



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Physiopathologie: des approches expérimentales aux nouvelles thérapeutiques

Présentée et soutenue par :

Audrey DE ROCCA SERRA - NEDELEC

le : jeudi 15 décembre 2011

Titre :

"Impact des mutations de la tyrosine phosphatase SHP2 dans la réponse à l'hormone de croissance.

Conséquences physiopathologiques dans le retard de croissance associé au syndrome de Noonan".

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

INSERM UMR-1048 Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Directeur(s) de Thèse :

Docteur Armelle YART

Docteur Patrick RAYNAL

Rapporteurs :

Professeur Yves LE BOUC

Professeur Jean-François TANTI

Professeur Hélène CAVE

Membre(s) du jury :

Professeur Hugues CHAP (Président)

Professeur Yves LE BOUC

Professeur Jean-François TANTI

Professeur Hélène CAVE

Docteur Armelle YART

Docteur Thomas EDOUARD

A mes parents,

A Thibault,

A Marie-Anne et Armelle,

A ma famille,

avec tout mon amour

Un Merci avec un grand M ...

... aux personnalités qui ont siégé à ce jury de soutenance,

*Monsieur le **Professeur Hugues Chap** pour avoir présidé ce jury de thèse, pour vos discussions toutes aussi riches les unes que les autres. J'ai eu un grand plaisir à répondre à votre argumentation pendant la soutenance. Votre présence dans ce jury est pour moi une grande fierté et je vous remercie sincèrement.*

*Monsieur le **Professeur Yves Le Bouc** pour avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse. Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté ce titre malgré votre emploi du temps surchargé. Je vous remercie également pour les échanges que nous avons eus lors de la préparation de ce manuscrit et ceux lors de ma soutenance.*

*Monsieur le **Professeur Jean-François Tanti**, pour avoir également accepté d'être rapporteur et évalué avec beaucoup de gentillesse mon manuscrit. Je vous remercie des commentaires que vous avez fait pour améliorer cette thèse et pour vos discussions lors de la soutenance qui ont apporté de nouvelles réflexions scientifiques.*

*Madame le **Professeur Hélène Cavé** pour avoir accepté la charge de travail qui incombe à la qualité de rapporteur. Je vous remercie pour être venue sur Toulouse et pour avoir participé activement aux différentes discussions qui ont été faites pendant cette journée.*

*Monsieur le **Docteur Thomas Edouard** pour de nombreuses qualités professionnelles et humaines. Merci pour les corrections tant de ce manuscrit mais également celles que tu as apportées à notre publication et qui ont été toutes fructueuses. Merci pour les discussions passionnantes et pour avoir pris le temps de m'expliquer les aspects cliniques du projet de recherches qui m'a été confié. Nous avons partagé quelques années ensemble au sein du laboratoire et j'ai pu travailler dans une ambiance agréable grâce à ta bonne humeur quotidienne. Je t'en remercie car cet environnement fut une source d'énergie inépuisable dans mon travail.*

*Madame le **Docteur Armelle Yart** ma directrice de thèse pour... beaucoup de raisons qui vont m'être difficiles à résumer en quelques lignes... A une chef exemplaire. J'ai eu une énorme chance d'avoir été encadrée et guidée par toi pendant ces quatre années. Un très grand merci pour m'avoir fait confiance depuis le premier entretien où j'ai quitté le bleu azur pour venir dans la ville rose jusqu'à aujourd'hui. Ton savoir et ton savoir-faire sont en or. Je te remercie de m'avoir transmis si généreusement une partie de cette richesse. Merci pour tout le soutien que tu m'as apporté à chaque instant, même lorsque parfois les jours étaient plus sombres, tu as fait en sorte que le soleil revienne très vite pour que je puisse continuer mon travail dans les meilleures conditions. Je ne te remercierai jamais assez... Je suis si fière d'avoir été ta toute première thésarde ! ... A une amie... merci de m'avoir ouvert ta porte dans cette si jolie maison où tu m'a fait découvrir la culture toulousaine avec notamment tes petits plats mijotés, tes gâteaux succulents et bien d'autres ! Merci pour m'avoir fait passer*

des bons moments auprès de tes proches, qui je l'espère, se réiriteront dans le futur proche et lointain. Nos chemins se séparent aujourd'hui, mais sache que la distance n'effacera pas ce que j'ai vécu à tes côtés. Merci...

... à mon directeur de thèse

Au Docteur Patrick Raynal pour m'avoir aiguillée lors de la mise en place de ce projet de thèse. Tu m'a enseigné les subtilités de la signalisation cellulaire, un monde qui m'était totalement inconnu à mon arrivée. Merci également pour t'avoir toujours rendu disponible lorsque je venais toquer à ta porte ; je garderai le souvenir que suite à nos discussions, je repartais de ton bureau avec une pile de bons conseils sous le bras qui m'ont permis de prendre confiance en moi et d'avancer plus sereinement dans ce projet.

... à celles et ceux qui ont partagé un bout de paillasse avec moi

A Mymi, je voudrais te dire combien notre rencontre fut importante pour moi. Tant d'un point de vue professionnel que personnel. Ce fut très agréable d'échanger nos différents points de vue sur les questions que nous nous posions, ce qui nous a amenés à réfléchir ensemble. Merci pour toutes les fois où j'ai eu besoin de toi, notamment les corrections de dernières minutes de ce manuscrit à des heures indécentes... tu as toujours été présente dans mes moments de « speed » et tu sais Oh combien il y en a eus ! C'était une chance d'avoir partagé ces années avec toi. Je retiendrai tes nombreuses qualités comme ton honnêteté, ton assiduité, ta rigueur, ta générosité, ta gentillesse et j'en passe... Je te souhaite tout le meilleur pour la suite et je reste persuadée que ta thèse sera une belle réussite. Aucune inquiétude sur ta qualité de futur Docteur ! Une excellente continuation Mymi, (...Au fait as-tu retrouvé l'autre moitié ? ;)).

A Karine, une sacrée post-doc ! Je te remercie pour tous tes conseils, pour les diverses corrections que tu m'a suggérées pour ce manuscrit. Merci de m'avoir aidée à me poser certaines questions pour faire mûrir mon esprit scientifique. Tu as apporté un bouquet de « folies » dans le labo. Ta personnalité si particulière rendait les jours d'hiver et les périodes difficiles bien plus joyeuses... Un très grand merci à Pascal ! (garde moins une bière au frais, j'ai soif!). Merci à tous les deux pour les soirées danses, bières, pizzas, fromages !!! Ces soirées m'ont permis de retrouver la pêche quand je l'avais un peu perdue. Je garde un excellent souvenir de notre soirée Cali-Billard avec ta sœur. Bonne continuation à vous tous...

... à toutes les personnes qui m'ont entourées aux labos

Gentillesse, douceur et sympathie sont des mots qui reflètent mes copines Anne et Marianne, le duo de choc ! Merci pour toutes les soirées ensemble, raclette chez l'une, barbecue chez l'autre, toujours gargantuesques ! j'ai également été contente de partager les quelques minutes lors de vos pauses « clopes café ». Anne, je te souhaite que du bonheur dans ta vie de famille et un très bon post- doc, bientôt ? si nous sommes voisines, je serai ravie de te rendre visite. Marianne, bonne continuation dans ta vie professionnelle. J'espère que les personnes qui t'entourent voient la chance qu'ils ont de travailler avec toi. Je te souhaite

plein de bonnes choses dans ta vie. Et c'est pas parce que je pars que j'oublierai... les gâteaux de la maman d'Armelle !!! j'ai noté dans mon Ipad les rendez-vous importants de l'année que sont Noël... et la Saint Roméo, qui va, ceci dit, pas tarder à arriver !

*Un grand merci à **toutes les personnes de l'ex unité 563 du CPTP du CHU de Purpan** où j'ai baigné dans une ambiance extrêmement sympathique...*

Merci particulièrement à toi Véro pour toutes les fois où j'ai eu besoin d'être remotivée ! surtout dans la peur de partir en post doc. Tu as su trouver les mots qu'il faut, tu m'as conseillée et rassurée pour ma soutenance de thèse. Toi aussi Stef, merci pour tous les conseils que tu m'as donnés. Quelles soirées mémorables, les soirées de thèse... n'est ce pas Natalia ? grâce à toi j'ai dévoilé ma facette de rappeuse ! la tienne est pas mal non plus... j'ai passé des moments très agréables et plein d'humour ! Bonne continuation pour la fin de ta thèse et plein de bonnes choses dans ta vie personnelle. Merci à toi Nicole, tu fais preuve d'une gentillesse et d'une douceur rare, merci pour tes conseils si précieux de bio mol. Qui l'eu cru ? arriver à Toulouse et rencontrer une personne qui connaisse Garbejaire, petit village perdu du 06 ! Justine, Véronique et Pauline, Aurélie, Guillaume, MiniDrey, Nizar, Laetitia, Emmanuelle, Nicolas, Aurélie B, Vincent et bien d'autres ! Merci à toi Michel pour m'avoir passé si gentiment mes commandes... de vins... pour mon mariage. Sans oublier ma secrétaire préférée Yvette, toi qui restait au bureau jusqu'à pas d'heure pour passer les commandes de dernière minutes, notamment les miennes... Merci pour toute ta gentillesse Yvette. Sans oublier ceux qui font partie maintenant des anciens : Marie où j'ai eu la joie de faire ta connaissance à la fin de ta thèse, Pierre et Hélène.

