

The Journal of Clinical Investigation

RESEARCH ARTICLE

Dysregulation of the NRG1/ERBB pathway causes a developmental disorder with gastrointestinal dysmotility in humans

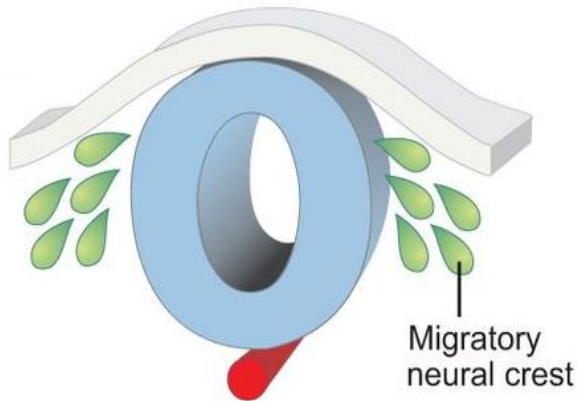
Thuy-Linh Le,¹ Louise Galmiche,^{2,3} Jonathan Levy,^{4,5} Pim Suwannarat,⁶ Debby M.E.I. Hellebrekers,⁷ Khomgrit Morarach,⁸ Franck Boismoreau,⁹ Tom E.J. Theunissen,¹⁰ Mathilde Lefebvre,¹¹ Anna Pelet,¹ Jelena Martinovic,¹² Antoinette Gelot,^{13,14} Fabien Guimiot,^{5,15} Amanda Calleroz,¹⁶ Cyril Gitiaux,¹⁷ Marie Hully,¹⁸ Olivier Goulet,¹⁹ Christophe Chardot,²⁰ Severine Drunat,^{4,5} Yline Capri,⁴ Christine Bole-Feyssot,²¹ Patrick Nitschké,²² Sandra Whalen,²³ Linda Mouthon,²⁴ Holly E. Babcock,²⁵ Robert Hofstra,²⁶ Irenaeus F.M. de Coo,²⁷ Anne-Claude Tabet,^{4,28} Thierry J. Molina,^{3,29} Boris Keren,²⁴ Alice Brooks,²⁶ Hubert J.M. Smeets,²⁷ Ulrika Marklund,⁸ Christopher T. Gordon,¹ Stanislas Lyonnet,^{1,30} Jeanne Amiel,^{1,30} and Nadège Bondurand¹

March, 2021

Nadège Bondurand

Institut Imagine, INSERM U1163, Embryologie et génétique des malformations

Origine du système nerveux entérique



From Simões-Costa, Dev, 2015

Dérivés de la crête neurale

Cartilage cranio-facial

Neurones sensoriels

Septum Cardiaque

Neurones Parasymp.

