de l'AMPK dans le maintien de l'homéostasie de la barrière intestinale ? »

Communications affichées :

- **2019**
 - 4th European Workshop on AMPK, Septembre 2019. Louvain-la-Neuve, Belgique
"Benefits of AMPK activation on intestinal barrier integrity"

- **2018**
 - International Meeting on AMPK, Octobre 2018. Niagara-on-the-Lake, Canada
"The importance of AMPK in the regulation of intestinal epithelium integrity following alterations of gut barrier"

- **2017**
 - Retraite du département Endocrinologie, Métabolisme, Diabète de l'Institut Cochin, Octobre 2017. Amboise, France
"What is the role of AMPK in the maintenance of intestinal barrier homeostasis?"
 - 3rd European Workshop on AMPK, Septembre 2017. Ile de Porquerolles, France
"What is the role of AMPK in the maintenance of intestinal barrier homeostasis?"

Références bibliographiques

- Abadjan, G. (2006). "http://www.eopathologies.com/acad/h_cd/dig3.pdf."
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W. R., Zhong, L., Chirala, S. S., Woldegiorgis, G. and Wakil, S. J. (2000). "The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1444-1449.
- Aijaz, S., Balda, M. S. and Matter, K. (2006). "Tight junctions: molecular architecture and function." *Int Rev Cytol* **248**: 261-298.
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C. R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S. R., Carling, D. and Small, C. J. (2004). "AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake." *J Biol Chem* **279**(13): 12005-12008.
- Angin, Y., Beauloye, C., Horman, S. and Bertrand, L. (2016). "Regulation of Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism, and Protein Metabolism by AMPK." *Exp Suppl* **107**: 23-43.
- Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M. and Taketo, M. M. (2003). "Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc+/Delta716 Cdx2+/- compound mutant mice." *Nat Genet* **35**(4): 323-330.
- Aznar, N., Patel, A., Rohena, C. C., Dunkel, Y., Joosen, L. P., Taupin, V., Kufareva, I., Farquhar, M. G. and Ghosh, P. (2016). "AMP-activated protein kinase fortifies epithelial tight junctions during energetic stress via its effector GIV/Girdin." *Elife* **5**.
- Baas, A. F., Kuipers, J., van der Wel, N. N., Batlle, E., Koerten, H. K., Peters, P. J. and Clevers, H. C. (2004). "Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD." *Cell* **116**(3): 457-466.
- Baba, Y., Noshu, K., Shima, K., Meyerhardt, J. A., Chan, A. T., Engelman, J. A., Cantley, L. C., Loda, M., Giovannucci, E., Fuchs, C. S. and Ogino, S. (2010). "Prognostic significance of AMP-activated protein kinase expression and modifying effect of MAPK3/1 in colorectal cancer." *Br J Cancer* **103**(7): 1025-1033.
- Bai, A., Ma, A. G., Yong, M., Weiss, C. R., Ma, Y., Guan, Q., Bernstein, C. N. and Peng, Z. (2010). "AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis." *Biochem Pharmacol* **80**(11): 1708-1717.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. and Cohen, P. (2007). "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update." *Biochem J* **408**(3): 297-315.
- Barker, N. (2014). "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(1): 19-33.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. and Clevers, H. (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." *Nature* **449**(7165): 1003-1007.
- Basile, D. P., Anderson, M. D. and Sutton, T. A. (2012). "Pathophysiology of acute kidney injury." *Compr Physiol* **2**(2): 1303-1353.
- Bays, J. L., Campbell, H. K., Heidema, C., Sebbagh, M. and DeMali, K. A. (2017). "Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK." *Nat Cell Biol* **19**(6): 724-731.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S. and Dejana, E. (2000). "Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin." *J Biol Chem* **275**(27): 20520-20526.
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. and Harper, J. W. (2010). "Network organization of the human autophagy system." *Nature* **466**(7302): 68-76.
- Beri, R. K., Marley, A. E., See, C. G., Sopwith, W. F., Aguan, K., Carling, D., Scott, J. and Carey, F. (1994). "Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase." *FEBS Lett* **356**(1): 117-121.
- Bevins, C. L. and Salzman, N. H. (2011). "Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis." *Nat Rev Microbiol* **9**(5): 356-368.
- Bibi, S., Kang, Y., Du, M. and Zhu, M. J. (2018). "Dietary red raspberries attenuate dextran sulfate sodium-induced acute colitis." *J Nutr Biochem* **51**: 40-46.
- Birk, J. B. and Wojtaszewski, J. F. (2006). "Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle." *J Physiol* **577**(Pt 3): 1021-1032.

- Bland, M. L., Lee, R. J., Magallanes, J. M., Foskett, J. K. and Birnbaum, M. J. (2010). "AMPK supports growth in *Drosophila* by regulating muscle activity and nutrient uptake in the gut." *Dev Biol* **344**(1): 293-303.
- Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak, K., Chenard, M. P., Kedinger, M., Beck, F., Freund, J. N. and Domon-Dell, C. (2003). "The *Cdx2* homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development." *Gut* **52**(10): 1465-1471.
- Boudaba, N., Marion, A., Huet, C., Pierre, R., Viollet, B. and Foretz, M. (2018). "AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development." *EBioMedicine* **28**: 194-209.
- Boudeau, J., Baas, A. F., Deak, M., Morrice, N. A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A. R., Clevers, H. C. and Alessi, D. R. (2003). "MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm." *EMBO J* **22**(19): 5102-5114.
- Bove, J. and Hegardt, F. G. (1978). "Reversible modulation of rat liver 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme A reductase. Evidence for an enzyme-catalyzed phosphorylation-dephosphorylation system." *FEBS Lett* **90**(2): 198-202.
- Brignardello, J., Morales, P., Diaz, E., Romero, J., Brunser, O. and Gotteland, M. (2010). "Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function." *Aliment Pharmacol Ther* **32**(11-12): 1307-1314.
- Bultot, L., Guigas, B., Von Wilamowitz-Moellendorff, A., Maisin, L., Vertommen, D., Hussain, N., Beullens, M., Guinovart, J. J., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Hue, L. and Rider, M. H. (2012). "AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase." *Biochem J* **443**(1): 193-203.
- Calabrese, M. F., Rajamohan, F., Harris, M. S., Caspers, N. L., Magyar, R., Withka, J. M., Wang, H., Borzilleri, K. A., Sahasrabudhe, P. V., Hoth, L. R., Geoghegan, K. F., Han, S., Brown, J., Subashi, T. A., Reyes, A. R., Frisbie, R. K., Ward, J., Miller, R. A., Landro, J. A., Londregan, A. T., Carpino, P. A., Cabral, S., Smith, A. C., Conn, E. L., Cameron, K. O., Qiu, X. and Kurumbail, R. G. (2014). "Structural basis for AMPK activation: natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms." *Structure* **22**(8): 1161-1172.
- Canfield, P. E., Geerdes, A. M. and Molitoris, B. A. (1991). "Effect of reversible ATP depletion on tight-junction integrity in LLC-PK1 cells." *Am J Physiol* **261**(6 Pt 2): F1038-1045.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C. and Burcelin, R. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. and Burcelin, R. (2008). "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Cani, P. D. and Delzenne, N. M. (2007). "Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**(6): 729-734.
- Carling, D. (2019). "AMPK hierarchy: a matter of space and time." *Cell Res* **29**(6): 425-426.
- Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G. (1987). "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis." *FEBS Lett* **223**(2): 217-222.
- Castanares-Zapatero, D., Bouletti, C., Sommereyns, C., Gerber, B., Lecut, C., Mathivet, T., Horckmans, M., Communi, D., Foretz, M., Vanoverschelde, J. L., Germain, S., Bertrand, L., Laterre, P. F., Oury, C., Viollet, B., Horman, S. and Beauloye, C. (2013). "Connection between cardiac vascular permeability, myocardial edema, and inflammation during sepsis: role of the alpha1AMP-activated protein kinase isoform." *Crit Care Med* **41**(12): e411-422.
- Cerejido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A. and Sabatini, D. D. (1978). "Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support." *J Cell Biol* **77**(3): 853-880.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. and Vijay-Kumar, M. (2014). "Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice." *Curr Protoc Immunol* **104**: Unit 15 25.
- Chen, J. and Zhang, M. (2013). "The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity." *Exp Cell Res* **319**(10): 1357-1364.
- Chen, L., Wang, J., You, Q., He, S., Meng, Q., Gao, J., Wu, X., Shen, Y., Sun, Y., Wu, X. and Xu, Q. (2018). "Activating AMPK to Restore Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelium and to Attenuate Experimental Colitis by Metformin." *Front Pharmacol* **9**: 761.
- Chen, L., Wang, J., Zhang, Y. Y., Yan, S. F., Neumann, D., Schlattner, U., Wang, Z. X. and Wu, J. W. (2012). "AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes." *Nat Struct Mol Biol* **19**(7): 716-718.