Mes remerciements se tournent à présent à toute l'équipe d'Adipolab de l'unité 1048 du CHU de Rangueil : Merci au Docteur Philippe Valet de m'avoir hébergé dans son laboratoire pour y finir mes travaux de thèse. Merci au soutien technique qui m'a été apporté tout particulièrement à Danièle et Sandra. A tous les doctorants et post-doctorant, Anne, Thibault, Chloé, Chantal, Claire, Rodolphe, Camille (s) et Thomas. Partants pour une autre soirée matelas ? Un grand merci pour m'avoir fait un coin de paillasse et avoir facilité mon intégration aux sein de l'équipe. Merci pour les surprises post-soutenance, elles sont mémorables !

... ainsi qu'à toutes les personnes de l'unité 1048 du bâtiment L4 du CHU de Rangueil.

... à mes amis

A tous mes amis niçois Hélène, Nicolas, Marco, Benoît, Riri, Virginie, Valentin, Aurélie B, Jonathan, Aurélie G, Sébastien, Gaëlle, Matthieu, Gwen, Rémi, Johanna et vos bambinos ! J'ai été souvent absente lors des regroupements que nous avons instaurés depuis le Bac, mais vous avez toujours eu une pensée pour moi et je vous en remercie très sincèrement. Quand on se retrouve c'est comme si on ne s'était jamais quittés... merci à vous tous pour cette belle preuve d'amitié.

... à ma famille qui m'est si chère

A toi Papa, à toi Maman, merci pour l'amour que vous m'avez donné jusqu'à présent. Si j'en suis arrivée jusque là, c'est bien évidemment grâce à vous et votre soutien quotidien. Vous êtes ma source d'équilibre et de bien-être. Chacunes de vos paroles ont été réconfortantes, surtout celles après vous avoir raconté pendant des heures mes déboires. Merci pour la patience dont vous avez fait preuve. Vous m'avez apporté le soleil méditerranéen qui m'a tant manqué et que j'ai retrouvé dans votre affection et dans les petits plats de Maman lors de vos visites à Toulouse. Malgré la distance, vous avez été toujours présents et je n'ai jamais manqué de quoi que ce soit... enfin si, de ne pas avoir eu la possibilité de vous embrasser tous les soirs. A Marie-Anne et à Armelle, mes sœurs qui m'ont envoyées des petits messages dans la journée, pour me dire qu'elles pensaient à moi. Merci pour votre soutien et pour tout l'amour que j'ai reçu de vous. Je suis si fière de ma famille et je vous aime tellement fort !

A toi Thibault, mon mari, mon Doudou. Merci pour m'avoir suivie dans cette aventure en sacrifiant ta vie marseillaise qui t'était si chère auprès de tes proches notamment tes grands-parents. Tu as veillé à ce que mon environnement à la maison soit des plus paisibles pour effacer les jours de travail difficiles. Merci de m'avoir attendu ces soirs où l'horloge indiquée l'heure du petit matin ! Merci d'avoir fait preuve d'une grande patience envers moi et pour toute l'attention que tu m'as donnée. Je t'aime de tout mon cœur...

Merci à toute ma famille et plus particulièrement à ma Tata Annette, qui n'a pas pu venir à ma soutenance mais qui été présente dans mon cœur, ma petite cousine Andrée et ma petite petite cousine Valérie, qui m'ont fait le plaisir de venir à ma thèse. Merci à toutes les trois pour votre générosité et l'amour que vous m'avez donné. Merci pour m'avoir hébergée sous votre toit pendant ce mois de janvier. Je m'y suis sentie à l'aise comme un chez moi, pour y faire sereinement les finitions de ce manuscrit. Je vais avoir beaucoup de mal à partir !

Ici s'achèvent les derniers jours dans la ville rose qui a revêtu son beau manteau blanc. Je suis ravie de passer encore quelques jours avec vous tous, en attendant... une nouvelle aventure en vous gardant au chaud dans mon cœur.

Sommaire

Abréviations	15
Résumé	19
Abstract	21
Liste des figures et tableaux	23
Introduction générale	25
Introduction bibliographique	27
Chapitre I- Aspects cliniques du syndrome de Noonan et des syndromes apparentés	29
I. Description clinique du syndrome de Noonan.....	30
A. Généralités.....	30
B. Les différentes anomalies du syndrome de Noonan : la triade phénotypique.....	30
1. La dysmorphie faciale.....	30
2. Le retard de croissance.....	32
3. Traitement pharmacologique du retard statural dans le syndrome de Noonan.....	40
4. Hypothèses physiopathologiques du retard de croissance dans le syndrome de Noonan.....	42
C. Les cardiopathies.....	42
D. Description des autres anomalies phénotypiques du syndrome de Noonan.....	44
1. Anomalies hématologiques.....	44
2. Anomalies du développement psychomoteur.....	44
3. Autres anomalies.....	45
E. Le diagnostic clinique du syndrome de Noonan.....	45
II. Description clinique des syndromes apparentés au syndrome de Noonan.....	47
A. Le syndrome L.E.O.P.A.R.D.....	47
1. Généralités.....	47
2. Spécificités et triade phénotypiques du syndrome L.E.O.P.A.R.D.....	47
3. Autres anomalies.....	50
4. Diagnostic clinique du syndrome L.E.O.P.A.R.D.....	50
B. Le syndrome Cardio-Facio-Cutané.....	51
1. Spécificités et triade phénotypiques dans le CFC.....	51
2. Autres anomalies.....	52
C. Le syndrome de Costello.....	52
1. Spécificités et triade phénotypique du syndrome de Costello.....	52
2. Autres anomalies.....	54
D. La neurofibromatose de type I et le syndrome de Legius.....	55
E. Les « NS-like ».....	55
III. Conclusion.....	56
Chapitre II- Aspects génétiques du syndrome de Noonan et de ses apparentés	59
I. Identification des gènes impliqués dans le syndrome de Noonan et de ses apparentés.....	60
II. La voie de signalisation Ras/MAPK.....	61
A. Généralités.....	61
B. Description de la voie Ras/Erk1/2.....	62
1. Les protéines Ras : structure, fonction et activation.....	62

2.	Les effecteurs de Ras dans la cascade Ras/Erk1/2	66
III.	Conséquences physiopathologiques des anomalies de la voie Ras/MAPK : les « RASopathies »	69
A.	Anomalies dans l'activation de Ras par les mutations de <i>SOS1</i> et de <i>RAS</i>	69
B.	Perturbation de la régulation négative de Ras par les mutations de <i>NF-1</i>	70
C.	Anomalies de la transduction du signal par les mutations de <i>RAF</i> et <i>MEK</i>	70
D.	Perturbation de la régulation de la cascade Ras/Erk1/2	70
1.	Mutations de <i>PTPN11</i> dans les SN et SL	70
2.	Mutations de <i>CBL</i> , <i>SHOC2</i> et de <i>MYST4</i> dans des syndromes « SN-like »	71
3.	Mutations de <i>SPRED1</i> dans le syndrome de Legius	72
IV.	Principales corrélations génotype-phénotype dans le syndrome de Noonan et ses apparentés	74
A.	Corrélations génotype-phénotype dans le SN	74
1.	Retard statural	74
2.	Les cardiopathies	76
3.	La dysmorphie faciale	76
4.	Autres corrélations	76
B.	Corrélations Génotype-Phénotype dans les syndromes apparentés au syndrome de Noonan	77
1.	Le syndrome L.E.O.P.A.R.D.	77
2.	Le syndrome Cardio-Facio-Cutané	78
3.	Le syndrome de Costello	78
4.	Les « SN-like »	79
V.	Conclusion	79
Chapitre III : Rôle physiologiques de SHP2 et conséquences physiopathologiques de ses mutations		81
I.	Rôles physiologiques de la tyrosine phosphatase SHP2	82
A.	Généralités	82
B.	Présentation de SHP2	83
1.	Structure de SHP2	83
2.	Activation de SHP2	86
3.	Régulation de SHP2	87
C.	Fonction de SHP2 dans la régulation de différentes voies de signalisation	87
1.	Rôles de SHP2 dans la voie Ras/MAPK	87
2.	Rôles de SHP2 dans l'activation de PI3K	92
3.	Rôles de SHP2 dans l'activation du module JAK/STAT	92
D.	Fonctions biologiques de SHP2 sur le développement : les modèles animaux	95
1.	SHP2 et ses fonctions embryologiques chez les invertébrés	96
2.	Impact de l'inactivation totale de SHP2 chez les vertébrés	96
3.	Impact de l'inactivation tissu-spécifique de SHP2 chez les vertébrés	97
II.	Rôles physiopathologiques des mutations de SHP2 dans le SN et le SL	103
A.	Conséquences des mutations SN et SL sur la structure et la fonction de SHP2	103
1.	Structure et fonction des mutants SN de SHP2	103
2.	Structure et fonction des mutants SL de SHP2	105