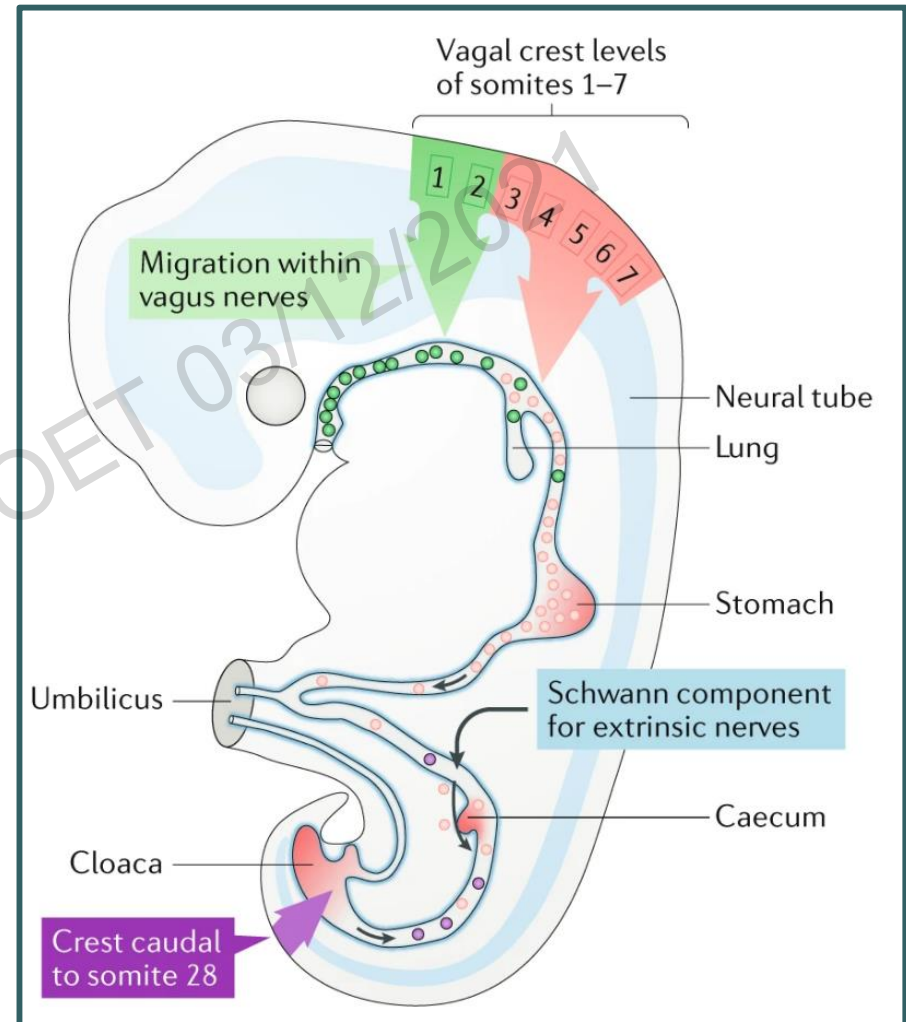
Cellules neuroendocrines

Neurones sympathiques

Cellules de Schwann

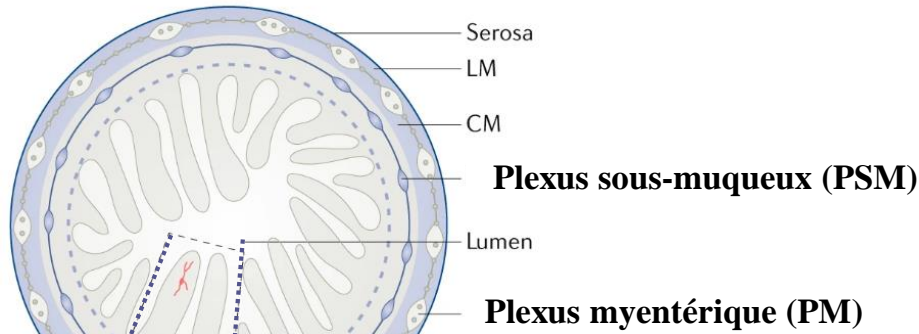
Mélanocytes

Neurones et cellules gliales entériques

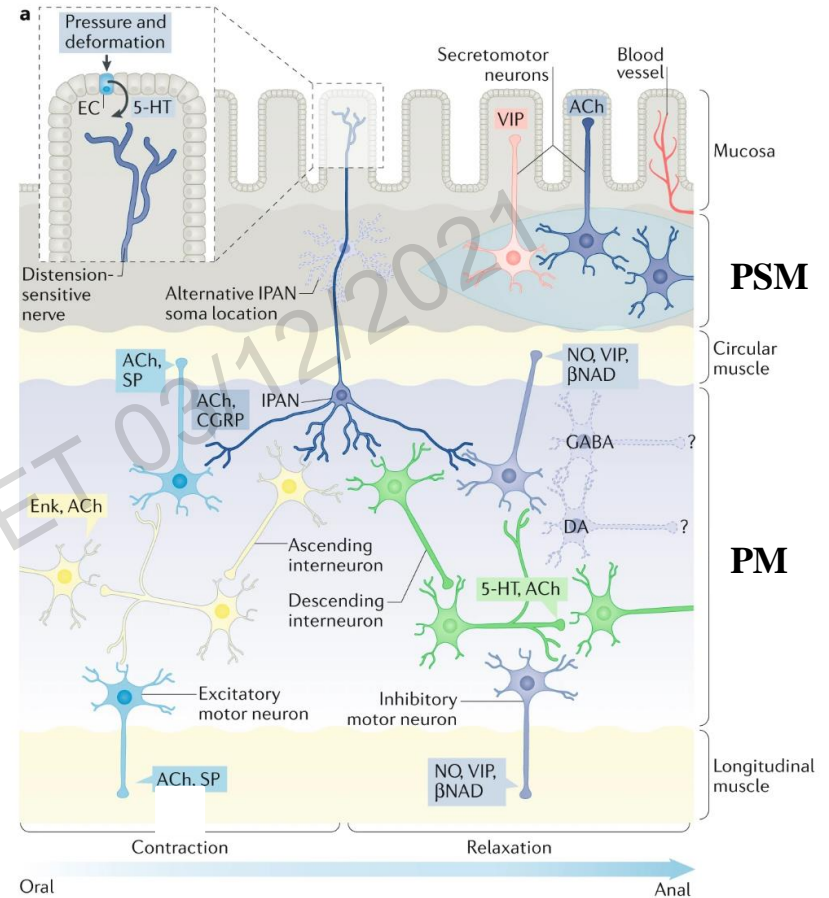
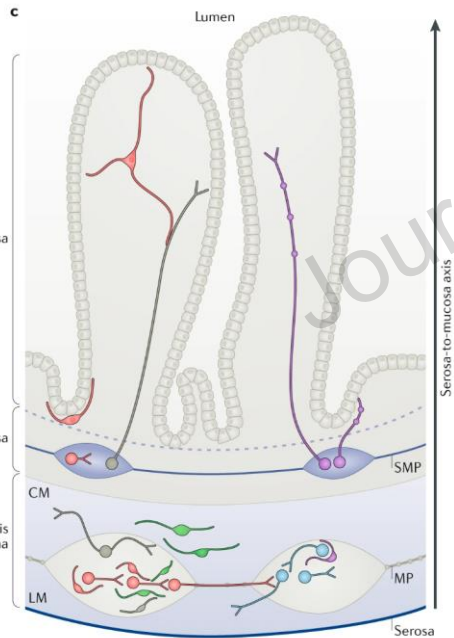


From Rao and Gershon, Nat Rev Neurosci, 2018

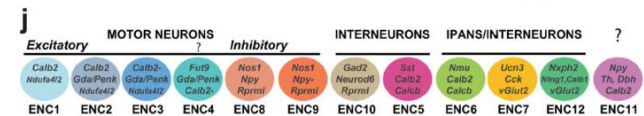
Le système nerveux entérique (SNE)