- Chen, Z., Lei, C., Wang, C., Li, N., Srivastava, M., Tang, M., Zhang, H., Choi, J. M., Jung, S. Y., Qin, J. and Chen, J. (2019). "Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics." *Nat Commun* **10**(1): 104.
- Cheng, H. and Leblond, C. P. (1974). "Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types." *Am J Anat* **141**(4): 537-561.
- Chi, J. H., Seo, G. S. and Lee, S. H. (2018). "Oregonin inhibits inflammation and protects against barrier disruption in intestinal epithelial cells." *Int Immunopharmacol* **59**: 134-140.
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T. and Sawada, N. (2008). "Transmembrane proteins of tight junctions." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 588-600.
- Claret, M., Smith, M. A., Batterham, R. L., Selman, C., Choudhury, A. I., Fryer, L. G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A. W., Speakman, J. R., Barsh, G. S., Viollet, B., Vaulont, S., Ashford, M. L., Carling, D. and Withers, D. J. (2007). "AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons." *J Clin Invest* **117**(8): 2325-2336.
- Cokorinos, E. C., Delmore, J., Reyes, A. R., Albuquerque, B., Kjobsted, R., Jorgensen, N. O., Tran, J. L., Jatkar, A., Cialdea, K., Esquejo, R. M., Meissen, J., Calabrese, M. F., Cordes, J., Moccia, R., Tess, D., Salatto, C. T., Coskran, T. M., Opsahl, A. C., Flynn, D., Blatnik, M., Li, W., Kindt, E., Foretz, M., Viollet, B., Ward, J., Kurumbail, R. G., Kalgutkar, A. S., Wojtaszewski, J. F. P., Cameron, K. O. and Miller, R. A. (2017). "Activation of Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and Mice." *Cell Metab* **25**(5): 1147-1159 e1110.
- Collins, J. T. and Badireddy, M. (2019). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H. S. and Frevert, E. (2006). "Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome." *Cell Metab* **3**(6): 403-416.
- Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. and Hardie, D. G. (1995). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?" *Eur J Biochem* **229**(2): 558-565.
- Dale, S., Wilson, W. A., Edelman, A. M. and Hardie, D. G. (1995). "Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I." *FEBS Lett* **361**(2-3): 191-195.
- Das, V., Kroin, J. S., Moric, M., McCarthy, R. J. and Buvaendran, A. (2019). "Antihyperalgesia effect of AMP-activated protein kinase (AMPK) activators in a mouse model of postoperative pain." *Reg Anesth Pain Med*.
- Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. and Hardie, D. G. (1995). "5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC." *FEBS Lett* **377**(3): 421-425.
- Deng, J., Zeng, L., Lai, X., Li, J., Liu, L., Lin, Q. and Chen, Y. (2018). "Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPKalpha1-dependent inhibition of JNK signalling activation." *J Cell Mol Med* **22**(1): 546-557.
- Di Fusco, D., Dinallo, V., Monteleone, I., Laudisi, F., Marafini, I., Franze, E., Di Grazia, A., Dwairi, R., Colantoni, A., Ortenzi, A., Stolfi, C. and Monteleone, G. (2018). "Metformin inhibits inflammatory signals in the gut by controlling AMPK and p38 MAP kinase activation." *Clin Sci (Lond)* **132**(11): 1155-1168.
- Dial, A. G., Ng, S. Y., Manta, A. and Ljubicic, V. (2018). "The Role of AMPK in Neuromuscular Biology and Disease." *Trends Endocrinol Metab* **29**(5): 300-312.
- Dite, T. A., Langendorf, C. G., Hoque, A., Galic, S., Rebello, R. J., Ovens, A. J., Lindqvist, L. M., Ngoei, K. R. W., Ling, N. X. Y., Furic, L., Kemp, B. E., Scott, J. W. and Oakhill, J. S. (2018). "AMP-activated protein kinase selectively inhibited by the type II inhibitor SBI-0206965." *J Biol Chem* **293**(23): 8874-8885.
- Duca, F. A., Cote, C. D., Rasmussen, B. A., Zadeh-Tahmasebi, M., Rutter, G. A., Filippi, B. M. and Lam, T. K. (2015). "Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats." *Nat Med* **21**(5): 506-511.
- Ducommun, S., Deak, M., Sumpton, D., Ford, R. J., Nunez Galindo, A., Kussmann, M., Viollet, B., Steinberg, G. R., Foretz, M., Dayon, L., Morrice, N. A. and Sakamoto, K. (2015). "Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate." *Cell Signal* **27**(5): 978-988.

- Ducommun, S., Deak, M., Zeigerer, A., Goransson, O., Seitz, S., Collodet, C., Madsen, A. B., Jensen, T. E., Viollet, B., Foretz, M., Gut, P., Sumpton, D. and Sakamoto, K. (2019). "Chemical genetic screen identifies Gapex-5/GAPVD1 and STBD1 as novel AMPK substrates." *Cell Signal* **57**: 45-57.
- Dufour, G., Demers, M. J., Gagne, D., Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J. F., Cheng, J. Q., Fujita, N., Tsuruo, T., Vallee, K. and Vachon, P. H. (2004). "Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms." *J Biol Chem* **279**(42): 44113-44122.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M. K., Suzuki, A., Imhof, B. A. and Vestweber, D. (2003). "The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity." *J Cell Sci* **116**(Pt 19): 3879-3891.
- Ee, H. C., Erler, T., Bhathal, P. S., Young, G. P. and James, R. J. (1995). "Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma." *Am J Pathol* **147**(3): 586-592.
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M. and Shaw, R. J. (2011). "Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy." *Science* **331**(6016): 456-461.
- Eichner, L. J., Brun, S. N., Herzig, S., Young, N. P., Curtis, S. D., Shackelford, D. B., Shokhirev, M. N., Leblanc, M., Vera, L. I., Hutchins, A., Ross, D. S., Shaw, R. J. and Svensson, R. U. (2019). "Genetic Analysis Reveals AMPK Is Required to Support Tumor Growth in Murine Kras-Dependent Lung Cancer Models." *Cell Metab* **29**(2): 285-302 e287.
- el Marjou, F., Janssen, K. P., Chang, B. H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D. and Robine, S. (2004). "Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium." *Genesis* **39**(3): 186-193.
- Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van Ijzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., Broers, J., Verheyen, F., Dekker, J. and Masclee, A. (2012). "Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: in vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model." *PLoS One* **7**(4): e35008.
- Elamin, E. E., Masclee, A. A., Dekker, J., Pieters, H. J. and Jonkers, D. M. (2013). "Short-chain fatty acids activate AMP-activated protein kinase and ameliorate ethanol-induced intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cell monolayers." *J Nutr* **143**(12): 1872-1881.
- Enders, G. (2014). *Le charme discret de l'intestin : tout sur un organe mal aimé.*
- Esquejo, R. M., Salatto, C. T., Delmore, J., Albuquerque, B., Reyes, A., Shi, Y., Moccia, R., Cokorinos, E., Peloquin, M., Monetti, M., Barricklow, J., Bollinger, E., Smith, B. K., Day, E. A., Nguyen, C., Geoghegan, K. F., Kreeger, J. M., Opsahl, A., Ward, J., Kalgutkar, A. S., Tess, D., Butler, L., Shirai, N., Osborne, T. F., Steinberg, G. R., Birnbaum, M. J., Cameron, K. O. and Miller, R. A. (2018). "Activation of Liver AMPK with PF-06409577 Corrects NAFLD and Lowers Cholesterol in Rodent and Primate Preclinical Models." *EBioMedicine* **31**: 122-132.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M. and Cani, P. D. (2013). "Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(22): 9066-9071.
- Fanning, A. S., Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (2012). "Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia." *Mol Biol Cell* **23**(4): 577-590.
- Farin, H. F., Van Es, J. H. and Clevers, H. (2012). "Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells." *Gastroenterology* **143**(6): 1518-1529 e1517.
- Farquhar, M. G. and Palade, G. E. (1963). "Junctional complexes in various epithelia." *J Cell Biol* **17**: 375-412.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B. J., Viollet, B., Mamer, O. A., Avizonis, D., DeBerardinis, R. J., Siegel, P. M. and Jones, R. G. (2013). "AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo." *Cell Metab* **17**(1): 113-124.
- Forcet, C., Etienne-Manneville, S., Gaude, H., Fournier, L., Debilly, S., Salmi, M., Baas, A., Olschwang, S., Clevers, H. and Billaud, M. (2005). "Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity." *Hum Mol Genet* **14**(10): 1283-1292.
- Ford, R. J., Fullerton, M. D., Pinkosky, S. L., Day, E. A., Scott, J. W., Oakhill, J. S., Bujak, A. L., Smith, B. K., Crane, J. D., Blumer, R. M., Marcinko, K., Kemp, B. E., Gerstein, H. C. and Steinberg, G. R. (2015). "Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity." *Biochem J* **468**(1): 125-132.
- Foretz, M., Guigas, B. and Viollet, B. (2019). "Understanding the gluco-regulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus." *Nat Rev Endocrinol* **15**(10): 569-589.

- Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F. and Viollet, B. (2010). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state." *J Clin Invest* **120**(7): 2355-2369.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D. and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). "Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine." *Nature* **435**(7044): 964-968.
- Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z. P., O'Neill, H. M., Ford, R. J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D. G., Macaulay, S. L., Schertzer, J. D., Dyck, J. R., van Denderen, B. J., Kemp, B. E. and Steinberg, G. R. (2013). "Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin." *Nat Med* **19**(12): 1649-1654.
- Galic, S., Fullerton, M. D., Schertzer, J. D., Sikkema, S., Marcinko, K., Walkley, C. R., Izon, D., Honeyman, J., Chen, Z. P., van Denderen, B. J., Kemp, B. E. and Steinberg, G. R. (2011). "Hematopoietic AMPK beta1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity." *J Clin Invest* **121**(12): 4903-4915.
- Garcia, D., Hellberg, K., Chaix, A., Wallace, M., Herzig, S., Badur, M. G., Lin, T., Shokhirev, M. N., Pinto, A. F. M., Ross, D. S., Saghatelian, A., Panda, S., Dow, L. E., Metallo, C. M. and Shaw, R. J. (2019). "Genetic Liver-Specific AMPK Activation Protects against Diet-Induced Obesity and NAFLD." *Cell Rep* **26**(1): 192-208 e196.
- Garcia, M. A., Nelson, W. J. and Chavez, N. (2018). "Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**(4).
- Garcia-Haro, L., Garcia-Gimeno, M. A., Neumann, D., Beullens, M., Bollen, M. and Sanz, P. (2010). "The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells." *FASEB J* **24**(12): 5080-5091.
- Gareau, M. G., Jury, J. and Perdue, M. H. (2007). "Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(1): G198-203.
- Garnett, J. P., Baker, E. H., Naik, S., Lindsay, J. A., Knight, G. M., Gill, S., Tregoning, J. S. and Baines, D. L. (2013). "Metformin reduces airway glucose permeability and hyperglycaemia-induced Staphylococcus aureus load independently of effects on blood glucose." *Thorax* **68**(9): 835-845.
- Gelinas, R., Mailleux, F., Dontaine, J., Bultot, L., Demeulder, B., Ginion, A., Daskalopoulos, E. P., Esfahani, H., Dubois-Deruy, E., Lauzier, B., Gauthier, C., Olson, A. K., Bouchard, B., Des Rosiers, C., Viollet, B., Sakamoto, K., Balligand, J. L., Vanoverschelde, J. L., Beauloye, C., Horman, S. and Bertrand, L. (2018). "AMPK activation counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation." *Nat Commun* **9**(1): 374.
- Genser, L., Aguanno, D., Soula, H. A., Dong, L., Trystram, L., Assmann, K., Salem, J. E., Vaillant, J. C., Oppert, J. M., Laugerette, F., Michalski, M. C., Wind, P., Rousset, M., Brot-Laroche, E., Leturque, A., Clement, K., Thenet, S. and Poitou, C. (2018). "Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes." *J Pathol* **246**(2): 217-230.
- Ghosh, P., Swanson, L., Sayed, I. M., Mittal, Y., Lim, B. B., Ibeawushi, S.-R., Foretz, M., Viollet, B., Sahoo, D. and Das, S. (2019). Signaling Pathway to Detect and Repair the Leaky Gut barrier: Implications in Aging and Cancer.
- Giordanetto, F. and Karis, D. (2012). "Direct AMP-activated protein kinase activators: a review of evidence from the patent literature." *Expert Opin Ther Pat* **22**(12): 1467-1477.
- Gomez-Galeno, J. E., Dang, Q., Nguyen, T. H., Boyer, S. H., Grote, M. P., Sun, Z., Chen, M., Craigo, W. A., van Poelje, P. D., MacKenna, D. A., Cable, E. E., Rolzin, P. A., Finn, P. D., Chi, B., Linemeyer, D. L., Hecker, S. J. and Erion, M. D. (2010). "A Potent and Selective AMPK Activator That Inhibits de Novo Lipogenesis." *ACS Med Chem Lett* **1**(9): 478-482.
- Gongol, B., Sari, I., Bryant, T., Rosete, G. and Marin, T. (2018). "AMPK: An Epigenetic Landscape Modulator." *Int J Mol Sci* **19**(10).
- Gonzalez, A., Krieg, R., Massey, H. D., Carl, D., Ghosh, S., Gehr, T. W. B. and Ghosh, S. S. (2019). "Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression." *Nephrol Dial Transplant* **34**(5): 783-794.
- Gow, A., Southwood, C. M., Li, J. S., Pariali, M., Riordan, G. P., Brodie, S. E., Dianas, J., Bronstein, J. M., Kachar, B. and Lazzarini, R. A. (1999). "CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice." *Cell* **99**(6): 649-659.
- Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A. and Hardie, D. G. (2013). "AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation." *Cell Metab* **18**(4): 556-566.
- Grahame Hardie, D. (2016). "Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators." *Acta Pharm Sin B* **6**(1): 1-19.

- Grenier, A., Sujobert, P., Olivier, S., Guermouche, H., Mondesir, J., Kosmider, O., Viollet, B. and Tamburini, J. (2018). "Knockdown of Human AMPK Using the CRISPR/Cas9 Genome-Editing System." *Methods Mol Biol* **1732**: 171-194.
- Gribble, F. M. and Reimann, F. (2016). "Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium." *Annu Rev Physiol* **78**: 277-299.
- Guigas, B., Sakamoto, K., Taleux, N., Reyna, S. M., Musi, N., Viollet, B. and Hue, L. (2009). "Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators." *IUBMB Life* **61**(1): 18-26.
- Guigas, B., Taleux, N., Foretz, M., Detaille, D., Andreelli, F., Viollet, B. and Hue, L. (2007). "AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside." *Biochem J* **404**(3): 499-507.
- Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A. and Citi, S. (2008). "The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 601-613.
- Guma, M., Wang, Y., Viollet, B. and Liu-Bryan, R. (2015). "AMPK Activation by A-769662 Controls IL-6 Expression in Inflammatory Arthritis." *PLoS One* **10**(10): e0140452.
- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M. and Ma, T. Y. (2013). "Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14." *Am J Pathol* **182**(2): 375-387.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." *Mol Cell* **30**(2): 214-226.
- Hardie, D. G. (2018). "Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase." *J R Soc Interface* **15**(138).
- Hardie, D. G., Carling, D., Ferrari, S., Guy, P. S. and Aitken, A. (1986). "Characterization of the phosphorylation of rat mammary ATP-citrate lyase and acetyl-CoA carboxylase by Ca²⁺ and calmodulin-dependent multiprotein kinase and Ca²⁺ and phospholipid-dependent protein kinase." *Eur J Biochem* **157**(3): 553-561.
- Hardie, D. G. and Hawley, S. A. (2001). "AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited." *Bioessays* **23**(12): 1112-1119.
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E. and Brunet, A. (2016). "AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs." *Trends Cell Biol* **26**(3): 190-201.
- Harmel, E., Grenier, E., Bendjoudi Ouadda, A., El Chebly, M., Ziv, E., Beaulieu, J. F., Sane, A., Spahis, S., Laville, M. and Levy, E. (2014). "AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions." *Endocrinology* **155**(3): 873-888.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, A. W., Itoh, K., Kiyono, H. and Ohno, H. (2009). "Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response." *Nature* **462**(7270): 226-230.
- Hasenour, C. M., Ridley, D. E., Hughey, C. C., James, F. D., Donahue, E. P., Shearer, J., Viollet, B., Foretz, M. and Wasserman, D. H. (2014). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) effect on glucose production, but not energy metabolism, is independent of hepatic AMPK in vivo." *J Biol Chem* **289**(9): 5950-5959.
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. (2003). "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade." *J Biol* **2**(4): 28.
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." *Cell Metab* **2**(1): 9-19.
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M. C., Brown, L. J., Ogunbayo, O. A., Evans, A. M. and Hardie, D. G. (2010). "Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation." *Cell Metab* **11**(6): 554-565.
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Gowans, G. J., Tibarewal, P., Leslie, N. R. and Hardie, D. G. (2014). "Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK-alpha1 down-regulates its activation in tumour cells." *Biochem J* **459**(2): 275-287.
- Hawley, S. A., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Edelman, A. M., Carling, D. and Hardie, D. G. (1995). "5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms." *J Biol Chem* **270**(45): 27186-27191.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Högglund, P., Jarvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpaa, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W.,

Olschwang, S., Olsen, A. S., Stratton, M. R., de la Chapelle, A. and Aaltonen, L. A. (1998). "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome." *Nature* **391**(6663): 184-187.