B.	Conséquences fonctionnelles des mutations Noonan de SHP2 dans la signalisation et le développement	106
1.	Le modèle drosophile	107
2.	Le modèle poisson zèbre	107
3.	Les modèles murins	107
C.	Conséquences fonctionnelles des mutations L.E.O.P.A.R.D. de SHP2 dans la signalisation et le développement.....	109
1.	Les modèles animaux	110
2.	Le SL : une « PI3Kpathie » ?	111
III.	Conclusion	112
	Résultats expérimentaux.....	113
I.	Introduction.....	115
II.	Résultats.....	116
III.	Conclusion	143
	Discussion et perspectives	145
I.	Comment l'activation des MAPK induit-elle une inhibition de la production d'IGF-I sous stimulation par GH ?.....	147
II.	Le déficit en IGF-I explique-t-il à lui seul le retard de croissance associé au SN?	149
III.	L'hyperactivation de MAPK sous GH est-elle à l'origine d'autres retards staturaux ?.....	150
IV.	Quel traitement pour le retard de croissance associé au SN et aux autres RASopathies ? ..	152
	Références bibliographiques	155
	Annexes	173

Abréviations

ALS	Acid Labile Subunit
CAV	Canal Atrio-Ventriculaire
CBL	Casitas B-lieage Lymphoma
CHK	Csk Homogous Kinase
CIA	Communication Inter-Atriale
CIV	Communication Inter-Ventriculaire
CFC	syndrome Cardio-Facio-Cutané
CR	Conserved Regions
CRD	Cysteine-Rich Domain
Csk	C-terminal src kinase
Csw	Corkscrew
DH	Dbl Homology domain
DH-PH	Dbl Homology-Pleckstrin Homology
DS	Déviation Standard
DSP	Dual Specificity Phosphatases
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Récepteur à l'EGF
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinase ½
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Hormone Folliculo-Stimulante
Gab	Grb2-adapter binder
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanosine Exchange Factor
GH	Growth Hormone
GH-R	Growth Hormone Receptor
GHD	Growth Hormone Deficiency
GHI	GH Insensitivity
GHrh	GH recombinante humaine
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GSK3β	Glycogene Synthase Kinase β
GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPases	Guanosine TriPhosphatases
HCM	Hypertrophie CardioMyocytaire
HF	Histone Folds
IGF-I	Insulin-like-Growth-Factor-I
IGFBP	IGF Binding Protein
INF	Interféron
IPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
IRS-1	Insuline Receptor Substrate 1
JAK	JAnus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LH	Luteinizing Hormone
LAM	Leucémie Myéloïde Aiguë

LIF	Leukemia Inhibiting Factor
LLA	Leucémie Lymphoblastique Aigüe
LMMJ	Leucémie MyéloMonocytaire Juvénile
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	MAPK Kinases
MAPKKK	MAPK Kinases Kinases
NCFC	Neuro-Cardio-Facio-Cutané
Nf	Neurofibromine
NF1	NeuroFibromatose de type I
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
Nrg1	Neuréguline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PH	Plekstrin Homology domain
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKC δ	Protéine Kinase C δ
PLC γ 1	PhosphoLipase C γ 1
PP1, PP2A	Phosphatase Protein 1, 2A
PRLR	PRoLactine Receptor
PTB	PhosphoTyrosine Binding
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
RasGAP	Ras-GTPase Activating Protein
RBD	Ras Binding Domain
RCPG	Récepteurs Couplés aux Protéines G
REM	Ras Exchange Motif
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
SH2	Src Homology-2
SHP2	SH2 domain-containing Phosphatase 2
SIRP	SIGNAL Regulatory Protein
SC	Syndrome de Costello
SFK	Src Family Kinases
SHOC2	Soc-2 suppressor Of Clear Homolog 2
SL	Syndrome L.E.O.P.A.R.D.
SN	Syndrome de Noonan
SN-LAH	SN-like with Loose Anagen Hair
SOCS	Suppressors Of Cytokine Signaling
SOS	Son of Sevenless
SPRED1	Sprouty-related proteins with an EVH1 domain
Spry	Sprouty
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TOR	Target Of Rapamycin
UBA	C-terminal UBiquitin-Associated

Nomenclature des acides aminés

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Acide aspartique	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Résumé

Le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique autosomique dominante relativement fréquente (1/2000 naissances), qui appartient à la famille des syndromes Neuro-Cardio-Facio-Cutanés (NCFC), et qui est caractérisée par l'association d'une cardiopathie, d'une dysmorphie faciale et d'un retard de croissance. Dans 50% des cas, le SN est causé par des mutations sur le gène *PTPN11*, codant la tyrosine phosphatase SHP2. SHP2 joue un rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie de multiples tissus et organes par sa capacité à réguler diverses voies de signalisation majeures, telles que les voies Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt et JAK2/STAT5. Si l'on sait que les mutations SN de SHP2 causent son hyperactivation, il reste à comprendre comment cette hyperactivation de SHP2 induit le développement des différents symptômes du SN et notamment le retard statural, dont l'origine reste mal comprise bien qu'il concerne 80% des patients SN. Or, des études cliniques ont révélé que les patients SN présentent des taux normaux d'hormone de croissance (Growth Hormone, GH) associés à des taux faibles d'Insulin-like-Growth-Factor-I (IGF-I), son médiateur biologique, un profil hormonal évocateur d'une résistance à GH.

Ces travaux de thèse ont donc eu pour objectifs d'identifier le rôle de SHP2 en aval du récepteur de GH et de déterminer quelles étaient les conséquences physiopathologiques des mutations SN de SHP2 dans la réponse à GH. À l'aide de différents outils moléculaires et cellulaires et d'un modèle murin du SN (souris *Ptpn11*^{D61G/+}), nous avons montré que SHP2 joue un rôle négatif dans la production d'IGF-I induite par GH, ce qui se traduit par des taux bas d'IGF-I chez des animaux SN en phase de croissance, en association avec un retard statural. D'un point de vue mécanistique, nous avons démontré, par différentes approches, que SHP2 joue un rôle positif dans l'activation de la voie Ras/MAPK induite par GH, sans affecter les autres voies de signalisation activées par le R-GH (JAK/STAT, PI3K/Akt). Nous avons, de plus, disséqué le mode d'action de SHP2 dans l'activation de la voie Ras/MAPK, en montrant que SHP2 joue un rôle positif dans l'activation de Ras en déphosphorylant la protéine adaptatrice Gab1 sur ses sites de recrutement pour un inhibiteur naturel de Ras, RASGAP. Enfin, nous avons pu faire le lien entre ces 2 processus dépendants de SHP2 sous induction par GH, en montrant que l'inhibition des MAPK induisait une augmentation de la production d'IGF-I induite par GH, *in vitro* et *in vivo*. De façon importante, cette restauration des taux d'IGF-I chez les souris SN s'accompagne d'une amélioration de leur croissance, suggérant que le ciblage de la voie Ras/MAPK puisse avoir un effet bénéfique sur le retard de croissance des sujets SN. À l'appui de cela, plusieurs études récentes ont montré un effet bénéfique d'un tel traitement sur d'autres traits phénotypiques (cardiopathies, dysmorphie).

Abstract

Noonan syndrome (NS) is a common congenital autosomal dominant disorder (estimated incidence 1/2000 live births), that belongs to the family of Neuro-Cardio-Facio-Cutaneous (NCFC) syndromes and is characterized by heart defects, facial dysmorphic features and growth retardation. Nearly half of the NS patients carry a mutation of the *PTPN11* gene, encoding the tyrosine phosphatase SHP2, that plays a key role in development and homeostasis of multiple tissues and organs, through its ability to regulate various signaling pathways, including the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt and JAK2/STAT5 module. It is known that NS-causing mutations induce a hyperactivation of the phosphatase. However, it remains to be established how this hyperactivation is responsible for the development of the different symptoms of the disease. This is notably the case for short stature, which origin is poorly understood although it concerns 80% of NS patients. Clinical studies have revealed that NS patients display normal level of growth hormone (GH) but low level of Insulin-like-Growth-Factor-I (IGF-I), its biological mediator, a hormonal profile that is evocative of GH resistance.

This project thus aimed at identifying the role of SHP2 downstream of the GH receptor and at determining the pathophysiological outcomes of SN-causing SHP2 mutations in GH response. Using different molecular and cellular tools as well as a mouse model of NS (*Ptpn11*^{D61G/+} mice), we have shown that SHP2 plays a negative role in GH-induced IGF-I production, which results in low IGF-I levels in growing NS animals, in association with short stature. On a mechanistic point of view, we demonstrated through several approaches, that SHP2 plays a positive role in GH-evoked Ras/MAPK activation, without affecting other signaling pathways activated by the GH-R (JAK/STAT, PI3K/Akt). Moreover, we deciphered how SHP2 acts in the Ras/MAPK pathway, showing that it participates in Ras activation by dephosphorylating the adaptor Gab1 on its binding site for RASGAP, a natural inhibitor of Ras. Lastly, we could link these 2 SHP2-dependent processes under GH induction, showing that MAPK inhibition results in an increase in GH-induced IGF-I production *in vitro* and *in vivo*. Importantly, restoring IGF-I level in young NS animals results in an improvement of their growth parameters, suggesting that targeting that Ras/MAPK pathway could be beneficial on growth retardation in NS subjects. Supporting this view, recent reports have shown that such strategy could be effective to alleviate other NS features, notably cardiopathy and dysmorphic abnormalities.