From Rao and Gershon, Nat Rev Neurosci, 2018



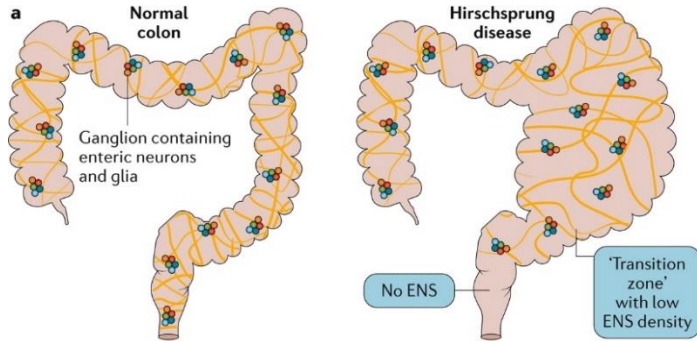
ScRNA-seq (Morarach, Nat Neurosci, 2021) :



> 20 types de neurones + 4 types de cellules gliales qui contrôlent l'activité péristaltique et les fonctions de la muqueuse intestinale

Anomalies développementales ou altérations fonctionnelles du SNE

✓ Maladie de Hirschsprung (HSCR) :



From Heuckeroth, Nat Rev Gastroenterol Hepathol, 2018

- 1/5000 naissances
- Occlusion intestinale– constipation sévère
- Aganglionose affectant la partie distale de l'intestin

Formes isolées

70 - 80%

Formes syndromiques

20 - 30%

Hérédité Oligogénique

- Un gène majeur – *RET*
- Modificateurs

Hérédité Monogénique

MWS: *ZEB2*

CCHS: *PHOX2B*

WS4 : *EDN3, EDNRB, SOX10*

✓ Hypoganglionose

✓ Pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) :

- Symptômes chroniques d'occlusion intestinale mais sans obstacle mécanique décelable
- Classification: myopathique ou neuropathique

Myopathique

Neuropathique

Gènes impliqués :

FLNA, RAD21, SGOL1,

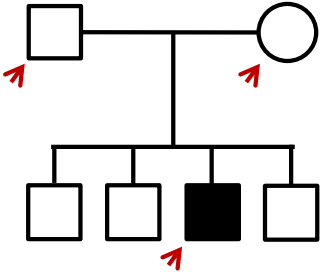
SOX10

ACTG2, MYH11

A la recherche d'un nouveau gène

Famille F1

HSCR + POIC



Patient : combinaison d'une neurocristopathie complexe (HSCR court, neuropathie périphérique axonale progressive, dysautonomie et hypopigmentation) + POIC, hypoplasie des bulbes olfactifs, agénésie des canaux auditifs externes et surdité

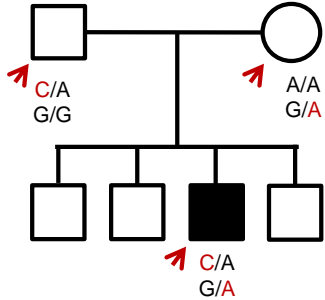
Le et al, J Clin Invest. 2021

Journées SOFFOET 03/12/2021

A la recherche d'un nouveau gène

Famille F1

c.2359A>C; p.(Thr787Pro)
c.2695G>A; p.(Val899Met)

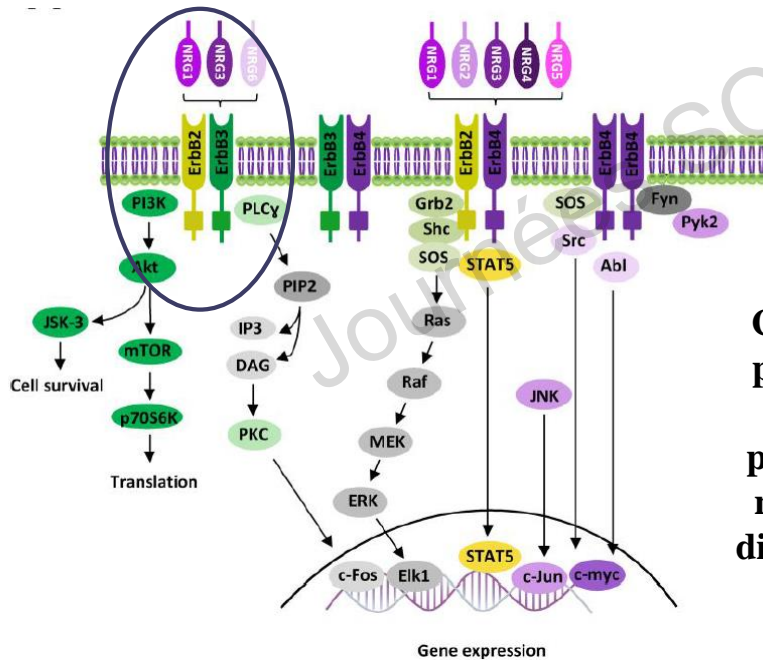


Patient : combinaison d'une neurocristopathie complexe (HSCR court, neuropathie périphérique axonale progressive, dysautonomie et hypopigmentation) + POIC, hypoplasie des bulbes olfactifs, agénésie des canaux auditifs externes et surdité

Exome en trio : identification de 2 variations faux-sens au sein du gène *ERBB3*, à l'état hétérozygote composite