Herrero-Martin, G., Hoyer-Hansen, M., Garcia-Garcia, C., Fumarola, C., Farkas, T., Lopez-Rivas, A. and Jaattela, M. (2009). "TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells." *EMBO J* **28**(6): 677-685.

Hill, D. R., Huang, S., Tsai, Y. H., Spence, J. R. and Young, V. B. (2017). "Real-time Measurement of Epithelial Barrier Permeability in Human Intestinal Organoids." *J Vis Exp*(130).

Hirose, T., Izumi, Y., Nagashima, Y., Tamai-Nagai, Y., Kurihara, H., Sakai, T., Suzuki, Y., Yamanaka, T., Suzuki, A., Mizuno, K. and Ohno, S. (2002). "Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation." *J Cell Sci* **115**(Pt 12): 2485-2495.

Hoffman, N. J., Parker, B. L., Chaudhuri, R., Fisher-Wellman, K. H., Kleinert, M., Humphrey, S. J., Yang, P., Holliday, M., Trefely, S., Fazakerley, D. J., Stockli, J., Burchfield, J. G., Jensen, T. E., Jothi, R., Kiens, B., Wojtaszewski, J. F., Richter, E. A. and James, D. E. (2015). "Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates." *Cell Metab* **22**(5): 922-935.

Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D. and Carlson, M. (2003). "Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8839-8843.

Hooper, L. V. and Gordon, J. I. (2001). "Commensal host-bacterial relationships in the gut." *Science* **292**(5519): 1115-1118.

Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I. and Voit, R. (2009). "AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42): 17781-17786.

Horman, S., Morel, N., Vertommen, D., Hussain, N., Neumann, D., Beauloye, C., El Najjar, N., Forcet, C., Viollet, B., Walsh, M. P., Hue, L. and Rider, M. H. (2008). "AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase." *J Biol Chem* **283**(27): 18505-18512.

Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L. and Rider, M. H. (2006). "Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491." *J Biol Chem* **281**(9): 5335-5340.

Houde, V. P., Donzelli, S., Sacconi, A., Galic, S., Hammill, J. A., Bramson, J. L., Foster, R. A., Tsakiridis, T., Kemp, B. E., Grasso, G., Blandino, G., Muti, P. and Steinberg, G. R. (2017). "AMPK beta1 reduces tumor progression and improves survival in p53 null mice." *Mol Oncol* **11**(9): 1143-1155.

Hunter, R. W., Foretz, M., Bultot, L., Fullerton, M. D., Deak, M., Ross, F. A., Hawley, S. A., Shpiro, N., Viollet, B., Barron, D., Kemp, B. E., Steinberg, G. R., Hardie, D. G. and Sakamoto, K. (2014). "Mechanism of action of compound-13: an alpha1-selective small molecule activator of AMPK." *Chem Biol* **21**(7): 866-879.

Hunter, R. W., Hughey, C. C., Lantier, L., Sundelin, E. I., Peggie, M., Zeqiraj, E., Sicheri, F., Jessen, N., Wasserman, D. H. and Sakamoto, K. (2018). "Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase." *Nat Med* **24**(9): 1395-1406.

Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M. and Esumi, H. (2001). "Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line." *Biochem Biophys Res Commun* **287**(2): 562-567.

Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K. L. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* **115**(5): 577-590.

Inokuchi-Shimizu, S., Park, E. J., Roh, Y. S., Yang, L., Zhang, B., Song, J., Liang, S., Pimienta, M., Taniguchi, K., Wu, X., Asahina, K., Lagakos, W., Mackey, M. R., Akira, S., Ellisman, M. H., Sears, D. D., Olefsky, J. M., Karin, M., Brenner, D. A. and Seki, E. (2014). "TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis." *J Clin Invest* **124**(8): 3566-3578.

Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T. and Tsukita, S. (2001). "Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions." *J Cell Biol* **154**(3): 491-497.

Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B. M. (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29): 12017-12022.

Jain, S., Suzuki, T., Seth, A., Samak, G. and Rao, R. (2011). "Protein kinase Czeta phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions." *Biochem J* **437**(2): 289-299.

Jalili-Firoozinezhad, S., Prantil-Baun, R., Jiang, A., Potla, R., Mammoto, T., Weaver, J. C., Ferrante, T. C., Kim, H. J., Cabral, J. M. S., Levy, O. and Ingber, D. E. (2018). "Modeling radiation injury-induced cell death and countermeasure drug responses in a human Gut-on-a-Chip." *Cell Death Dis* **9**(2): 223.

Jeon, S. M., Chandel, N. S. and Hay, N. (2012). "AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress." *Nature* **485**(7400): 661-665.

- Johanns, M., Pyr Dit Ruys, S., Houddane, A., Vertommen, D., Herinckx, G., Hue, L., Proud, C. G. and Rider, M. H. (2017). "Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase." *Cell Signal* **36**: 212-221.
- Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. and Hansson, G. C. (2008). "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 15064-15069.
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J. and Thompson, C. B. (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." *Mol Cell* **18**(3): 283-293.
- Jorgensen, S. B., Nielsen, J. N., Birk, J. B., Olsen, G. S., Viollet, B., Andreelli, F., Schjerling, P., Vaulont, S., Hardie, D. G., Hansen, B. F., Richter, E. A. and Wojtaszewski, J. F. (2004). "The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading." *Diabetes* **53**(12): 3074-3081.
- Kalsi, K. K., Garnett, J. P., Patkee, W., Weekes, A., Dockrell, M. E., Baker, E. H. and Baines, D. L. (2019). "Metformin attenuates the effect of Staphylococcus aureus on airway tight junctions by increasing PKCzeta-mediated phosphorylation of occludin." *J Cell Mol Med* **23**(1): 317-327.
- Kanellis, J., Kandane, R. K., Etemadmoghadam, D., Fraser, S. A., Mount, P. F., Levidiotis, V., Kemp, B. E. and Power, D. A. (2006). "Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells." *Immunol Cell Biol* **84**(1): 6-12.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T. and Uyeda, K. (2002). "Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* **277**(6): 3829-3835.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. S. (1988). "Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos." *Cell* **52**(3): 311-320.
- Khabaz, M. N., Abdelrahman, A. S. and Al-Maghrabi, J. A. (2019). "Expression of p-AMPK in colorectal cancer revealed substantial diverse survival patterns." *Pak J Med Sci* **35**(3): 685-690.
- Kim, A. S., Miller, E. J., Wright, T. M., Li, J., Qi, D., Atsina, K., Zaha, V., Sakamoto, K. and Young, L. H. (2011). "A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol* **51**(1): 24-32.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K. L. (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." *Nat Cell Biol* **13**(2): 132-141.
- Kim, Y. S. and Ho, S. B. (2010). "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress." *Curr Gastroenterol Rep* **12**(5): 319-330.
- Kjobsted, R., Hingst, J. R., Fentz, J., Foretz, M., Sanz, M. N., Pehmoller, C., Shum, M., Marette, A., Mounier, R., Trebak, J. T., Wojtaszewski, J. F. P., Viollet, B. and Lantier, L. (2018). "AMPK in skeletal muscle function and metabolism." *FASEB J* **32**(4): 1741-1777.
- Koh, S. J., Kim, J. M., Kim, I. K., Ko, S. H. and Kim, J. S. (2014). "Anti-inflammatory mechanism of metformin and its effects in intestinal inflammation and colitis-associated colon cancer." *J Gastroenterol Hepatol* **29**(3): 502-510.
- Kongsuphol, P., Hieke, B., Ousingsawat, J., Almaca, J., Viollet, B., Schreiber, R. and Kunzelmann, K. (2009). "Regulation of Cl(-) secretion by AMPK in vivo." *Pflugers Arch* **457**(5): 1071-1078.
- Krause, U., Bertrand, L. and Hue, L. (2002). "Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes." *Eur J Biochem* **269**(15): 3751-3759.
- Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S. and Lopaschuk, G. D. (1995). "High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase." *J Biol Chem* **270**(29): 17513-17520.
- Kurth-Kraczek, E. J., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. and Winder, W. W. (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." *Diabetes* **48**(8): 1667-1671.
- Lai, Y. C., Kviklyte, S., Vertommen, D., Lantier, L., Foretz, M., Viollet, B., Hallen, S. and Rider, M. H. (2014). "A small-molecule benzimidazole derivative that potently activates AMPK to increase glucose transport in skeletal muscle: comparison with effects of contraction and other AMPK activators." *Biochem J* **460**(3): 363-375.
- Langendorf, C. G., Ngoei, K. R. W., Scott, J. W., Ling, N. X. Y., Issa, S. M. A., Gorman, M. A., Parker, M. W., Sakamoto, K., Oakhill, J. S. and Kemp, B. E. (2016). "Structural basis of allosteric and synergistic activation of AMPK by furan-2-phosphonic derivative C2 binding." *Nat Commun* **7**: 10912.
- Le Drean, G., Haure-Mirande, V., Ferrier, L., Bonnet, C., Hulin, P., de Coppet, P. and Segain, J. P. (2014). "Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway." *FASEB J* **28**(3): 1059-1070.