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Anomalies faciales observées chez les patients SN à différents âges: "The Changing Phenotype".	31
Figure 2 : Courbes de croissance de référence de la population générale (filles).	33
Figure 3 : Représentation schématique de la distribution des tailles dans la population générale et correspondance percentile-déviations standards.	33
Figure 4 : Courbes de croissance des garçons et des filles atteints du SN.	35
Figure 5 : Comparaison des vitesses de croissance des patients SN (en rouge) et de la population générale (orange).	37
Figure 6 : Représentation schématique de l'axe somatotrope : son activation et sa régulation.	39
Figure 7 : Lentigines multiples dans le syndrome de L.E.O.P.A.R.D .	48
Figure 8 : Signes dysmorphiques dans le syndrome L.E.O.P.A.R.D.	48
Figure 9 : Signes cliniques du syndrome Cardio-Facio-Cutané	51
Figure 10 : Signes cliniques du syndrome de Costello	53
Figure 11 : Structure de la protéine Ras.	63
Figure 12 : Représentation schématique de la structure de Sos1.	64
Figure 13 : Activation et régulation de la GTPase Ras.	65
Figure 14 : Représentation schématique de la structure des isoformes A-RAF, B-RAF et C-RAF (Raf1).	67
Figure 15 : Représentation schématique de la structure de MEK	67
Figure 16 : Modèle classique de l'activation et de la régulation de la voie Ras/MAPK	68
Figure 17 : Les « RASopathies » : anomalies de la voie de signalisation Ras/MAPK.	73
Figure 18 : Représentation schématique de SHP2 : organisation de son ADN codant (A), de sa structure (B) et de sa conformation protéique (C).	85
Figure 19 : Représentation schématique de l'activation de SHP2	86
Figure 20 : Multiples rôles de SHP2 dans la régulation de différentes voies de signalisation.	95
Figure 21 : Distribution des résidus mutés de SHP2 dans les syndromes de Noonan et L.E.O.P.A.R.D.	106
Figure 22 : Mécanisme proposé du rôle de SHP2 dans la réponse à l'hormone de croissance (GH). Conséquences physiopathologiques des mutations Noonan de SHP2 dans le retard de croissance.	144
Tableau 1 : Efficacité du traitement par la GHRh dans des cohortes de patients SN.	41
Tableau 2 : Récapitulatif des différentes cardiopathies et leurs fréquences d'apparition dans le SN.	43
Tableau 3: Critères de diagnostic du syndrome de Noonan.	46
Tableau 4 : Récapitulatif des principales caractéristiques du syndrome de Noonan et des principaux syndromes apparentés.	57
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents gènes identifiés dans le SN et apparentés.	60
Tableau 6 : Principaux modèles murins d'inactivation de SHP2 tissu spécifique.	102

Introduction générale

Le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique relativement fréquente (1/1000 à 1/2500 naissances) qui se caractérise principalement par une dysmorphie faciale, une cardiopathie et un retard de croissance. Ces signes phénotypiques sont partagés avec une pénétrance variable avec d'autres syndromes apparentés au SN que sont le syndrome L.E.O.P.A.R.D. (SL), le syndrome de Costello, le syndrome Cardio-Facio-Cutané et la Neurofibromatose de type I, formant ainsi la famille des syndromes Neuro-Cardio-Facio-Cutané (NCFC).

Après avoir décrit les aspects cliniques de ces différents syndromes dans le chapitre I de l'introduction bibliographique, nous verrons que le diagnostic clinique est bien souvent difficile à poser à cause de la superposition plus ou moins importante des phénotypes. Dans un deuxième chapitre de cette introduction, nous montrerons qu'avec la découverte des mutations responsables de ces syndromes, le diagnostic clinique s'est vu enrichi d'un diagnostic moléculaire. De façon intéressante, nous verrons que tous les gènes mutés dans les NCFC appartiennent à la voie de signalisation Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), une voie de signalisation majeure qui régule des processus cellulaires fondamentaux que sont la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. Nous décrirons ensuite les conséquences des mutations des différents acteurs de cette voie en lien avec le développement des NCFC qui ont, en conséquence, été redéfinis sous la dénomination de « RASopathie », et évoquerons les premières corrélations génotype/phénotype disponibles à ce jour.

Des mutations du gène *PTPN11*, codant pour la tyrosine phosphatase SHP2, étant une des premières causes des NCFC, car à l'origine de la moitié des cas de SN, nous consacrerons le chapitre III de cette introduction à décrire cette protéine, ses fonctions, et les conséquences de ses dérégulations en condition pathologique. Ainsi, nous verrons que si l'ontologie de certains des traits phénotypiques du SN associé aux mutations de SHP2 commence à être comprise, les mécanismes responsables du développement d'autres symptômes sont très peu élucidés. C'est notamment le cas du retard statural, alors que celui-ci concerne plus de 80% des patients SN et est retrouvé de façon plus ou moins pénétrance dans les autres NCFC.

Comprendre l'origine du retard statural dans le SN a donc fait l'objet de ce travail de thèse, qui est présenté dans la partie Résultats Expérimentaux de ce manuscrit. Des études cliniques sur le dosage hormonal des patients avaient révélé des taux circulants normaux voire élevés d'hormone de croissance (Growth Hormone, GH) associés à des taux faibles d'Insulin-

like-Growth-Factor-I (IGF-I), le médiateur biologique des effets de GH. Ce profil hormonal étant évocateur d'une résistance à GH et le récepteur à GH (GH-R) n'étant pas muté chez les patients SN, l'hypothèse d'une résistance post-récepteur à GH avait été posée. Nous avons donc voulu évaluer cette hypothèse en étudiant le rôle de SHP2 dans la réponse biologique à GH, puis en déterminant l'impact de mutations SN sur cette fonction.

Nous avons d'abord développé différentes approches visant à interférer avec la fonction de SHP2, par l'utilisation d'un lentivirus portant un ARNsh dirigé contre SHP2 endogène ou encore par expression d'un dominant négatif de SHP2, dans des modèles cellulaires sensibles à GH (3T3F442A, HEK293 exprimant le R-GH). Ceci nous a permis de démontrer que SHP2 régule positivement la voie de signalisation Ras/MAPK induite par GH, en déphosphorylant les sites de recrutement de RasGAP, un inhibiteur naturel de RAS, sur la protéine adaptatrice Gab1. Concernant la réponse biologique à GH, nous avons montré que SHP2 régule négativement la production d'IGF-I, par un mécanisme dépendant des MAPK.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer l'impact des mutations SN sur la réponse à GH, en termes d'activation de la voie Ras/MAPK et de production d'IGF-I. Pour cela, nous avons développé différentes stratégies, dont une approche originale de Knock Out/ Knock In cellulaire permettant d'obtenir une hétérozygotie fonctionnelle pour les mutants SN de SHP2. Ceci nous a permis de montrer que les formes SN de SHP2 hyperactivent la voie Ras/MAPK sous stimulation par GH in vitro et in vivo. De plus, grâce à un modèle murin du SN (*Ptpn11*^{D61G/+}), nous avons mis en évidence l'existence d'un retard de croissance qui était corrélé à des taux faibles d'IGF-I chez les souriceaux SN, ce qui est en accord avec les données cliniques retrouvées chez les patients SN. De façon importante, nous avons pu démontrer qu'un traitement de femelles allaitantes par un inhibiteur pharmacologique de MEK1 résultait en une augmentation significative des taux d'IGF-I chez les souriceaux SN, avec pour conséquence une amélioration de leur croissance dès les 5 premières semaines de vie. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'un défaut de l'axe GH/IGF-I, via la dérégulation de la voie Ras/MAPK, serait à l'origine du retard de croissance chez les patients SN mutés sur le gène *PTPN11*.

Ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives de recherche dans la compréhension des rôles physiologique et physiopathologique de SHP2, notamment le traitement du retard de croissance chez les patients atteints du SN. Ils pourront peut-être permettre l'identification de nouvelles cibles dans le traitement du retard de croissance chez les patients atteints par ce syndrome.

-Introduction bibliographique-

Chapitre I- Aspects cliniques du syndrome de Noonan et des syndromes apparentés

Décrit pour la première fois en 1968 par la J.A. Noonan, cardiopédiatre, le syndrome de Noonan (SN ; MIM#163950) est caractérisé principalement par une dysmorphie faciale, un retard statural et une cardiopathie (Noonan, 1968). Cette triade phénotypique est retrouvée, avec une expression variable, dans d'autres syndromes phénotypiquement proches que sont le syndrome L.E.O.P.A.R.D. (SL ; MIM#151100), le syndrome Cardio-Facio-Cutané (CFC ; MIM#115150), le syndrome de Costello (SC ; MIM#218040), la Neurofibromatose de type I (NF1 ; MIM#162200) et le syndrome de Legius (NFLS ; MIM#611431). Par leurs traits cliniques communs, ces syndromes ont été regroupés sous le terme de syndromes Neuro-Cardio-Facio-Cutanés (NCFC). Cependant, le diagnostic clinique s'avère quelquefois difficile à poser à cause du chevauchement fréquent des symptômes manifestés par les patients.