Le et al, J Clin Invest. 2021

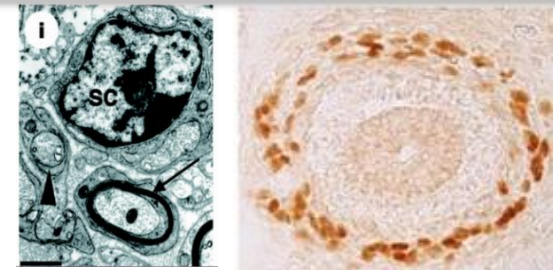
NRG/ERBB :



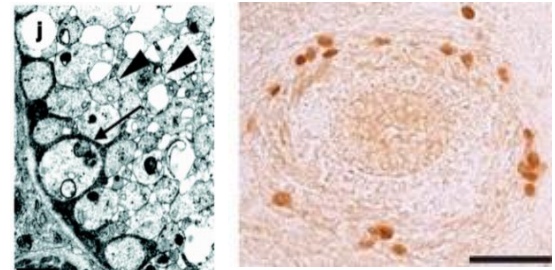
Contrôle des processus de survie, prolifération, migration et différenciation

From Ledonne, Int J. Mol. Sci., 2020

Contrôle



ErbB3 (c)KO



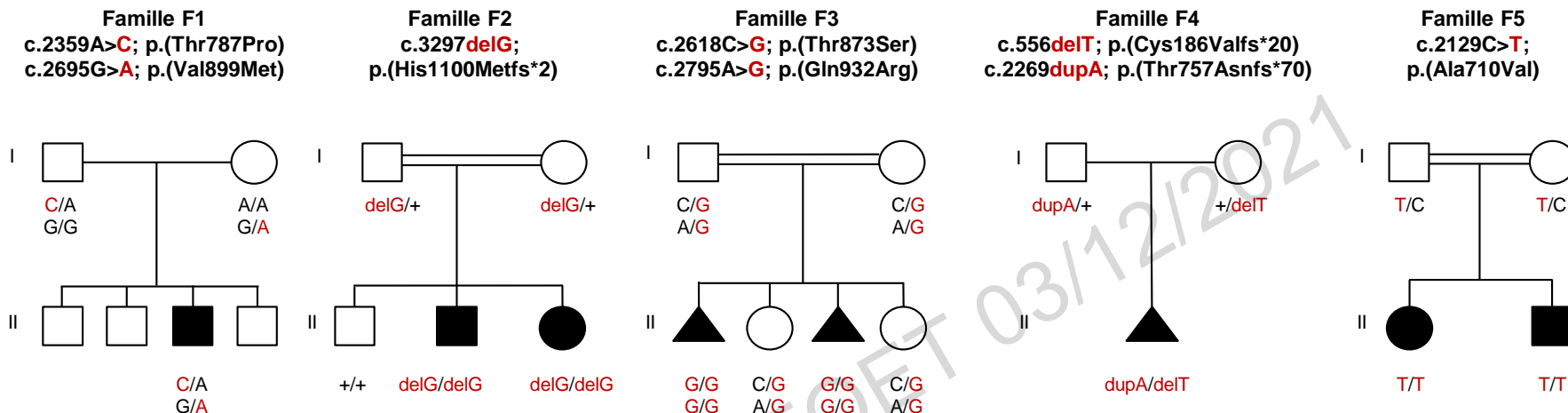
Riethmacher et al., Nature 1997; Epinosa-Medina et al., PNAS, 2017

Mort des précurseurs des cellules de Schwann + hypoganglionose (mais pas d'aganglionose)