- Le Drean, G. and Segain, J. P. (2014). "Connecting metabolism to intestinal barrier function: The role of leptin." *Tissue Barriers* **2**(4): e970940.
- Lee, J. H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S. Y., Karess, R. E., Lee, S. H., Shong, M., Kim, J. M., Kim, J. and Chung, J. (2007). "Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase." *Nature* **447**(7147): 1017-1020.
- Lee, M., Katerelos, M., Gleich, K., Galic, S., Kemp, B. E., Mount, P. F. and Power, D. A. (2018). "Phosphorylation of Acetyl-CoA Carboxylase by AMPK Reduces Renal Fibrosis and Is Essential for the Anti-Fibrotic Effect of Metformin." *J Am Soc Nephrol* **29**(9): 2326-2336.
- Li, M., Wu, Y., Hu, Y., Zhao, L. and Zhang, C. (2018). "Initial gut microbiota structure affects sensitivity to DSS-induced colitis in a mouse model." *Sci China Life Sci* **61**(7): 762-769.
- Li, M., Zhang, C. S., Zong, Y., Feng, J. W., Ma, T., Hu, M., Lin, Z., Li, X., Xie, C., Wu, Y., Jiang, D., Li, Y., Zhang, C., Tian, X., Wang, W., Yang, Y., Chen, J., Cui, J., Wu, Y. Q., Chen, X., Liu, Q. F., Wu, J., Lin, S. Y., Ye, Z., Liu, Y., Piao, H. L., Yu, L., Zhou, Z., Xie, X. S., Hardie, D. G. and Lin, S. C. (2019). "Transient Receptor Potential V Channels Are Essential for Glucose Sensing by Aldolase and AMPK." *Cell Metab* **30**(3): 508-524 e512.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A. and Zang, M. (2011). "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." *Cell Metab* **13**(4): 376-388.
- Liang, J., Xu, Z. X., Ding, Z., Lu, Y., Yu, Q., Werle, K. D., Zhou, G., Park, Y. Y., Peng, G., Gambello, M. J. and Mills, G. B. (2015). "Myristoylation confers noncanonical AMPK functions in autophagy selectivity and mitochondrial surveillance." *Nat Commun* **6**: 7926.
- Lin, S. C. and Hardie, D. G. (2018). "AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status." *Cell Metab* **27**(2): 299-313.
- Loh, K., Tam, S., Murray-Segal, L., Huynh, K., Meikle, P. J., Scott, J. W., van Denderen, B., Chen, Z., Steel, R., LeBlond, N. D., Burkovsky, L. A., O'Dwyer, C., Nunes, J. R. C., Steinberg, G. R., Fullerton, M. D., Galic, S. and Kemp, B. E. (2019). "Inhibition of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Signaling Leads to Hypercholesterolemia and Promotes Hepatic Steatosis and Insulin Resistance." *Hepato Commun* **3**(1): 84-98.
- Luiken, J. J., Coort, S. L., Willems, J., Coumans, W. A., Bonen, A., van der Vusse, G. J. and Glatz, J. F. (2003). "Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling." *Diabetes* **52**(7): 1627-1634.
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. and Mahajan, A. (2013). "Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium." *Mucosal Immunol* **6**(4): 666-677.
- Mankertz, J. and Schulzke, J. D. (2007). "Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications." *Curr Opin Gastroenterol* **23**(4): 379-383.
- Margalha, L., Valerio, C. and Baena-Gonzalez, E. (2016). "Plant SnRK1 Kinases: Structure, Regulation, and Function." *Exp Suppl* **107**: 403-438.
- Marieb, E. N. (1999). *Anatomie et Physiologie Humaine*.
- Marin, T. L., Gongol, B., Martin, M., King, S. J., Smith, L., Johnson, D. A., Subramaniam, S., Chien, S. and Shyy, J. Y. (2015). "Identification of AMP-activated protein kinase targets by a consensus sequence search of the proteome." *BMC Syst Biol* **9**: 13.
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D. and Hue, L. (2000). "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." *Curr Biol* **10**(20): 1247-1255.
- Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L. and Hue, L. (2002). "The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase." *J Biol Chem* **277**(34): 30778-30783.
- Maury, J., Nicoletti, C., Guzzo-Chambraud, L. and Maroux, S. (1995). "The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization." *Eur J Biochem* **228**(2): 323-331.
- May, G. R., Sutherland, L. R. and Meddings, J. B. (1993). "Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease?" *Gastroenterology* **104**(6): 1627-1632.
- Medema, J. P. and Vermeulen, L. (2011). "Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer." *Nature* **474**(7351): 318-326.
- Megat, S. and Price, T. J. (2018). "Therapeutic opportunities for pain medicines via targeting of specific translation signaling mechanisms." *Neurobiol Pain* **4**: 8-19.
- Meng, W. and Takeichi, M. (2009). "Adherens junction: molecular architecture and regulation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(6): a002899.

- Mesquita, I., Moreira, D., Sampaio-Marques, B., Laforge, M., Cordeiro-da-Silva, A., Ludovico, P., Estaquier, J. and Silvestre, R. (2016). "AMPK in Pathogens." *Exp Suppl* **107**: 287-323.
- Miao, W., Wu, X., Wang, K., Wang, W., Wang, Y., Li, Z., Liu, J., Li, L. and Peng, L. (2016). "Sodium Butyrate Promotes Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Monolayers Involving Inhibition of MLCK/MLC2 Pathway and Phosphorylation of PKC β 2." *Int J Mol Sci* **17**(10).
- Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B. B. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nature* **415**(6869): 339-343.
- Miranda, L., Carpentier, S., Platek, A., Hussain, N., Gueuning, M. A., Vertommen, D., Ozkan, Y., Sid, B., Hue, L., Courtoy, P. J., Rider, M. H. and Horman, S. (2010). "AMP-activated protein kinase induces actin cytoskeleton reorganization in epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **396**(3): 656-661.
- Miyamoto, T., Rho, E., Sample, V., Akano, H., Magari, M., Ueno, T., Gorshkov, K., Chen, M., Tokumitsu, H., Zhang, J. and Inoue, T. (2015). "Compartmentalized AMPK signaling illuminated by genetically encoded molecular sensors and actuators." *Cell Rep* **11**(4): 657-670.
- Mukherjee, S., Zheng, H., Derebe, M. G., Callenberg, K. M., Partch, C. L., Rollins, D., Prohete, D. C., Rizo, J., Grabe, M., Jiang, Q. X. and Hooper, L. V. (2014). "Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin." *Nature* **505**(7481): 103-107.
- Myers, R. W., Guan, H. P., Ehrhart, J., Petrov, A., Prahallada, S., Tozzo, E., Yang, X., Kurtz, M. M., Trujillo, M., Gonzalez Trotter, D., Feng, D., Xu, S., Eiermann, G., Holahan, M. A., Rubins, D., Conarello, S., Niu, X., Souza, S. C., Miller, C., Liu, J., Lu, K., Feng, W., Li, Y., Painter, R. E., Milligan, J. A., He, H., Liu, F., Ogawa, A., Wisniewski, D., Rohm, R. J., Wang, L., Bunzel, M., Qian, Y., Zhu, W., Wang, H., Bennet, B., LaFranco Scheuch, L., Fernandez, G. E., Li, C., Klimas, M., Zhou, G., van Heek, M., Biftu, T., Weber, A., Kelley, D. E., Thornberry, N., Erion, M. D., Kemp, D. M. and Sebat, I. K. (2017). "Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy." *Science* **357**(6350): 507-511.
- Neumann, D. (2018). "Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK?" *Int J Mol Sci* **19**(8).
- Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M. and Holstein-Rathlou, N. H. (2012). "Gap junctions." *Compr Physiol* **2**(3): 1981-2035.
- O'Neil, D. A., Porter, E. M., Elewaut, D., Anderson, G. M., Eckmann, L., Ganz, T. and Kagnoff, M. F. (1999). "Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium." *J Immunol* **163**(12): 6718-6724.
- Oakhill, J. S., Chen, Z. P., Scott, J. W., Steel, R., Castelli, L. A., Ling, N., Macaulay, S. L. and Kemp, B. E. (2010). "beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(45): 19237-19241.
- Obba, S., Hizir, Z., Boyer, L., Selimoglu-Buet, D., Pfeifer, A., Michel, G., Hamouda, M. A., Goncalves, D., Cerezo, M., Marchetti, S., Rocchi, S., Droin, N., Cluzeau, T., Robert, G., Luciano, F., Robaye, B., Foretz, M., Viollet, B., Legros, L., Solary, E., Auberger, P. and Jacquelin, A. (2015). "The PRKAA1/AMPK α 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML." *Autophagy* **11**(7): 1114-1129.
- Obenaus, J. C., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003). "Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3635-3641.
- Ohno, M., Nishida, A., Sugitani, Y., Nishino, K., Inatomi, O., Sugimoto, M., Kawahara, M. and Andoh, A. (2017). "Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells." *PLoS One* **12**(10): e0185999.
- Olivier, S., Foretz, M. and Viollet, B. (2018). "Promise and challenges for direct small molecule AMPK activators." *Biochem Pharmacol* **153**: 147-158.
- Olivier, S., Leclerc, J., Grenier, A., Foretz, M., Tamburini, J. and Viollet, B. (2019). "AMPK Activation Promotes Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells." *International Journal of Molecular Sciences*.
- Owen, M. R., Doran, E. and Halestrap, A. P. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." *Biochem J* **348 Pt 3**: 607-614.
- Park, H. Y., Kunitake, Y., Hirasaki, N., Tanaka, M. and Matsui, T. (2015). "Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1." *Biosci Biotechnol Biochem* **79**(1): 130-137.
- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R. and Lin, J. (2009). "Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers." *J Nutr* **139**(9): 1619-1625.
- Peterson, L. W. and Artis, D. (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." *Nat Rev Immunol* **14**(3): 141-153.

- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Jennings, I. G., Campbell, D. J., Witters, L. A., Parker, M. W., Kemp, B. E. and Stapleton, D. (2003). "AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen." *Curr Biol* **13**(10): 867-871.
- Pollard, A. E., Martins, L., Muckett, P. J., Khadayate, S., Bornot, A., Clausen, M., Admyre, T., Bjursell, M., Fiadeiro, R., Wilson, L., Whilding, C., Kotiadis, V. N., Duchen, M. R., Sutton, D., Penfold, L., Sardini, A., Bohlooly, Y. M., Smith, D. M., Read, J. A., Snowden, M. A., Woods, A. and Carling, D. (2019). "AMPK activation protects against diet induced obesity through Ucp1-independent thermogenesis in subcutaneous white adipose tissue." *Nat Metab* **1**(3): 340-349.
- Potten, C. S. (1977). "Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation." *Nature* **269**(5628): 518-521.
- Potten, C. S., Owen, G. and Booth, D. (2002). "Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands." *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2381-2388.
- Rocco, A., Compare, D., Angrisani, D., Sanduzzi Zamparelli, M. and Nardone, G. (2014). "Alcoholic disease: liver and beyond." *World J Gastroenterol* **20**(40): 14652-14659.
- Rogers, A. C., Huetter, L., Hoekstra, N., Collins, D., Collaco, A., Baird, A. W., Winter, D. C., Ameen, N., Geibel, J. P. and Kopic, S. (2013). "Activation of AMPK inhibits cholera toxin stimulated chloride secretion in human and murine intestine." *PLoS One* **8**(7): e69050.
- Ross, F. A., MacKintosh, C. and Hardie, D. G. (2016). "AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours." *FEBS J* **283**(16): 2987-3001.
- Rowan, F., Docherty, N. G., Murphy, M., Murphy, B., Calvin Coffey, J. and O'Connell, P. R. (2010). "Desulfovibrio bacterial species are increased in ulcerative colitis." *Dis Colon Rectum* **53**(11): 1530-1536.
- Rowart, P., Wu, J., Caplan, M. J. and Jouret, F. (2018). "Implications of AMPK in the Formation of Epithelial Tight Junctions." *Int J Mol Sci* **19**(7).
- Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M. and Cacicedo, J. M. (2013). "AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome." *J Clin Invest* **123**(7): 2764-2772.
- Ruiz, M. (2006). "https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Digestive_system_diagram_fr.svg."
- Russell, R. R., 3rd, Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F. J., Mu, J., Birnbaum, M. J. and Young, L. H. (2004). "AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury." *J Clin Invest* **114**(4): 495-503.
- Sag, D., Carling, D., Stout, R. D. and Suttles, J. (2008). "Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype." *J Immunol* **181**(12): 8633-8641.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000). "Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4131-4142.
- Sakar, Y., Nazaret, C., Letteron, P., Ait Omar, A., Avenati, M., Viollet, B., Ducroc, R. and Bado, A. (2009). "Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5 transporters links to hepatic metabolic functions in rodents." *PLoS One* **4**(11): e7935.
- Salatto, C. T., Miller, R. A., Cameron, K. O., Cokorinos, E., Reyes, A., Ward, J., Calabrese, M. F., Kurumbail, R. G., Rajamohan, F., Kalgutkar, A. S., Tess, D. A., Shavnya, A., Genung, N. E., Edmonds, D. J., Jatkar, A., Maciejewski, B. S., Amaro, M., Gandhok, H., Monetti, M., Cialdea, K., Bollinger, E., Kreeger, J. M., Coskran, T. M., Opsahl, A. C., Boucher, G. G., Birnbaum, M. J., DaSilva-Jardine, P. and Rolph, T. (2017). "Selective Activation of AMPK beta1-Containing Isoforms Improves Kidney Function in a Rat Model of Diabetic Nephropathy." *J Pharmacol Exp Ther* **361**(2): 303-311.
- Salt, I., Celler, J. W., Hawley, S. A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D. and Hardie, D. G. (1998). "AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform." *Biochem J* **334** (Pt 1): 177-187.
- Salt, I. P. and Palmer, T. M. (2012). "Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation." *Expert Opin Investig Drugs* **21**(8): 1155-1167.
- Salvi, A. M. and DeMali, K. A. (2018). "Mechanisms linking mechanotransduction and cell metabolism." *Curr Opin Cell Biol* **54**: 114-120.
- Samovski, D., Su, X., Xu, Y., Abumrad, N. A. and Stahl, P. D. (2012). "Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase." *J Lipid Res* **53**(4): 709-717.
- Sanders, M. J., Ali, Z. S., Hegarty, B. D., Heath, R., Snowden, M. A. and Carling, D. (2007). "Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family." *J Biol Chem* **282**(45): 32539-32548.

- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M. and Clevers, H. (2011). "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts." *Nature* **469**(7330): 415-418.
- Schaffer, B. E., Levin, R. S., Hertz, N. T., Maures, T. J., Schoof, M. L., Hollstein, P. E., Benayoun, B. A., Banko, M. R., Shaw, R. J., Shokat, K. M. and Brunet, A. (2015). "Identification of AMPK Phosphorylation Sites Reveals a Network of Proteins Involved in Cell Invasion and Facilitates Large-Scale Substrate Prediction." *Cell Metab* **22**(5): 907-921.
- Schmidt, A., Utepbergenov, D. I., Mueller, S. L., Beyermann, M., Schneider-Mergener, J., Krause, G. and Blasig, I. E. (2004). "Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation." *Cell Mol Life Sci* **61**(11): 1354-1365.
- Scholz, R., Sidler, C. L., Thali, R. F., Winssinger, N., Cheung, P. C. and Neumann, D. (2010). "Autoactivation of transforming growth factor beta-activated kinase 1 is a sequential bimolecular process." *J Biol Chem* **285**(33): 25753-25766.
- Scott, J. W., Galic, S., Graham, K. L., Foitzik, R., Ling, N. X., Dite, T. A., Issa, S. M., Langendorf, C. G., Weng, Q. P., Thomas, H. E., Kay, T. W., Birnberg, N. C., Steinberg, G. R., Kemp, B. E. and Oakhill, J. S. (2015). "Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase at the Allosteric Drug-Binding Site Promotes Islet Insulin Release." *Chem Biol* **22**(6): 705-711.
- Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A., Norman, D. G. and Hardie, D. G. (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." *J Clin Invest* **113**(2): 274-284.
- Scott, J. W., Ling, N., Issa, S. M., Dite, T. A., O'Brien, M. T., Chen, Z. P., Galic, S., Langendorf, C. G., Steinberg, G. R., Kemp, B. E. and Oakhill, J. S. (2014). "Small molecule drug A-769662 and AMP synergistically activate naive AMPK independent of upstream kinase signaling." *Chem Biol* **21**(5): 619-627.
- Scott, J. W., Norman, D. G., Hawley, S. A., Kontogiannis, L. and Hardie, D. G. (2002). "Protein kinase substrate recognition studied using the recombinant catalytic domain of AMP-activated protein kinase and a model substrate." *J Mol Biol* **317**(2): 309-323.
- Scott, J. W., van Denderen, B. J., Jorgensen, S. B., Honeyman, J. E., Steinberg, G. R., Oakhill, J. S., Iseli, T. J., Koay, A., Gooley, P. R., Stapleton, D. and Kemp, B. E. (2008). "Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes." *Chem Biol* **15**(11): 1220-1230.
- Shu, Y., Sheardown, S. A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., Ianculescu, A. G., Yue, L., Lo, J. C., Burchard, E. G., Brett, C. M. and Giacomini, K. M. (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." *J Clin Invest* **117**(5): 1422-1431.
- Silveira, A. L. M., Ferreira, A. V. M., de Oliveira, M. C., Rachid, M. A., da Cunha Sousa, L. F., Dos Santos Martins, F., Gomes-Santos, A. C., Vieira, A. T. and Teixeira, M. M. (2017). "Preventive rather than therapeutic treatment with high fiber diet attenuates clinical and inflammatory markers of acute and chronic DSS-induced colitis in mice." *Eur J Nutr* **56**(1): 179-191.
- Skinn, A. C., Vergnolle, N., Zamuner, S. R., Wallace, J. L., Cellars, L., MacNaughton, W. K. and Sherman, P. M. (2006). "Citrobacter rodentium infection causes iNOS-independent intestinal epithelial dysfunction in mice." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(12): 1301-1312.
- Spalinger, M. R., Schmidt, T. S., Schwarzfischer, M., Hering, L., Atrott, K., Lang, S., Gottier, C., Geirnaert, A., Lacroix, C., Dai, X., Rawlings, D. J., Chan, A. C., von Mering, C., Rogler, G. and Scharl, M. (2019). "Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 modulates colitis in a microbiota-dependent manner." *J Clin Invest* **129**(6): 2527-2541.
- Steinberg, G. R. and Carling, D. (2019). "AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development." *Nat Rev Drug Discov* **18**(7): 527-551.
- Steneberg, P., Lindahl, E., Dahl, U., Lidh, E., Straseviciene, J., Backlund, F., Kjellkvist, E., Berggren, E., Lundberg, I., Bergqvist, I., Ericsson, M., Eriksson, B., Linde, K., Westman, J., Edlund, T. and Edlund, H. (2018). "PAN-AMPK activator O304 improves glucose homeostasis and microvascular perfusion in mice and type 2 diabetes patients." *JCI Insight* **3**(12).
- Stephene, X., Foretz, M., Taleux, N., van der Zon, G. C., Sokal, E., Hue, L., Viollet, B. and Guigas, B. (2011). "Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status." *Diabetologia* **54**(12): 3101-3110.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. and Goodenough, D. A. (1986). "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia." *J Cell Biol* **103**(3): 755-766.
- Sun, X., Yang, Q., Rogers, C. J., Du, M. and Zhu, M. J. (2017). "AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression." *Cell Death Differ* **24**(5): 819-831.

- Sun, X. and Zhu, M. J. (2017). "AMP-activated protein kinase: a therapeutic target in intestinal diseases." *Open Biol* **7**(8).
- Suzuki, T. (2013). "Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions." *Cell Mol Life Sci* **70**(4): 631-659.
- Suzuki, T., Bridges, D., Nakada, D., Skiniotis, G., Morrison, S. J., Lin, J. D., Saltiel, A. R. and Inoki, K. (2013). "Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3." *Mol Cell* **50**(3): 407-419.
- Suzuki, T., Elias, B. C., Seth, A., Shen, L., Turner, J. R., Giorgianni, F., Desiderio, D., Guntaka, R. and Rao, R. (2009). "PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1): 61-66.
- Takata, F., Dohgu, S., Matsumoto, J., Machida, T., Kaneshima, S., Matsuo, M., Sakaguchi, S., Takeshige, Y., Yamauchi, A. and Kataoka, Y. (2013). "Metformin induces up-regulation of blood-brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **433**(4): 586-590.
- Tamura, A., Kitano, Y., Hata, M., Katsuno, T., Moriwaki, K., Sasaki, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Furuse, M., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2008). "Megaintestine in claudin-15-deficient mice." *Gastroenterology* **134**(2): 523-534.
- Taylor, E. B., An, D., Kramer, H. F., Yu, H., Fujii, N. L., Roeckl, K. S., Bowles, N., Hirshman, M. F., Xie, J., Feener, E. P. and Goodyear, L. J. (2008). "Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle." *J Biol Chem* **283**(15): 9787-9796.
- Teixeira, T. F., Souza, N. C., Chiarello, P. G., Franceschini, S. C., Bressan, J., Ferreira, C. L. and Peluzio Mdo, C. (2012). "Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors." *Clin Nutr* **31**(5): 735-740.
- Timmermans, A. D., Balteau, M., Gelinias, R., Renguet, E., Ginion, A., de Meester, C., Sakamoto, K., Balligand, J. L., Bontemps, F., Vanoverschelde, J. L., Horman, S., Beauloye, C. and Bertrand, L. (2014). "A-769662 potentiates the effect of other AMP-activated protein kinase activators on cardiac glucose uptake." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**(12): H1619-1630.
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S., Moonen-Kornips, E., Hesselink, M. K. C., Kunz, I., Schrauwen-Hinderling, V. B., Blaak, E., Auwerx, J. and Schrauwen, P. (2011). "Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans." *Cell Metab* **14**(5): 612-622.
- Ting, H. A. and von Moltke, J. (2019). "The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond." *J Immunol* **202**(5): 1321-1329.
- Tong, X., Xu, J., Lian, F., Yu, X., Zhao, Y., Xu, L., Zhang, M., Zhao, X., Shen, J., Wu, S., Pang, X., Tian, J., Zhang, C., Zhou, Q., Wang, L., Pang, B., Chen, F., Peng, Z., Wang, J., Zhen, Z., Fang, C., Li, M., Chen, L. and Zhao, L. (2018). "Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula: a Multicenter, Randomized, Open Label Clinical Trial." *MBio* **9**(3).
- Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Jr., Loson, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C. and Shaw, R. J. (2016). "Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress." *Science* **351**(6270): 275-281.
- Treebak, J. T., Birk, J. B., Hansen, B. F., Olsen, G. S. and Wojtaszewski, J. F. (2009). "A-769662 activates AMPK β 1-containing complexes but induces glucose uptake through a PI3-kinase-dependent pathway in mouse skeletal muscle." *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(4): C1041-1052.
- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F. and Westendorf, A. M. (2007). "Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity." *PLoS One* **2**(12): e1308.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006). "ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation." *Cell* **126**(4): 741-754.
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K. M., Ruhn, K. A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E. K. and Hooper, L. V. (2011). "The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine." *Science* **334**(6053): 255-258.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. and Clevers, H. (2005). "Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells." *Nature* **435**(7044): 959-963.

