

DISS. ETH NO. 23358

Role of the Vagus Nerve in the Regulation of Energy Homeostasis and Glycemia by Intestinal Glucagon-Like Peptide-1

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JEAN-PHILIPPE KRIEGER

Ingénieur diplômé de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
AgroParisTech (Paris, France)

born on 29.03.1987

citizen of France

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, examiner

Prof. Rémy Burcelin, co-examiner

Dr. Matthew Hayes, co-examiner

Dr. Shin Jae Lee, co-examiner

Prof. Dr. Thomas Lutz, co-examiner

2016

ABSTRACT

In a world where 600 million adults are obese, understanding this condition and the associated comorbidities has become urgent. Because obesity is due to an imbalance between energy intake and energy expenditure, our field of research aims at providing the fundamental knowledge of how the energy balance is normally regulated and how this regulation may fail in pathological states. In this context, the role of the so-called “gut-brain axis” in the control of food intake has received increasing attention. Indeed, the mechanical, metabolic or hormonal signals generated in the periphery are centrally integrated and translated into an appropriate eating behavior. In this gut-brain communication, the vagus nerve (VN) plays an essential role. It consists of a bidirectional neuronal route, conveying bottom-up information from the gastrointestinal tract about food quantity and composition, and exerting a top-down control on gastrointestinal motility and secretion.

One of the intestinal peptides interacting with the VN is the glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Originally identified as an incretin hormone, GLP-1 has been found to inhibit eating and gastric emptying. Based on these findings, GLP-1 receptor (GLP-1R) agonists have been developed and are promising pharmacological tools in the treatment of obesity and diabetes. In the present thesis, we dissect the molecular and functional interaction between endogenous intestinal GLP-1 and the VN in the control of food intake, energy expenditure and glycemia.

Initially, we reviewed the available literature (**CHAPTER 2**) testing the hypothesis that vagal afferent neurons (VAN) mediate the effects of intestinal GLP-1 on food intake and glycemia. This literature review revealed several important gaps and remaining questions to be addressed.

First, the previously-available evidence supporting a role for the vagus nerve in mediating the effects of intestinal GLP-1 on food intake and glycemia were based on methods that lesioned the VN. The results of lesion studies are difficult to interpret because the lesions affect both VAN and vagal efferent neurons (VEN) and may mask potential antagonist effects of different vagal fibers. Hence, the exact role of VAN GLP-1R in mediating the effects of endogenous intestinal GLP-1 was still unclear and required a new experimental approach. We set up a bilateral nodose ganglion (NG) injection technique to deliver a lentiviral vector and knock down GLP-1R in VAN via RNA interference. Using this approach, we showed that GLP-1R in VAN are necessary for the normal control of meal size, gastric emptying and post-meal glycemia (**CHAPTER 3**).

Second, we further investigated potential downstream mediators of the GLP-1 signal within VAN and their relevance for the control of food intake and gastric emptying. Multiple neuropeptides have been identified in the NG and some of them, including the Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) had already been implicated in the eating-inhibition induced by cholecystokinin (CCK). We screened several neuropeptides in the NG for their transcriptional response to GLP-1 in a primary VAN culture model and found that only CART expression was modulated. We further showed that GLP-1R activation induces VAN CART expression *in vivo*. Moreover, using two models of CART inhibition, we demonstrated that a full CART expression in VAN and CART release in the NTS are necessary for the full eating and gastric emptying inhibitory effects induced by intraperitoneal GLP-1 (**CHAPTER 4**). These results implicate for the first time CART as a neuropeptide transmitting the signal of GLP-1 to the brainstem. The function and neuronal targets of CART within the NTS remain to be further investigated.

Additionally, the idea that endogenous peripheral GLP-1 modulates energy expenditure was largely unexplored. We set up a protocol to investigate the effects of peripheral GLP-1R activation on energy expenditure in wild-type rats while controlling for food intake and gastric emptying, two potential confounding factors. We found that peripheral GLP-1R activation induced a transient decrease of whole-body energy expenditure, accompanied by a decrease in interscapular brown adipose tissue (iBAT) temperature. Moreover, upon high-fat diet exposure, reduced GLP-1R expression in VAN increased energy expenditure and BAT thermogenesis, and alleviated the development of HFD-induced obesity and glucose intolerance. Together with a retrograde tracing study from the iBAT and central gene expression analysis, this led us to propose a new vagally-mediated pathway by which endogenous peripheral GLP-1 tunes down iBAT activity after a meal (**CHAPTER 5**).