Identification de variations de *ERBB3* et *ERBB2* dans 5 familles

ERBB3

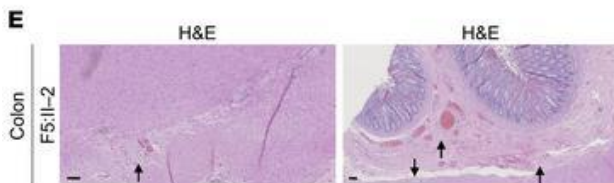
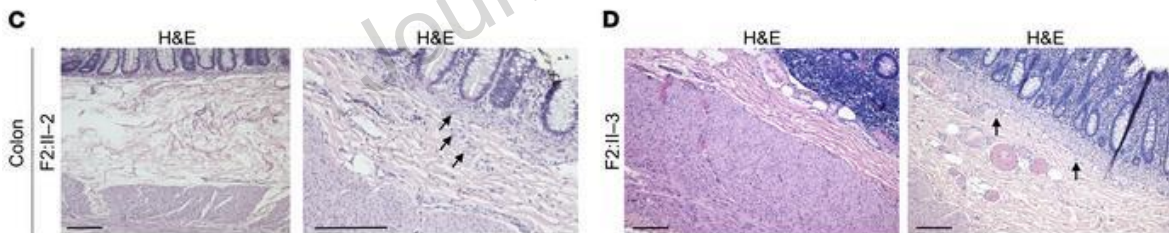
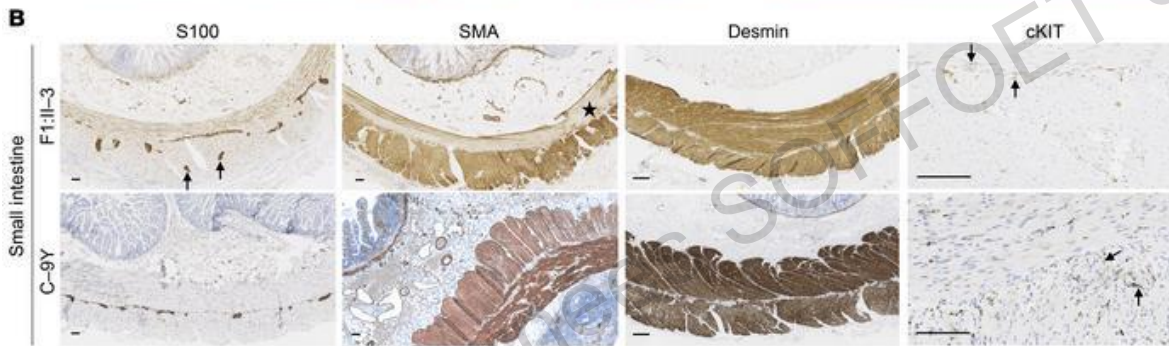
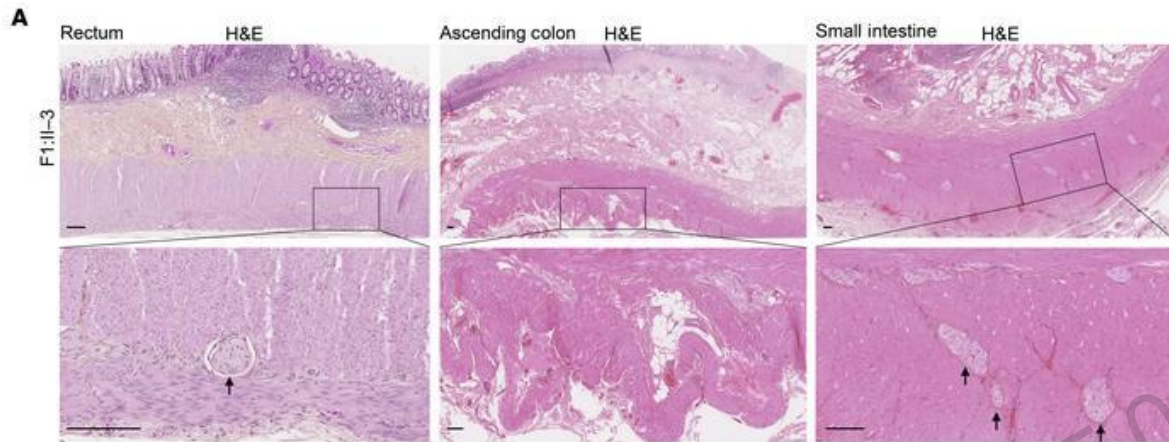
ERBB2



Syndrome complexe

Causal gene	<i>ERBB3</i> (NM_001982.3)						<i>ERBB2</i> (NM_004448.3)	
Affected individuals	F1:II-3	F2:II-2	F2:II-3	F3:II-1	F3:II-3	F4:II-1	F5:II-1	F5:II-2
HSCR	+	+	+	+	NA	+	NA	+
Hypoganglionosis	-	+	+	-	NA	-	NA	+
Intestinal smooth muscle abnormalities	+	-	-	-	NA	-	NA	NA
CIPO	+	-	-	NR	NR	NR	-	-
Arthrogyposis	-	-	-	+	+	+	+	+
Peripheral neuropathy	+	-	-	NR	NR	NR	+	+
Olfactory bulb agenesis	+	-	+	NA	NA	+	NA	NA
External auditory canal agenesis	+	+	+	+	+	+	-	-
Hearing loss	+	+	+	NR	NR	NR	+	+
Ptosis	-	+	+	NR	NR	NR	+	+
Dysautonomia	+	-	-	NR	NR	NR	-	-
Pigmentation defect	+	-	-	-	-	-	-	-
Cardiac defect	-	-	-	+	+	-	-	-

Altérations intestinales : analyse histologique



✓ **F1:II-3** : HSCR et POIC

- Absence de ganglion dans rectum
- Dans segment ganglionnaire:
Atrophie/désorganisation de la couche musculaire longitudinale
+ ganglions ectopiques

