

Avancées sur le travail financé par l'Allocation SFD- Pierre Fabre Médicament 2016

"Contribution de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) au maintien de la barrière intestinale : impact sur la régulation de l'homéostasie glucidique"

Benoit Viollet, Institut Cochin INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris, France

L'avancement de ce projet de recherche a été récemment perturbé par la démission en septembre 2016 de l'étudiant en thèse qui était en charge de ce travail. Un étudiant en thèse a été recruté fin 2016 pour reprendre ce travail et poursuivre les objectifs fixés dans le projet de recherche. Les avancées principales réalisées au cours des derniers mois sont présentées.

Introduction/ Hypothèse de travail

Plusieurs études ont suggéré que des dysfonctions de la fonction barrière de l'intestin pourraient être à l'origine du développement de l'endotoxémie métabolique associée à l'ingestion des lipides alimentaires et à la mise en place d'une inflammation de faible intensité caractéristique de l'obésité et du diabète de type 2. Ainsi, un meilleur contrôle du transport transcellulaire par une amélioration de la fonctionnalité des protéines de jonction cellulaire représente une nouvelle stratégie pour éviter une translocation bactérienne incontrôlée et le développement d'inflammation chronique de bas grade. Notre hypothèse de travail repose sur la régulation par la sérine/ thréonine protéine kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) de la formation et la stabilisation des jonctions serrées au niveau de l'épithélium intestinal. Ce projet vise à évaluer les conséquences physiopathologiques d'une perte d'activation de l'AMPK ainsi qu'à évaluer l'impact thérapeutique de son activation au niveau intestinal sur le développement de l'obésité induit par un régime hyperlipidique. Pour la réalisation de ce projet nous avons généré et caractérisé des modèles murins et humains pour une analyse *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* du rôle physiopathologique de l'AMPK intestinale.

Objectif 1- Développement et caractérisation d'un modèle murin AMPK KO dans l'intestin

Afin de vérifier l'importance de l'AMPK dans le contrôle de la perméabilité intestinale, nous avons généré un modèle de souris invalidée pour les 2 sous-unités catalytiques de l'AMPK spécifiquement dans les cellules de l'intestin (IEC-AMPK^{-/-}) en croisant les souris AMPK α 1^{flox/flox} α 2^{flox/flox} avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de la villine. La figure 1 montre l'absence d'expression des protéines AMPK α 1 et AMPK α 2 dans les différents segments de l'intestin chez les souris contrôle et IEC-AMPK^{-/-}.



Fig 1: Expression des sous-unités catalytiques AMPK α 1 et α 2 dans le duodénum, jéjunum, iléon et côlon des souris WT et IEC-AMPK^{-/-}.

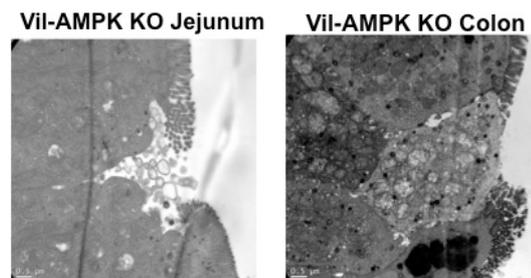


Fig 2: Ultrastructure du jéjunum et colon des souris IEC-AMPK^{-/-}

L'examen clinique des souris IEC-AMPK^{-/-} n'a révélé aucune différence avec les souris contrôle concernant le poids corporel, la composition corporelle, la prise alimentaire et la dépense énergétique (mesurée par calorimétrie indirecte). De plus, la perte d'AMPK intestinale n'a aucune incidence sur la longueur de l'intestin, le temps de transit, le nombre et le poids des fèces par rapport aux souris contrôle. Par contre, des observations réalisées en microscopie électronique ont montré des altérations morphologiques de certaines cellules épithéliales intestinales chez les souris IEC-AMPK^{-/-} (Fig 2).

Objectif 2- Analyse de l'impact du défaut d'AMPK sur la perméabilité intestinale

L'analyse de la perméabilité paracellulaire *ex vivo* dans différents segments de l'intestin a révélé une altération au niveau du jéjunum et du colon proximal chez les souris IEC-AMPK^{-/-} (Fig 3A). En

réponse à un régime gras, ces altérations sont exacerbées (Fig 3B) indiquant un rôle de l'AMPK dans le contrôle de la barrière intestinale, ce qui est en accord avec son implication dans la formation des jonctions serrées. L'analyse du phénotype métabolique et statut inflammatoire (mesure du LPS et des cytokines inflammatoires circulants) de ces animaux est en cours.