Considered together, these findings provide novel mechanistic and functional data about the gut-to-brain communication in the control of energy balance. Beyond the classic view that VAN are involved in the acute mediation of satiation signals, our findings indicate that vagal GLP-1R also play a role in the acute control of glycemia and the chronic control of energy expenditure. Our results also raised new questions about the exact role of vagally-expressed neuropeptides in the control of energy balance and their contribution to the development of obesity. Moreover, based on our findings, we developed the novel idea of a specific time window at the onset of diet-induced obesity, in which HFD-induced secretion of endogenous intestinal GLP-1 may amplify the development of an obese phenotype (**CHAPTER 6**).

Eventually, our findings and the questions that they raised may contribute to the fundamental knowledge needed for the further development of GLP-1-based or vagal-targeting therapies.

RESUME

Dans le monde, plus de 600 millions d'individus sont obèses; la compréhension des mécanismes de cette pathologie, ainsi que celle des maladies qui lui sont associées, est devenue urgente. Le développement de l'obésité est dû à un déséquilibre quantitatif et chronique entre l'énergie ingérée et l'énergie dépensée. Notre domaine de recherche s'efforce donc d'éclaircir les mécanismes de contrôle de la balance énergétique, et de comprendre comment un dérèglement de ces mécanismes aboutit à l'obésité. Dans ce contexte, le rôle que joue l'« axe intestin-cerveau » dans le contrôle de la prise alimentaire est devenu un thème de recherche incontournable. En effet, les signaux mécaniques, métaboliques ou hormonaux générés en périphérie sont intégrés au niveau du cerveau et aboutissent à la formation d'un comportement alimentaire approprié. Dans cette communication entre l'intestin et le cerveau, le nerf vague joue un rôle essentiel. Le nerf vague est une voie neuronale bidirectionnelle qui, d'une part, transmet de manière ascendante des informations du tube digestif concernant la quantité et la qualité des aliments ingérés et, d'autre part, exerce un contrôle descendant sur les propriétés contractiles et sécrétrices de l'estomac et l'intestin.

Le « glucagon-like peptide-1 » (GLP-1) est un des signaux peptidiques provenant de l'intestin et interagissant avec le nerf vague. GLP-1 fut identifié en premier lieu comme une hormone amplifiant la sécrétion d'insuline induite par l'élévation du glucose plasmatique. Plus tard, de nombreux autres effets métaboliques de cette hormone ont été découverts, notamment son rôle dans la réduction de l'appétit et la régulation de la vidange gastrique. En se basant sur ces effets endogènes, des agonistes du récepteur au GLP-1 ont été développés et sont désormais à la base de prometteurs traitements contre l'obésité et le diabète. Dans cette thèse, nous analysons en détail les interactions moléculaires et fonctionnelles entre le nerf vague et le GLP-1 intestinal dans le contrôle de l'homéostat énergétique et glucidique.

Nous débutons par une revue de la littérature scientifique (**CHAPITRE 2**) testant l'hypothèse selon laquelle les afférences vagales sont des intermédiaires indispensables aux effets du GLP-1 intestinal sur la prise alimentaire et la glycémie. Cette revue de la littérature a révélé d'importants manques dans notre compréhension des interactions GLP-1/nerf vague et souligne les questions en suspens auxquels nous nous sommes efforcés de répondre par une série d'approches expérimentales.