Dans ce premier chapitre, nous nous intéresserons à la description clinique du syndrome de Noonan et des syndromes apparentés. Nous présenterons les différentes anomalies phénotypiques qui, pour certaines, sont partagées entre ces syndromes. Nous insisterons plus particulièrement sur une des anomalies les plus fréquentes retrouvées dans le SN, à savoir le retard de croissance, dont l'origine reste mal comprise et qui a fait l'objet de ce travail de thèse. Enfin, nous discuterons des possibilités thérapeutiques actuellement disponibles et de leurs limitations.

I. Description clinique du syndrome de Noonan

A. Généralités

Le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique fréquente dont la prévalence est estimée entre 1/1000 à 1/2500 naissances vivantes (Tartaglia et al., 2011). Ces analyses n'ayant pas été réalisées à partir d'études de population et ne tenant pas compte des cas d'interruptions spontanées de grossesse, l'incidence de la maladie pourrait être plus importante que sa prévalence. D'un point de vue génétique, les mutations *de novo* sont les plus fréquentes, responsables de 60% des cas de SN (Jamieson et al., 1994). Dans les formes familiales, la transmission de la mutation se fait par un mode autosomique dominant, le plus souvent par l'allèle maternel, probablement expliquée par l'infertilité masculine des patients SN, comme nous le verrons plus loin (Kelnar, 2009).

B. Les différentes anomalies du syndrome de Noonan : la triade phénotypique

1. La dysmorphie faciale

La dysmorphie faciale est un trait phénotypique plus ou moins marqué selon les patients. Ce phénotype dysmorphique évolue avec l'âge du patient. Allanson *et al.* ont caractérisé ce phénomène de changement de phénotype dysmorphique « The Changing Phenotype ». Souvent marqués lors de la petite enfance jusqu'au début de l'adolescence, les signes dysmorphiques sont plus subtils à l'âge adulte, rendant ainsi le diagnostic plus difficile bien que certains individus adultes puissent conserver l'ensemble des caractères dysmorphiques (Figure 1).

Chez le nouveau-né SN, la dysmorphie faciale se caractérise par une tête large avec une petite face sous un large crâne, un front plus haut que la normale avec un rétrécissement au niveau des tempes. Dans 95% des cas, les yeux sont proéminents et très écartés (hypertélorisme), les paupières supérieures sont tombantes (ptosis), le nez est plutôt court et large et les oreilles sont orientées en rotation postérieure avec un hélix épais. Ce dernier trait, très présent, est conservé chez les patients SN quel que soit leur âge. Généralement, le cou est court avec un excès de peau au niveau de la nuque. L'implantation basse des cheveux concerne plus de la moitié des patients. Au niveau de la bouche, la lèvre supérieure a un philtrum assez marqué et le palais est souvent haut et arqué (45% des cas).

Chez le nourrisson SN, on retrouve certains signes observés chez le nouveau-né. La tête est large avec un front qui s'élève exagérément et les yeux sont encore proéminents avec

un hypertélorisme et des paupières épaisses. La racine du nez est déprimée avec une base large et une extrémité bulbeuse.

Au cours de l'enfance, le visage manque souvent d'expression. L'hypertélorisme et la position basse des oreilles en rotation postérieure sont conservés. Les traits du visage deviennent plus nets au cours de l'adolescence : le visage s'affine, la racine du nez est plus étroite et le pont est fin et haut avec une base large, les yeux deviennent moins proéminents. Une des caractéristiques du visage de l'adolescent est sa forme triangulaire avec un menton en pointe.

A l'âge adulte, les signes faciaux deviennent discrets. Cependant, quelques adultes conservent un ptosis, un hypertélorisme, des oreilles basses avec un hélix épais, en rotation postérieure et un large cou. Chez l'adulte âgé, la peau est fine et presque transparente, les plis nasolabiaux sont plus proéminents que ceux visibles chez les personnes âgées saines.

Ainsi, le paramètre « dysmorphie faciale » pour le diagnostic des patients SN peut s'avérer difficile à mesurer étant donnée la variabilité des différents signes qui la composent. Néanmoins, certains traits dysmorphiques sont conservés, comme l'hypertélorisme, des oreilles en position basse et en rotation postérieure et un large cou, et peuvent donc aider au diagnostic clinique (Allanson, 1987; Tartaglia et al., 2011).

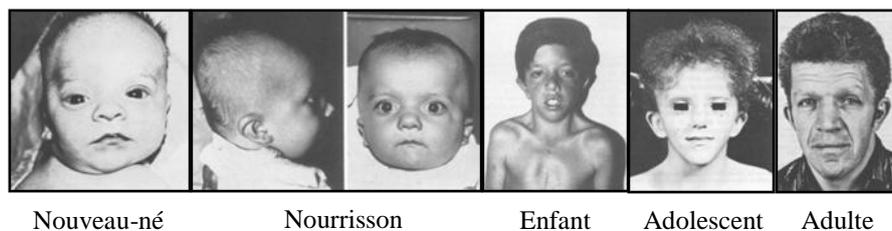


Figure 1 : Anomalies faciales observées chez les patients SN à différents âges: "The Changing Phenotype" (Allanson J.E., 1987).

2. Le retard de croissance

a) Aspects cliniques de la croissance post-natale dans le syndrome de Noonan

Le retard de croissance concerne plus de 80% des patients SN, constituant, avec les anomalies faciales et cardiaques, un des signes majeurs de l'expression de la maladie. Ainsi, en l'absence d'anomalie cardiaque, le retard de croissance est bien souvent ce qui amène à la consultation et au diagnostic du SN (Noonan, 1968). Nous allons donc nous intéresser dans cette partie aux critères de ce diagnostic du retard de croissance.

Généralités sur l'évaluation des paramètres de la croissance

Les anomalies de la croissance chez les patients SN sont identifiées en établissant une courbe de croissance par des mesures de leur taille au cours du temps et en la comparant avec une courbe de croissance de la population générale ou « courbe de référence ». Cette comparaison permet ainsi de détecter un retard statural éventuel.

Des courbes de croissance de référence ont été établies d'après la moyenne des tailles de la population générale. Au-dessus et en-dessous de cette courbe de référence, des courbes supplémentaires délimitent des « couloirs » qui tiennent compte de la variabilité de la taille au sein de la population générale. Lors d'un examen clinique, la mesure de la taille est notée dans un des couloirs et est comparée à la valeur de référence ; si la valeur se situe dans le premier couloir au dessus de la courbe de référence, on dit que la mesure de la taille dévie d'une unité supérieure ou +1 déviation standard (DS) par rapport à la moyenne, dans le deuxième couloir à +2 DS, etc. A l'inverse, si la valeur se situe dans le premier couloir en-dessous, la taille dévie de 1 unité inférieure à la moyenne ou -1 DS, dans le deuxième couloir -2 DS, etc (Figure 2).

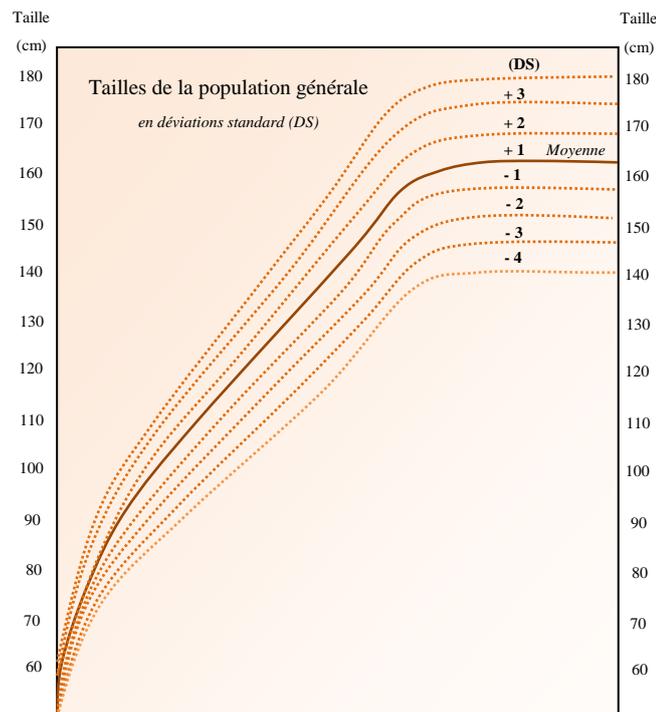


Figure 2 : Courbes de croissance de référence de la population générale (filles).

Les valeurs des tailles en déviations standards (DS) et en centimètres sont représentées. La moyenne des tailles est représentée par un trait plein. Les variations de la taille par rapport à la moyenne sont représentées par des traits discontinus.