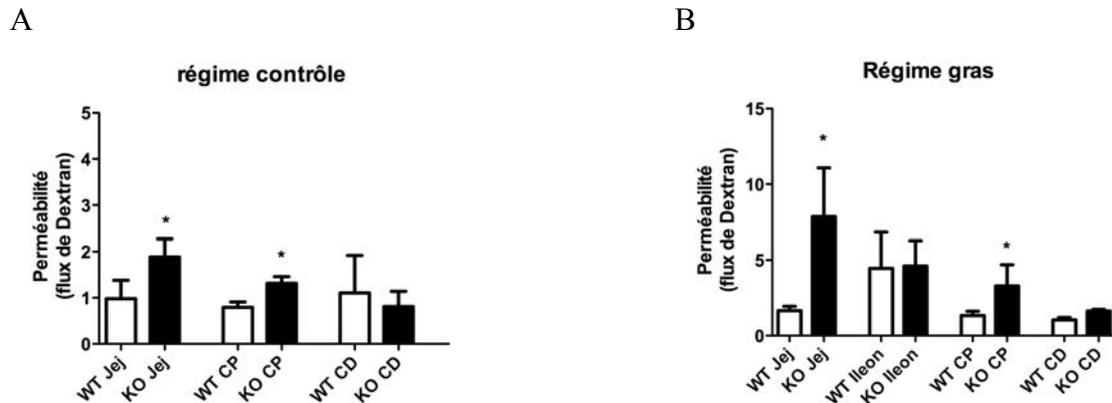


Fig 3: Mesure de perméabilité *ex vivo* dans jéjunum (Jej), colon proximal (CP) et colon distal (CD) en réponse à un régime contrôlé (A) et à un régime gras (B) chez les souris contrôles et IEC-AMPK^{-/-}.

Objectif 3- Génération et caractérisation de cellules Caco2 AMPK KO par CRISPR/Cas9

Afin de préciser le rôle de l'AMPK dans la fonction barrière de l'intestin, nous avons généré un modèle *in vitro* par invalidation des sous-unités catalytiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK dans le modèle des cellules Caco2 par la technologie CRISPR/Cas9. Les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK étant encodées par 2 gènes différents, nous avons délété successivement l'isoforme AMPK $\alpha 1$ puis AMPK $\alpha 2$ par expression de CRISPR AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ consécutivement. La figure 4 montre l'efficacité de notre stratégie avec l'obtention de clones dépourvus uniquement de AMPK $\alpha 1$ ou des 2 isoformes AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$. Ces cellules seront utilisées pour valider l'action d'activateurs pharmacologiques de l'AMPK (metformine, activateurs direct AMPK) ou de métabolites produits par le microbiote intestinal (acides gras à courte chaîne) pour moduler la stabilité des jonctions serrées.

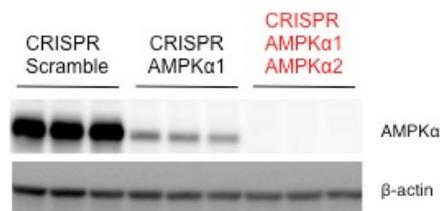


Fig 4: Caractérisation des cellules Caco2 délétées pour AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ par CRISPR/ Cas9. Analyse par Western blot de l'expression de AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$.

Publications:

Grenier A, Sujobert P, Olivier S, Guermouche H, Mondésir J, Kosmider O, Viollet B, Tamburini J. Knockdown of human AMPK using the CRISPR-Cas9 genome-editing system. **Methods Mol Biol.** 2017, in press.

Présentations orales lors de congrès:

- 9th International Symposium on AMPK, Xiamen, China Nov. 11-16, 2016).
- Benoit Viollet: "AMPK in the intestinal epithelium: insights from KO mouse models".

Présentations affichées lors de congrès:

- 9th International Symposium on AMPK, Xiamen, China Nov. 11-16, 2016).
- David Cohen: "Contribution of AMPK in the maintenance of interstitial epithelial barrier homeostasis".