- Marquage S100 : confirme présence de ganglions ectopiques

+ Marquage anormal de SMA dans la couche musculaire circulaire

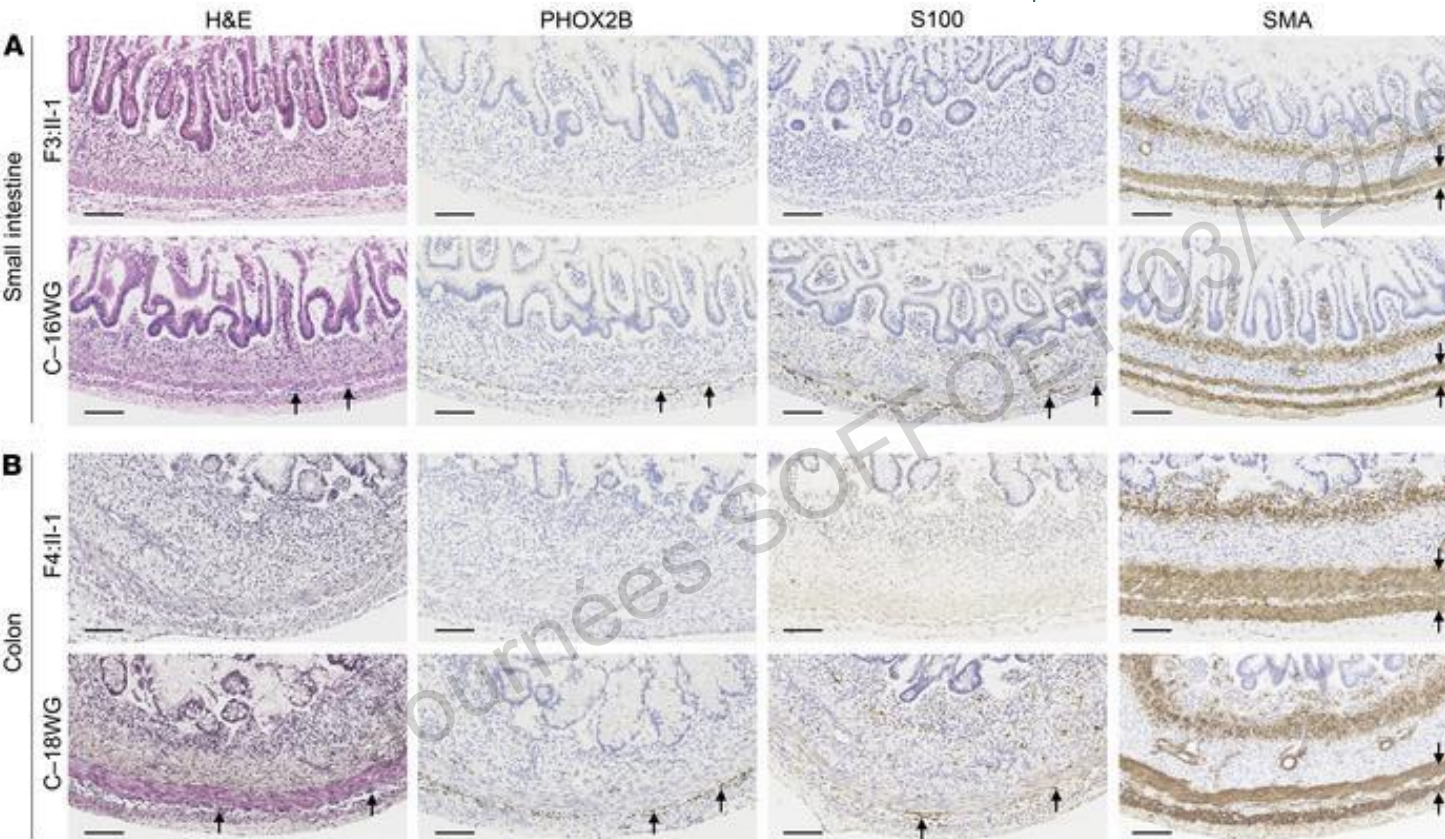
✓ **F2:II-2 and F2:II-3** : segment aganglionnaire < 2cm + zone de transition longue et hypoganglionnaire
Reclassification en hypoganglionose

✓ **F5:II-2** : HSCR court

Absence de ganglion dans colon

Altérations intestinales : analyse histologique de deux des trois foetus

✓ investigation rétrospective :



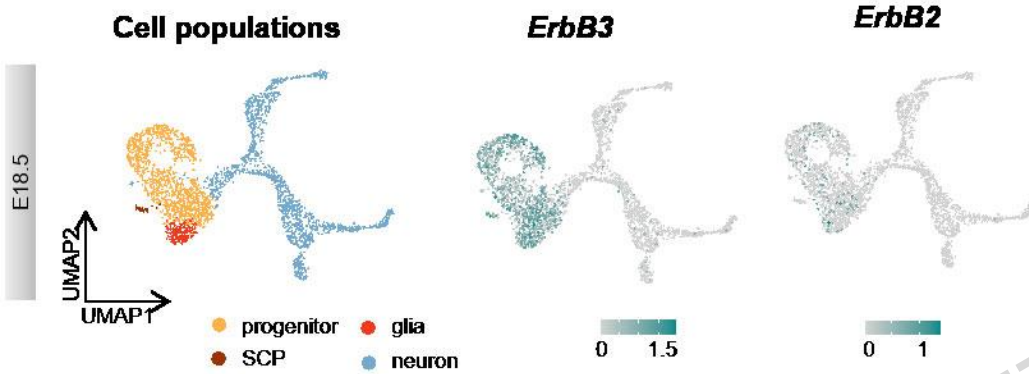
✓ F3:II-1 : absence de ganglion jusqu'à l'estomac
+ marquage SMA normal

✓ F4:II-1 absence de ganglion dans colon et partie du petit intestin + marquage SMA normal

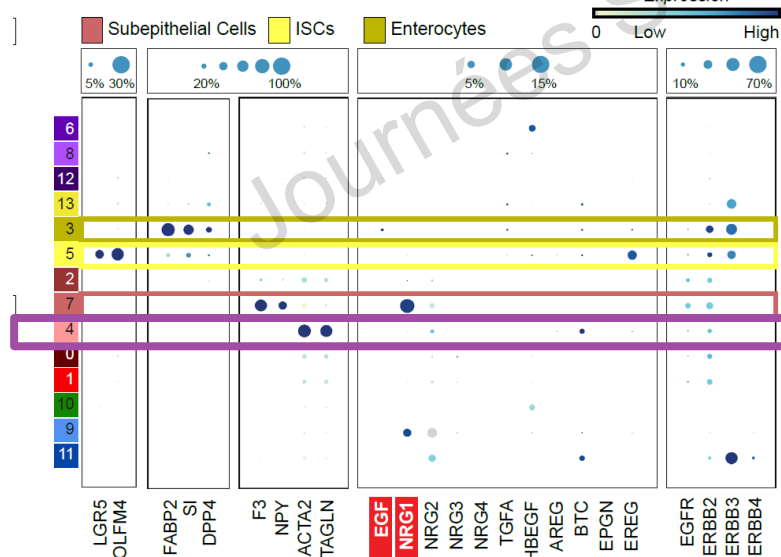
Le et al, J Clin Invest. 2021

Origine des anomalies du SNE et des cellules musculaires ?