- Vara-Ciruelos, D., Dandapani, M., Russell, F. M., Grzes, K. M., Atrih, A., Foretz, M., Viollet, B., Lamont, D. J., Cantrell, D. A. and Hardie, D. G. (2019). "Phenformin, But Not Metformin, Delays Development of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma via Cell-Autonomous AMPK Activation." *Cell Rep* **27**(3): 690-698 e694.
- Vogt, J., Traynor, R. and Sapkota, G. P. (2011). "The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β s and BMP pathways." *Cell Signal* **23**(11): 1831-1842.
- Voss, M., Paterson, J., Kelsall, I. R., Martin-Granados, C., Hastie, C. J., Pegg, M. W. and Cohen, P. T. (2011). "Ppm1E is an in cellulo AMP-activated protein kinase phosphatase." *Cell Signal* **23**(1): 114-124.
- Walker, J., Jijon, H. B., Churchill, T., Kulka, M. and Madsen, K. L. (2003). "Activation of AMP-activated protein kinase reduces cAMP-mediated epithelial chloride secretion." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**(5): G850-860.
- Walker, J., Jijon, H. B., Diaz, H., Salehi, P., Churchill, T. and Madsen, K. L. (2005). "5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK." *Biochem J* **385**(Pt 2): 485-491.
- Wang, J., Tian, S., Yu, H., Wang, J. and Zhu, W. (2019). "Response of Colonic Mucosa-Associated Microbiota Composition, Mucosal Immune Homeostasis, and Barrier Function to Early Life Galactooligosaccharides Intervention in Suckling Piglets." *J Agric Food Chem* **67**(2): 578-588.
- Welcker, K., Martin, A., Kolle, P., Siebeck, M. and Gross, M. (2004). "Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease." *Eur J Med Res* **9**(10): 456-460.
- Winder, W. W. and Hardie, D. G. (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." *Am J Physiol* **277**(1): E1-10.
- Wodarz, A. and Nathke, I. (2007). "Cell polarity in development and cancer." *Nat Cell Biol* **9**(9): 1016-1024.
- Wojtaszewski, J. F., Birk, J. B., Frosig, C., Holten, M., Pilegaard, H. and Dela, F. (2005). "5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes." *J Physiol* **564**(Pt 2): 563-573.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. (2005). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab* **2**(1): 21-33.
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003). "LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade." *Curr Biol* **13**(22): 2004-2008.
- Woods, A., Williams, J. R., Muckett, P. J., Mayer, F. V., Liljevald, M., Bohlooly, Y. M. and Carling, D. (2017). "Liver-Specific Activation of AMPK Prevents Steatosis on a High-Fructose Diet." *Cell Rep* **18**(13): 3043-3051.
- Wu, J., Puppala, D., Feng, X., Monetti, M., Lapworth, A. L. and Geoghegan, K. F. (2013). "Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated protein kinase (AMPK)." *J Biol Chem* **288**(50): 35904-35912.
- Wu, W., Wang, S., Liu, Q., Shan, T. and Wang, Y. (2018). "Metformin Protects against LPS-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Activating AMPK Pathway." *Mol Pharm* **15**(8): 3272-3284.
- Xiao, B., Sanders, M. J., Carmena, D., Bright, N. J., Haire, L. F., Underwood, E., Patel, B. R., Heath, R. B., Walker, P. A., Hallen, S., Giordanetto, F., Martin, S. R., Carling, D. and Gamblin, S. J. (2013). "Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators." *Nat Commun* **4**: 3017.
- Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Haire, L. F., Saiu, P., Howell, S. A., Aasland, R., Martin, S. R., Carling, D. and Gamblin, S. J. (2011). "Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP." *Nature* **472**(7342): 230-233.
- Xie, M., Zhang, D., Dyck, J. R., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D. L., Taffet, G. E., Baldini, A., Khoury, D. S. and Schneider, M. D. (2006). "A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17378-17383.
- Xin, F. J., Wang, J., Zhao, R. Q., Wang, Z. X. and Wu, J. W. (2013). "Coordinated regulation of AMPK activity by multiple elements in the alpha-subunit." *Cell Res* **23**(10): 1237-1240.
- Xu, B., Li, Y. L., Xu, M., Yu, C. C., Lian, M. Q., Tang, Z. Y., Li, C. X. and Lin, Y. (2017). "Geniposide ameliorates TNBS-induced experimental colitis in rats via reducing inflammatory cytokine release and restoring impaired intestinal barrier function." *Acta Pharmacol Sin* **38**(5): 688-698.
- Xu, M., Duan, X. Y., Chen, Q. Y., Fan, H., Hong, Z. C., Deng, S. J., Nan, Z., Wu, H., Dong, Y. L., Liu, Y. J. and Zhou, C. Z. (2019). "Effect of compound sophorae decoction on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice by regulating Th17/Treg cell balance." *Biomed Pharmacother* **109**: 2396-2408.
- Xue, Y., Zhang, H., Sun, X. and Zhu, M. J. (2016). "Metformin Improves Ileal Epithelial Barrier Function in Interleukin-10 Deficient Mice." *PLoS One* **11**(12): e0168670.

- Yan, X. P., Wang, S., Yang, Y. and Qiu, Y. D. (2011). "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on rat livers after partial hepatectomy via LKB1-AMPK signaling pathway." *Transplant Proc* **43**(10): 3604-3612.
- Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J. and Zoghbi, H. Y. (2001). "Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine." *Science* **294**(5549): 2155-2158.
- Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H. and Sternson, S. M. (2011). "Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop." *Cell* **146**(6): 992-1003.
- Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M. and Tsukita, S. (2013). "The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK." *J Cell Biol* **203**(4): 605-614.
- Ylikorkala, A., Rossi, D. J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M. and Makela, T. P. (2001). "Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice." *Science* **293**(5533): 1323-1326.
- Zadra, G., Photopoulos, C., Tyekucheva, S., Heidari, P., Weng, Q. P., Fedele, G., Liu, H., Scaglia, N., Priolo, C., Sicinska, E., Mahmood, U., Signoretti, S., Birnberg, N. and Loda, M. (2014). "A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis." *EMBO Mol Med* **6**(4): 519-538.
- Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P. C., Ngan, B. Y., McKay, D. M., Soderholm, J. D., Perdue, M. H. and Sherman, P. M. (2006). "Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress." *Gut* **55**(11): 1553-1560.
- Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2007). "Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease." *Gut* **56**(1): 61-72.
- Zhang, C. S., Hawley, S. A., Zong, Y., Li, M., Wang, Z., Gray, A., Ma, T., Cui, J., Feng, J. W., Zhu, M., Wu, Y. Q., Li, T. Y., Ye, Z., Lin, S. Y., Yin, H., Piao, H. L., Hardie, D. G. and Lin, S. C. (2017). "Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK." *Nature* **548**(7665): 112-116.
- Zhang, C. S., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y. L., Wu, Y. Q., Li, T. Y., Liang, Y., Lu, Z., Lian, G., Liu, Q., Guo, H., Yin, Z., Ye, Z., Han, J., Wu, J. W., Yin, H., Lin, S. Y. and Lin, S. C. (2014). "The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism." *Cell Metab* **20**(3): 526-540.
- Zhang, L., Jouret, F., Rinehart, J., Sfakianos, J., Mellman, I., Lifton, R. P., Young, L. H. and Caplan, M. J. (2011). "AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) inhibition induce Ca²⁺-independent deposition of tight junction components at the plasma membrane." *J Biol Chem* **286**(19): 16879-16890.
- Zhang, L., Li, J., Young, L. H. and Caplan, M. J. (2006). "AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17272-17277.
- Zhang, Y. L., Guo, H., Zhang, C. S., Lin, S. Y., Yin, Z., Peng, Y., Luo, H., Shi, Y., Lian, G., Zhang, C., Li, M., Ye, Z., Ye, J., Han, J., Li, P., Wu, J. W. and Lin, S. C. (2013). "AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation." *Cell Metab* **18**(4): 546-555.
- Zheng, B. and Cantley, L. C. (2007). "Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 819-822.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. and Moller, D. E. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* **108**(8): 1167-1174.
- Zhou, K., Cheng, R., Liu, B., Wang, L., Xie, H. and Zhang, C. (2018). "Eupatilin ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice partly through promoting AMPK activation." *Phytomedicine* **46**: 46-56.
- Zhu, H., Foretz, M., Xie, Z., Zhang, M., Zhu, Z., Xing, J., Leclerc, J., Gaudry, M., Viollet, B. and Zou, M. H. (2014). "PRKAA1/AMPKalpha1 is required for autophagy-dependent mitochondrial clearance during erythrocyte maturation." *Autophagy* **10**(9): 1522-1534.
- Zibrova, D., Vandermoere, F., Goransson, O., Peggie, M., Marino, K. V., Knierim, A., Spengler, K., Weigert, C., Viollet, B., Morrice, N. A., Sakamoto, K. and Heller, R. (2017). "GFAT1 phosphorylation by AMPK promotes VEGF-induced angiogenesis." *Biochem J* **474**(6): 983-1001.
- Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J. and Shulman, G. I. (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15983-15987.
- Zong, Y., Zhang, C. S., Li, M., Wang, W., Wang, Z., Hawley, S. A., Ma, T., Feng, J. W., Tian, X., Qi, Q., Wu, Y. Q., Zhang, C., Ye, Z., Lin, S. Y., Piao, H. L., Hardie, D. G. and Lin, S. C. (2019). "Hierarchical activation of compartmentalized pools of AMPK depends on severity of nutrient or energy stress." *Cell Res* **29**(6): 460-473.