Tout d'abord, les études disponibles concernant ce sujet sont basées principalement sur des lésions du nerf vague. Les études basées sur des lésions sont difficiles à analyser de manière précise car les afférences comme les efférences vagales sont coupées et cela

masque la potentielle complexité des effets des différentes fibres vagues. Par conséquent, le rôle exact des récepteurs au GLP-1 présents sur les afférences vagues restait à éclaircir par le biais d'une nouvelle approche expérimentale. Pour cela, nous avons développé une technique d'injection bilatérale dans le ganglion pléxiforme afin d'y délivrer un vecteur viral et de réduire l'expression des récepteurs au GLP-1 par interférence ARN. Grâce à cette approche, nous avons pu montrer que les récepteurs au GLP-1 présents sur les afférences vagues sont en effet nécessaires au contrôle normal de la satiété, de la vidange gastrique, et de la glycémie post-prandiale (**CHAPITRE 3**).

Dans un second temps, nous souhaitons investiguer l'implication des différents neuropeptides exprimés par les fibres vagues dans le contrôle de la prise alimentaire et de la vidange gastrique par GLP-1. En effet, de nombreux neuropeptides ont été détectés dans le ganglion pléxiforme et certains d'entre eux, tels que le "Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript" (CART), ont déjà été impliqués dans l'effet satiétogène de la cholécystokinine. En revanche, l'implication de tels neuropeptides dans le signal vagal de GLP-1 était une thématique inexplorée. Nous avons étudié la réponse transcriptionnelle de plusieurs neuropeptides à l'application de GLP-1 dans une culture primaire d'afférences vagues et avons détecté que seule l'expression de CART était modulée. Nous avons par la suite vérifié que l'activation des récepteurs au GLP-1 induisait également l'expression de CART *in vivo*. De plus, en utilisant deux modèles distincts d'inhibition de CART, nous avons démontré que l'expression de CART par les afférences vagues ainsi que la sécrétion de CART dans le noyau du tractus solitaire (NTS) sont nécessaires aux effets sur la satiété et la vidange gastrique d'une injection intra-péritonéale de GLP-1 (**CHAPITRE 4**). Ces résultats impliquent pour la première fois CART en tant que transmetteur du signal vagal de GLP-1 vers le tronc cérébral. Les cibles neuronales ainsi que la fonction exacte de CART dans le NTS restent à investiguer.

De plus, l'idée que GLP-1 puisse moduler la dépense énergétique restait également peu étudiée. Nous avons initialement développé un protocole d'étude des effets de l'activation périphérique des récepteurs au GLP-1 sur la dépense énergétique de rats (phénotype sauvage) tout en contrôlant la prise alimentaire et la vidange gastrique, deux potentiels facteurs de confusion. Nous avons constaté que l'activation des récepteurs au GLP-1 périphérique conduisait à une diminution de la dépense énergétique, accompagnée d'une diminution de la température du tissu adipeux brun interscapulaire (iBAT). Nous avons par la suite montré qu'un knockdown du récepteur au GLP-1 dans les afférences vagues, pendant l'exposition à un régime riche en gras, engendrait une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité du iBAT. Ces changements étaient suffisants pour freiner le développement d'un phénotype obèse et l'apparition de l'intolérance au glucose. En

complément, un marquage rétrograde des neurones provenant du iBAT et l'analyse de l'expression centrale de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique nous permettent, au final, de proposer une nouvelle route neuronale par laquelle le GLP-1 intestinal réduit l'activité du iBAT après un repas (**CHAPITRE 5**).

Pris dans leur ensemble, nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur les aspects mécanistiques et fonctionnels de la communication intestin-cerveau. Au-delà de la vue classique selon laquelle les afférences vagales sont impliqués dans les signaux de satiété à court terme, nous montrons également qu'elles sont impliquées dans la régulation de la glycémie et dans le contrôle chronique de la dépense énergétique. Nos résultats posent également la question du rôle des neuropeptides dans les afférences vagales et de leur contribution au développement de l'obésité. De plus, nos résultats nous ont permis de formuler l'hypothèse selon laquelle le développement de l'obésité (par opposition à une obésité établie) consiste en une fenêtre spécifique durant laquelle une importante sécrétion de GLP-1 par l'intestin peut participer à l'aggravation du phénotype obèse (**CHAPITRE 6**).

Finalement, nos résultats et les questions nouvelles qu'ils ont soulevés ces expériences permettront d'apporter des connaissances fondamentales au développement de thérapies ciblant GLP-1 et le nerf vague.