scRNA-seq sur SNE :

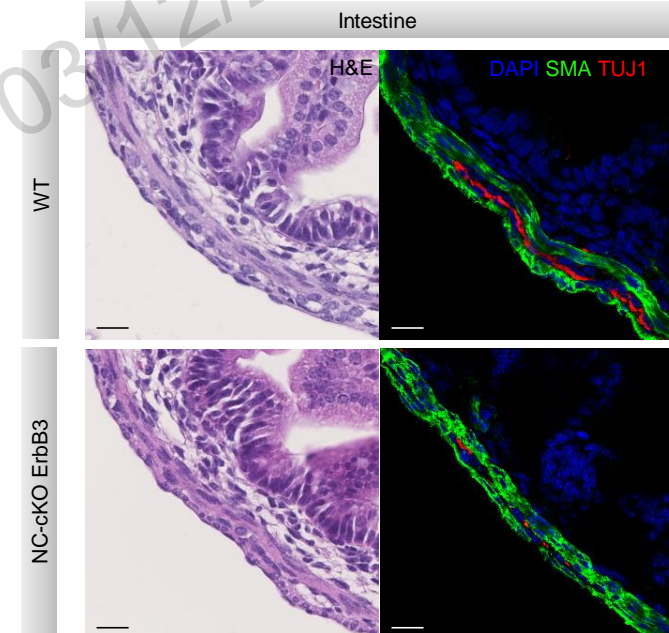


- ✓ ERBB3/2 exprimés dans progéniteurs et cellules gliales
- ✓ Pas d'expression dans les cellules musculaires

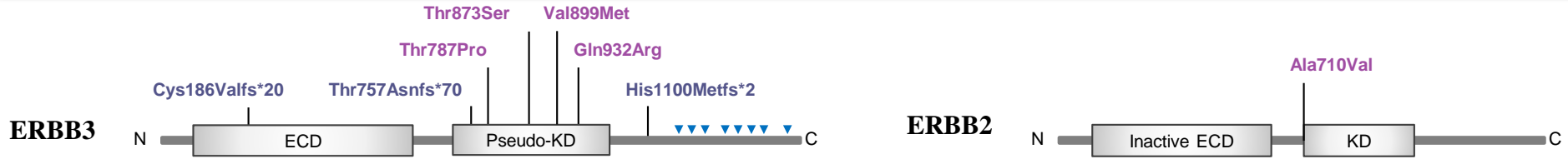


Altération de la musculature secondaire aux altérations du SNE ?

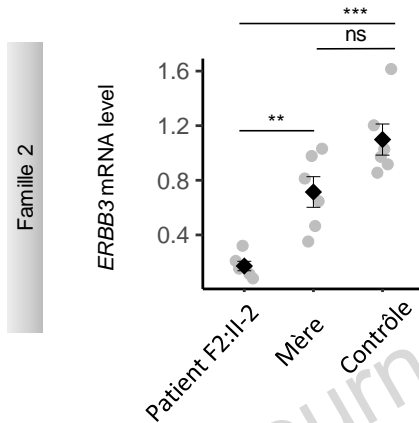
Analyse de musculature chez NC-cKO $ErbB3$



Variants *ERBB3* et *ERBB2* : perte de fonction partielle ou totale



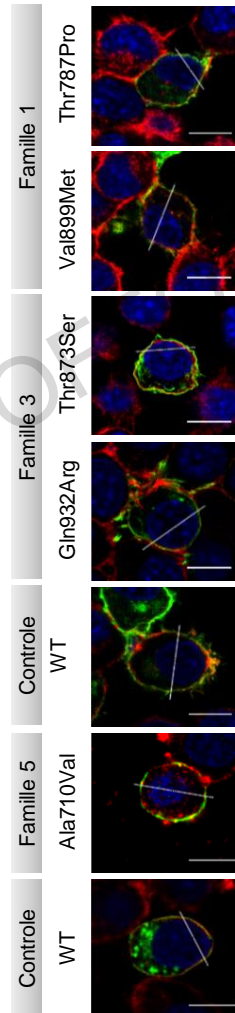
RTqPCR sur fibroblastes :



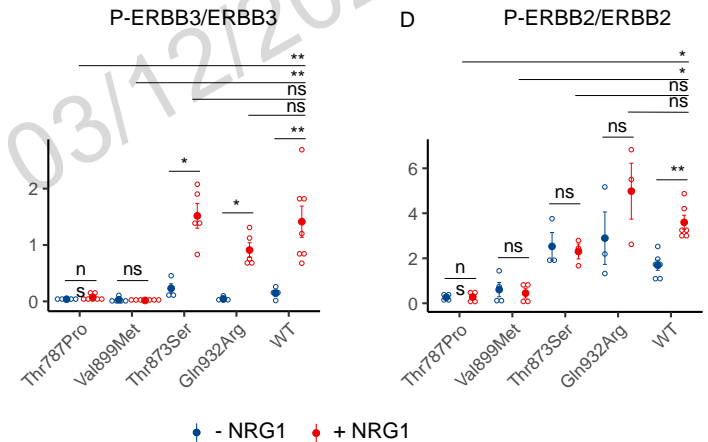
✓ Mutations tronquantes :
expression *ErbB3* réduite suggérant
une dégradation des ARNm par
NMD