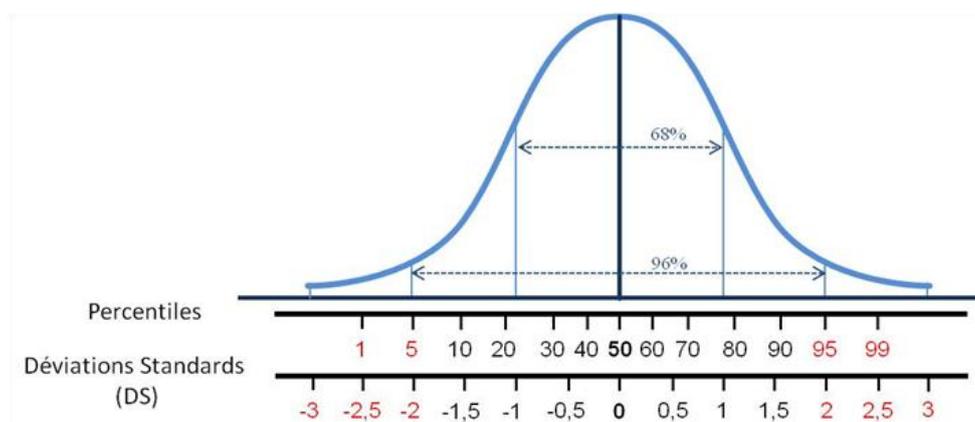


Figure 3 : Représentation schématique de la distribution des tailles dans la population générale et correspondance percentile-déviations standards

Distribution gaussienne des mesures de la taille dans la population générale. La médiane de la courbe correspond à la moyenne des tailles dans la population générale (50^{ème} percentile ou 0 DS). Toutes les valeurs des tailles supérieures à la moyenne représentent une distribution de 50% des individus, de même pour les valeurs des tailles inférieures. Environ 96% des individus ont une taille qui varie de -2,5 à +2,5 DS (du 1^{er} au 99^{ème} percentile). Les valeurs des tailles inférieures à -2 DS (5^{ème} percentile) ou supérieures +2 DS (95^{ème} percentile), considérées, respectivement, comme anormalement faibles ou élevées, sont représentées en rouge sur le schéma.

Les valeurs des tailles de la population générale suivent une distribution gaussienne, calculée par des tests statistiques. La moyenne de la distribution représente la moyenne des tailles des individus dans la population générale (0 DS). On considère donc que 50% des individus ont une taille supérieure ou inférieure à cette moyenne. D'un point de vue clinique, cette moyenne est appelée le 50^{ème} percentile (Figure 3).

A chaque courbe représentant une DS correspond une courbe en percentile. Ainsi, il est admis qu'une taille de -2 DS et une taille de +2 DS correspondent au 5^{ème} et 95^{ème} percentile, respectivement. La variabilité des tailles entre -2 DS et +2 DS représente 96% de la population générale. Les cliniciens considèrent qu'en dessous de -2 DS, la mesure de la taille est anormalement faible, et ce d'autant plus que le percentile est plus bas. De même, au dessus de + 2DS, la mesure est considérée comme anormalement élevée, et ce d'autant plus que le percentile est élevé.

b) Les anomalies de la croissance dans le SN

Les premières courbes de croissance au sein de la population des patients SN ont été établies et montrent un retard de croissance à l'âge de 2 ans et maintenu jusqu'à l'âge de 20 ans. Bien qu'un retard de croissance dès la naissance soit observé dans 10% des cas, dans 90% des cas les nouveau-nés SN présentent une taille moyenne et un poids moyen normaux, respectivement de 3182 g et 51,0 cm chez les garçons et de 3219 g et 51,1 cm chez les filles (Ranke et al., 1988; Witt et al., 1988). Pour ces patients, le retard statural se développe ensuite dans les premières années de vie, suggérant qu'il ne soit pas la conséquence d'un retard de croissance intra-utérin.

Ces premières courbes de croissance ont été enrichies grâce à l'accumulation de données cliniques. Ceci a permis d'élaborer de nouvelles courbes chez les garçons et chez les filles SN et ainsi constitue une référence de tailles au sein même de la population des patients SN (Romano et al., 2010) (Figure 4).

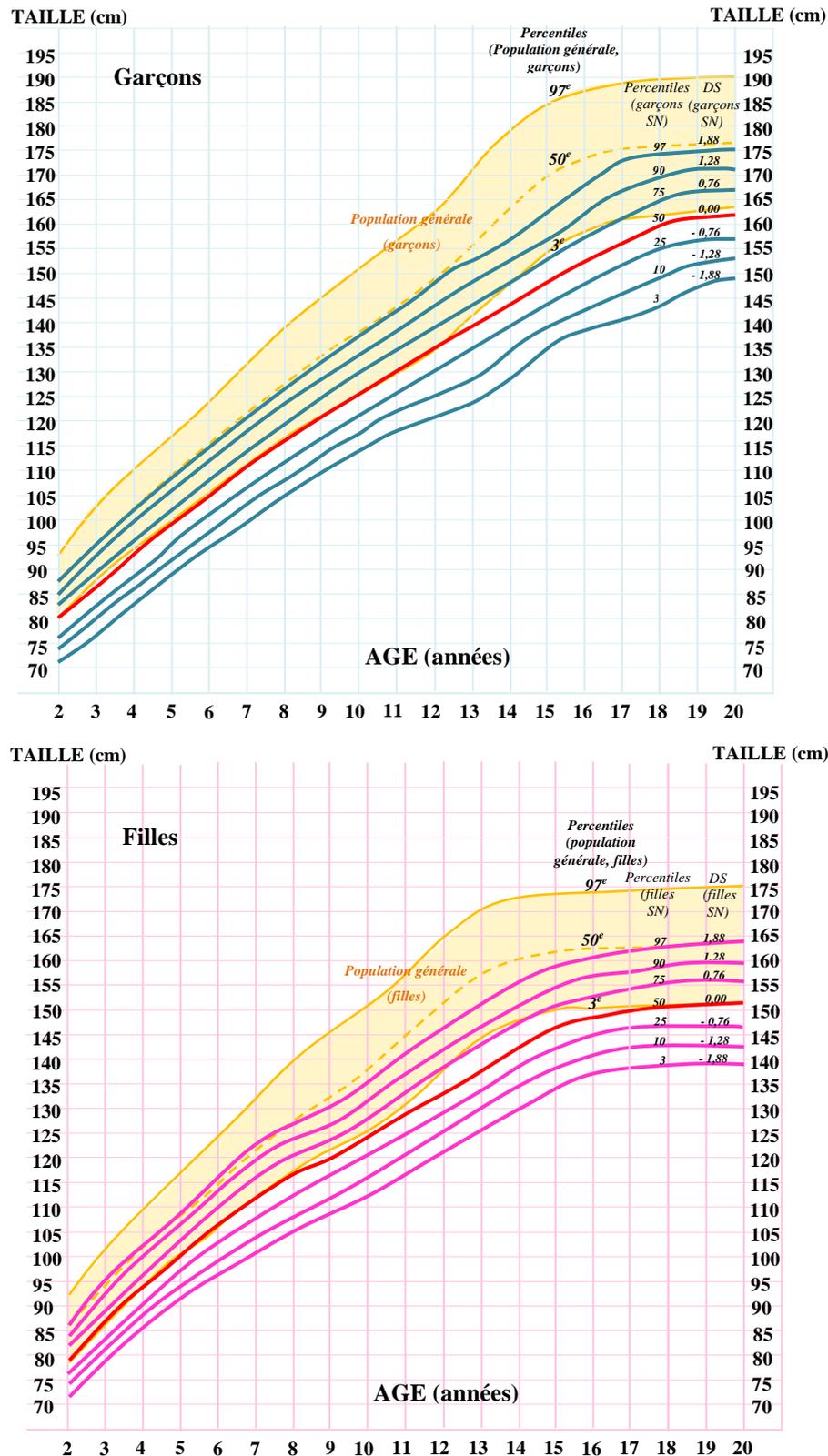


Figure 4 : Courbes de croissance des garçons et des filles atteints du SN (d’après (Ranke et al., 1988) et élaborées par Novo Nordisk selon la charte de croissance du SN)).

Les courbes de croissance des garçons SN panel supérieur (en bleu) et des filles, panel inférieur (en rose) sont représentées. La moyenne de leur taille est représentée par la courbe rouge. Ces courbes de croissance sont comparées aux courbes de référence modélisées par la zone orangée. Les valeurs des percentiles et des DS sont indiquées.

L'analyse de ces courbes montre que l'évolution de la croissance en période post-natale est globalement identique chez les garçons et chez les filles bien qu'elle soit décalée dans le temps. En moyenne, la courbe de croissance des patients SN suit le 3ème percentile de la population générale jusqu'à l'âge de 10 ans pour les filles et de 12 ans pour les garçons. A l'âge adulte, 54% des femmes et 38% des hommes conservent une taille inférieure au 3ème percentile. Dans cette étude, notons qu'environ 30% des femmes SN et des hommes SN ont une taille supérieure au 10ème percentile (Noonan et al., 2003; Ranke et al., 1988). Selon l'étude de Witt *et al*, la taille adulte finale est, en moyenne, de 150,5 cm pour les femmes (n=19) et de 161,0 cm pour les hommes (n=18). Ces données sont proches de celles observées dans une deuxième étude qui rapporte une taille adulte chez les femmes de 152,7 cm (n=18) et chez les hommes de 162,5 cm (n=20). Plus récemment, en 2007, Shaw *et al*. observent une taille finale de 152,7 cm (n=25) chez la femme et de 167,4 cm (n=18) chez l'homme (Ranke et al., 1988; Shaw et al., 2007; Witt et al., 1986). De ces études, il apparaît également qu'un tiers des adultes SN rattrapent leur retard statural, mais que pour plus de 50 % des femmes SN et 40% des hommes SN, un retard de croissance inférieur à -2 DS persiste (Figure 4).

Un paramètre supplémentaire, évalué secondairement aux mesures de la taille, est la vitesse de croissance (Figure 4). Chez les enfants sains, celle-ci est élevée dans les deux premières années de vie, puis diminue jusqu'au début de la puberté. A la puberté (10 ans pour les filles, 12 ans pour les garçons), la vitesse de croissance est fortement ré-augmentée d'où l'apparition d'un pic sur la courbe (Figure 5). Chez les patients SN, il apparaît que la vitesse de croissance ralentit jusqu'à l'âge de 12 ans pour les filles et de 14 ans pour les garçons. Ces patients ont donc un retard de croissance aggravé au moment de la puberté. En effet, ce ralentissement va conduire à un retard de l'apparition de la puberté de 2 ans en moyenne, et en conséquence, à une accélération plus tardive de leur vitesse de croissance. Ainsi, les patients SN vont acquérir leur taille adulte finale vers l'âge de 20 ans plutôt qu'à l'âge normal de 16-17 ans.

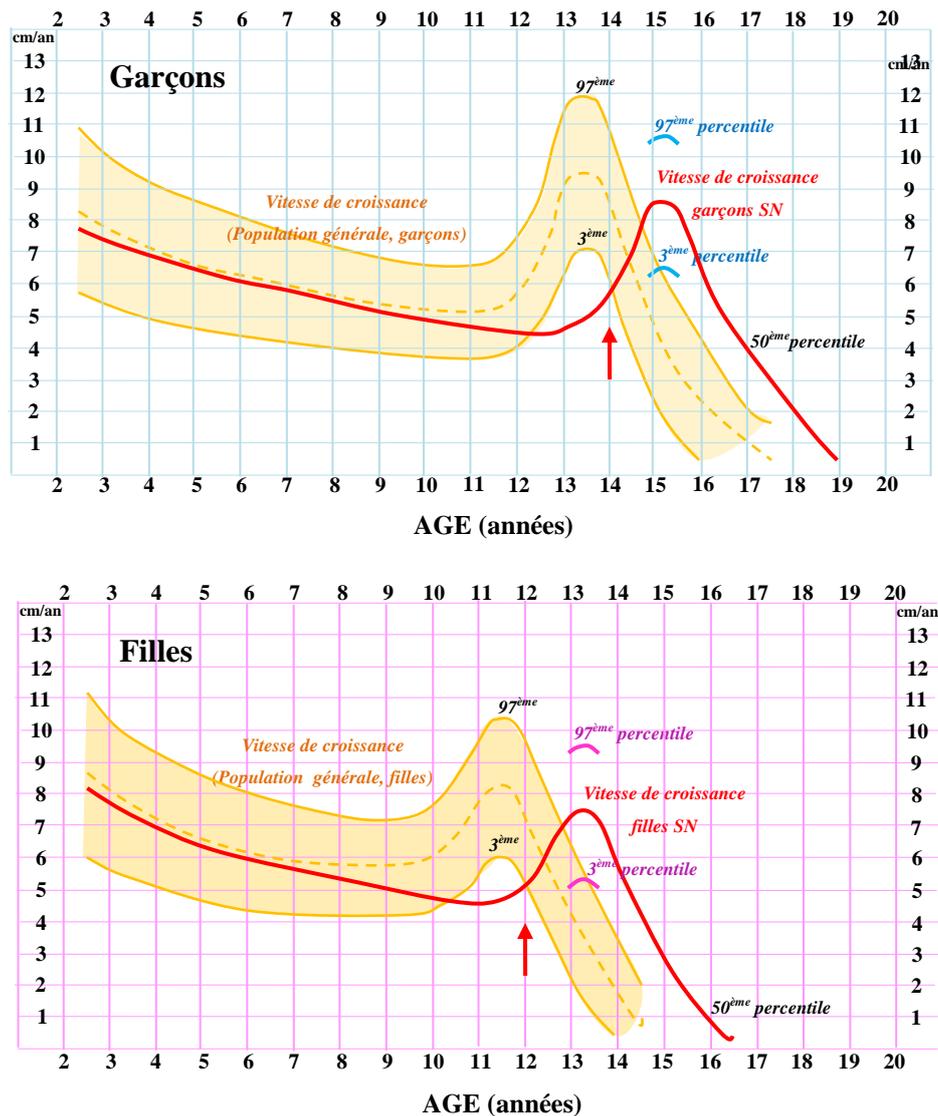


Figure 5 : Comparaison des vitesses de croissance des patients SN (en rouge) et de la population générale (orange) (d'après la charte de croissance du syndrome de Noonan élaborée par Novo Nordisk).

Les courbes de vitesse de croissance de la population générale sont modélisées par les couloirs orange. Les courbes rouges correspondent aux vitesses de croissance des garçons (panel supérieur) et des filles (panel inférieur). Le début de la puberté est représenté par la flèche rouge.

Pour évaluer le retard de croissance, des radiographies de la main sont également réalisées. Ces radiographies vont permettre de déterminer des points d'ossification du cartilage afin d'attribuer un âge osseux. L'âge osseux est identique à l'âge chronologique chez les patients sains alors que les patients SN ont un âge osseux plus jeune que leur âge chronologique suggérant d'un retard de croissance (Butler et al., 2000).

Il est à noter que le retard de la puberté a également des conséquences sur la fonction génitale des patients SN. Les filles SN ont généralement une ménarche retardée qui apparaît en moyenne vers l'âge de 14,6 ans, mais leur fertilité ne semble pas être atteinte. La majorité des garçons SN (75%) ont une cryptorchidie et/ou des anomalies hormonales comme des taux élevés d'hormones lutéinisantes et folliculo-stimulantes lors de la puberté et à l'âge adulte. Une faible quantité de liquide séminal chez les garçons a également été rapportée, suggérant une anomalie dans la spermatogénèse (Theintz and Savage, 1982). Ces différentes observations pourraient expliquer le problème de fertilité retrouvé chez la plupart des hommes SN.

c) Aspects hormonaux de la croissance post-natale dans le SN

Pour comprendre l'origine du retard de croissance observé chez les patients SN, des études hormonales ont été faites à la recherche d'anomalies notamment au sein de l'axe somatotrope, un élément essentiel au contrôle de la croissance.

L'axe somatotrope

L'axe somatotrope s'articule autour de plusieurs acteurs localisés dans différents tissus et organes. Au niveau de l'hypothalamus, les neurones hypothalamiques relarguent la Growth Hormone-releasing Hormone (GHRH), qui agit sur l'hypophyse antérieure (ou antéhypophyse) par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) spécifiques. Une fois activés, ces récepteurs induisent une transduction du signal intracellulaire visant à augmenter l'expression et la sécrétion de l'hormone de croissance (Growth Hormone, GH). Cette dernière est sécrétée de façon pulsatile et peut agir par l'activation de son récepteur (R-GH) directement sur ses tissus cibles, à savoir le foie, l'os, le muscle ou encore le tissu adipeux. Toutefois, la GH exerce la plupart de ses effets trophiques par l'intermédiaire de l'Insulin-like-Growth Factor-I (IGF-I). L'IGF-I est produit principalement par le foie (fonction endocrine) et par des tissus périphériques (fonction auto-paracrine) sous l'action de la GH. L'IGF-I est ensuite sécrété dans la circulation générale pour atteindre les organes impliqués dans la croissance longitudinale (os, muscle...).

Notons que l'IGF-I libre dans le sang est en très faible proportion (1%) car sa demi-vie est très courte (environ 10 min). Ainsi, la majorité d'IGF-I circulant est associée à des protéines de liaison, les IGF-Binding Protein (IGFBP) représentées par 6 isoformes (IGFBP, 1 à 6). Parmi elles, l'IGFBP-3 qui est elle-même associée à une sous-unité acide labile (Acid

Labile Subunit, ALS). Ce complexe ternaire (IGF1-IGFBP-ALS), de haut poids moléculaire, permet d'augmenter la demi-vie de l'IGF-I mais limite également sa biodisponibilité.

L'axe somatotrope peut être régulé négativement par l'intervention principalement de la somatostatine (Somatotropine Release Inhibiting Hormone, SRIH) qui inhibent la sécrétion de GH par l'hypophyse, ou encore par l'IGF-I lui-même qui, *via* une boucle de rétrocontrôle négative, freine la sécrétion de GHRH au niveau de l'hypothalamus. Une fine régulation de l'axe somatotrope est nécessaire, par le jeu d'une communication étroite entre les différents acteurs qui le composent, pour une croissance appropriée (M.C. Raux Demay, 2006) (Figure 6).