Le et al, J Clin Invest. 2021

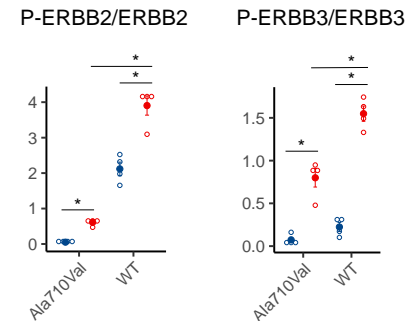
DAPI HA-ERBB3 Phalloïdin



Mutants *ERBB3* + *ERBB2* :



Mutant *ERBB2* + *ERBB3* :



✓ Mutations faux-sens : localisation normale
mais altération de la phosphorylation

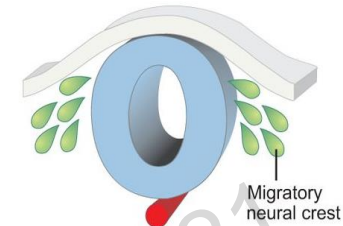
Mutations *ERBB3/2* : bilan

Dérégulation *ERBB3/2*



Anomalies développementales multiples dont certaines sont issues d'une altération de structures dérivées de la crête neurale

- **Altérations tube digestif** (6/8 patients-foetus)
- Neuropathie périphérique (3/8 patients)
- Malformations Cardiaques
- Ptosis
- Dysplasie de l'oreille externe



From Simões-Costa, Dev, 2015

Dérivés de la crête neurale

Cartilage facial

Neurones sensoriels

Septum Cardiaque

Neurones Parasymp.

Cellules neuroendocrines

Neurones sympathiques

Cellules de Schwann

Mélanocytes

neurones et cellules gliales entériques

Highlights :

- Première description de HSCR + POIC, POIC probablement neuropathique; L'origine des altérations musculaires reste à définir
- Régions ganglionnaires peuvent être anormales → troubles de la motilité intestinale complexes et persistants qui doivent être anticipés

Remerciements

Institute Imagine INSERM UMR1163

Thuy-Linh Le

Anna Pelet
Chris Gordon
Stanislas Lyonnet
Jeanne Amiel



Plateformes

Genomic Platform
Bioinformatic Platform
Cell Imaging Platform
Histology Platform



AP-HP

Necker

Louise Galmiche
Thierry Molina

Cyril Gitiaux
Marie Hully

Christophe Chardot

Olivier Goulet

Robert Debré

Jonathan Levy
Severine Drunat
Yline Capri
Anne-Claude Tabet
Fabien Guimiot

Antoine Beclère

Jelena Martinovic

Armand Trousseau

Mathilde Lefebvre
Antoinette Gelot
Sandra Whalen

Pitié-Salpêtrière

Linda Mouthon
Boris Keren

Children's National Washington and Mid- Atlantic Permanente, USA

Pim Suwannarat
Amanda Calleroz
H. Babcock

Karolinska Institute Stockholm, Sweden

Khomgrit Morarach
Ulrika Marklund

Erasmus Medical Center and UMC Maastricht, Netherlands

Alice Brooks
Robert Hofstra
DMEI Hellebrekers
TEJ Theunissen
HJ Smeets
René de Coo

ENS, Paris

Franck Boismoreau
Jean-François Brunet

The Journal of Clinical Investigation

RESEARCH ARTICLE

Dysregulation of the NRG1/ERBB pathway causes a developmental disorder with gastrointestinal dysmotility in humans

Thuy-Linh Le,¹ Louise Galmiche,^{2,3} Jonathan Levy,^{4,5} Pim Suwannarat,⁶ Debby M.E.I. Hellebrekers,⁷ Khomgrit Morarach,⁸ Franck Boismoreau,⁹ Tom E.J. Theunissen,¹⁰ Mathilde Lefebvre,¹¹ Anna Pelet,¹ Jelena Martinovic,¹² Antoinette Gelot,^{13,14} Fabien Guimiot,^{5,15} Amanda Calleroz,¹⁶ Cyril Gitiaux,¹⁷ Marie Hully,¹⁸ Olivier Goulet,¹⁹ Christophe Chardot,²⁰ Severine Drunat,^{4,5} Yline Capri,⁴ Christine Bole-Feysot,²¹ Patrick Nitschké,²² Sandra Whalen,²³ Linda Mouthon,²⁴ Holly E. Babcock,²⁵ Robert Hofstra,²⁶ Irenaeus F.M. de Coo,²⁷ Anne-Claude Tabet,^{4,28} Thierry J. Molina,^{3,29} Boris Keren,²⁴ Alice Brooks,²⁶ Hubert J.M. Smeets,²⁷ Ulrika Marklund,⁸ Christopher T. Gordon,¹ Stanislas Lyonnet,^{1,30} Jeanne Amiel,^{1,30} and Nadège Bondurand¹

March, 2021