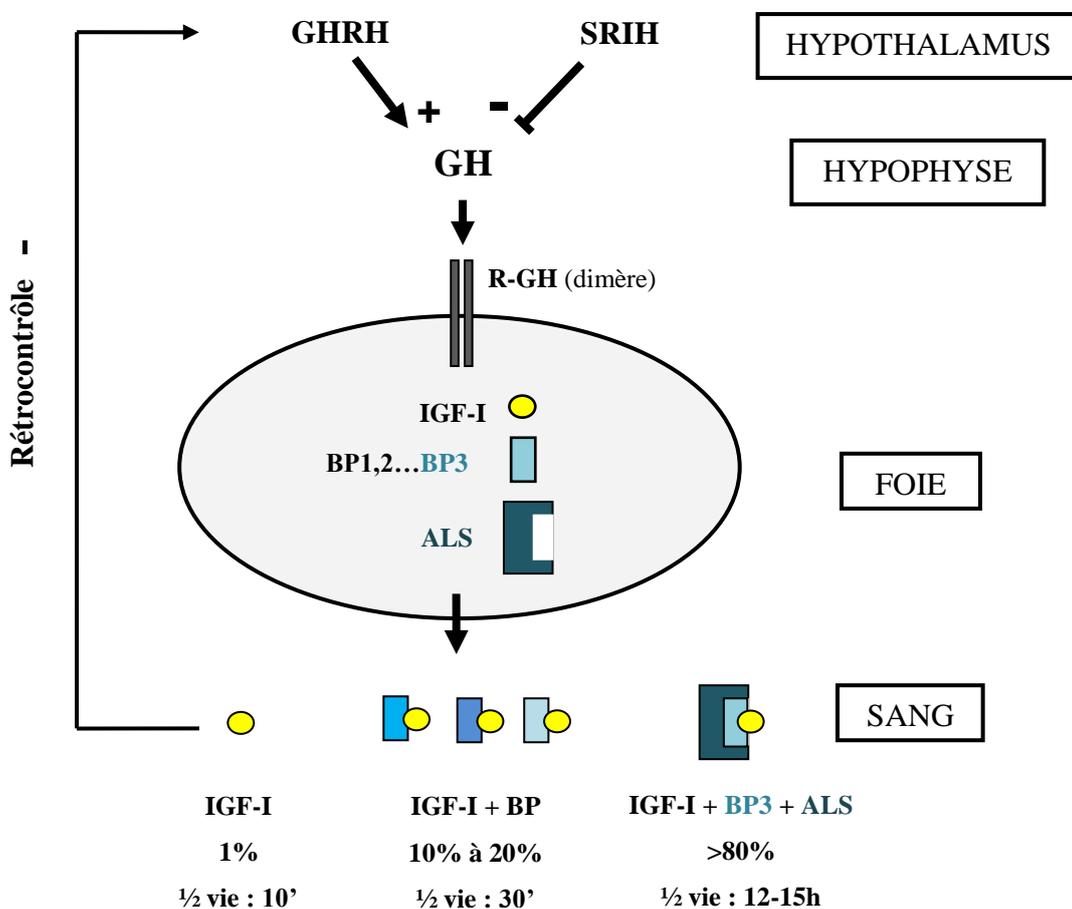


Figure 6 : Représentation schématique de l'axe somatotrope : son activation et sa régulation (d'après (M.C. Raux Demay, 2006)).

Anomalies de l'axe somatotrope dans le SN

Des dysfonctionnements de l'axe somatotrope à chacun des différents niveaux qui le composent (anomalies de sécrétion des différents hormones ou protéines de liaison, mutations des récepteurs, perte de rétrocontrôle, résistance, insensibilité hormonale, perturbation des signaux intracellulaires...) se traduit par des anomalies, positives ou négatives, de la croissance (Savage et al., 2010).

Certains de ces dysfonctionnements peuvent être identifiés par différents tests (M.C. Raux Demay, 2006). Ainsi, plusieurs auteurs ont pu identifier des taux circulants de GH dans le sang, normaux voire élevés à la suite de test de stimulation de GH (Binder et al., 2005b; Limal et al., 2006b). Concernant le profil hormonal d'IGF-I, les mesures des taux d'IGF-I ont révélé des valeurs anormalement basses, ou dans la limite inférieure lors de sécrétion spontanée. Ces différentes données suggèrent qu'il n'existe pas de déficit en GH (Growth hormone deficiency, GHD), mais que l'origine du retard de croissance serait plutôt en faveur d'une insensibilité partielle à GH (GH insensitivity, GHI) (Ahmed et al., 1991; Kirk et al., 2001; Noordam et al., 2001; Romano et al., 1996; Thomas and Stanhope, 1993). Cette GHI serait partielle comme le souligne la réponse au traitement par GH chez ces patients, que nous verrons ci-dessous.

Cependant, les dosages d'IGF-I restent encore controversés, ce qui ne permet pas actuellement de confirmer l'hypothèse d'une résistance à GH chez les patients SN. Par ailleurs, d'autres marqueurs de la croissance pourraient être modifiés chez ces patients. En effet, des études ont montré un dosage d'ALS relativement bas chez les SN alors que les taux d'IGFBP-3 semblaient être normaux (Binder et al., 2005b; Limal et al., 2006b).

3. Traitement pharmacologique du retard statural dans le syndrome de Noonan

Le traitement pharmacologique actuel dans le retard de la croissance chez les patients SN est l'injection de GH humaine recombinante (GHRh), avec des doses de GH selon les études de 0,05 à 0,066 mg/kg/j. Ces doses de GH sont plus importantes que celles administrées dans les GHD pour tenter de contrecarrer l'insensibilité partielle à la GH. Les premières études s'intéressant à l'effet du traitement de GH chez les patients SN ont été réalisées et ont mis en évidence une augmentation significative de leur vitesse de croissance (Ahmed et al., 1991; Kirk et al., 2001; MacFarlane et al., 2001; Municchi et al., 1995; Noordam et al., 2001). Cependant, ces recherches ont été réalisées sur un faible nombre de

patients, et sur des cohortes de patients dont l'âge est souvent variable. Elles ne rendent pas non plus compte de l'effet significatif du traitement à long terme sur la taille finale.

Ainsi, plusieurs études concernant un nombre de patients plus important et un traitement prolongé d'au moins 3 ans ont été réalisées avec des résultats encourageants (Tableau 1).

Nombre de patients (filles)	Age moyen début traitement	Taille en DS avant traitement	Durée moyenne du traitement GH (années)	Gain de taille DS	Gain de taille (cm)	Références
10 (4)	12	-3,1 /-0,7)	5,3	ND	3,1	(Kirk et al., 2001)
18 (11)	8,6 garçons 7,7 filles	-2,9 (-0,3)	7,5	1,7	13 cm (garçons), 9,8 cm (filles)	(Osio et al., 2005)
24 (ND)	10,2	-3,24	7,59	0,61 (0,97)	ND	(Raaijmakers et al., 2008)
29 (8)	11	-2,8 (0,0)	6,4	1,3 (1,3)	9,5 cm (garçons), 9,0 cm (filles)	(Noordam et al., 2008b)
65 (30)	11,6	-3,5	5,6	1,4	10,9 cm (garçons), 9,2 cm (filles)	(Romano et al., 2010)

Tableau 1 : Efficacité du traitement par la GHRh dans des cohortes de patients SN.

Les déviations standards (DS) des tailles des patients SN sont calculées par rapport aux valeurs des DS de la population générale. La correspondance de ces DS calculée par rapport à celles des patients SN de référence est représentée entre parenthèse. ND : non déterminé.

D'après ces différentes études, il apparaît que la durée et l'âge du début du traitement sont deux paramètres qui pourraient influencer le gain de taille final. Ainsi, le gain de taille est en moyenne de 1,3 à 1,7 DS soit 9,5 à 13 cm pour les garçons et de 9,0 à 9,8 cm pour les filles. L'augmentation de taille semble plus importante au cours des premières années de traitement. Après 3 et 4 ans de traitement, il n'existe plus de rattrapage mais le gain de taille obtenu est maintenu jusqu'au démarrage de la puberté ou jusqu'à la taille finale adulte (Noordam et al., 2008b; Osio et al., 2005; Romano et al., 2010). Bien qu'encourageants ces traitements pourront certainement être optimisés dans la mesure où ces études ont été réalisées sur des patients aux âges variables et à des doses différentes de GHRh et qu'il est établi que la réponse au traitement varie en fonction du démarrage et de la durée du traitement avant l'âge de la puberté.

D'un point de vue hormonal, il existe une augmentation significative des taux d'IGF-I (de -1,6 DS à +0,3 DS) après un an de traitement par la GH (Ahmed et al., 1991; Limal et al., 2006b). La réponse au traitement est dose dépendante et ne semble pas être liée aux données de la sécrétion de GH avant le traitement pharmacologique (Noordam et al., 2001).

4. Hypothèses physiopathologiques du retard de croissance dans le syndrome de Noonan

D'après les dysfonctionnements de l'axe somatotrope observés et les effets du traitement pharmacologique par la GHRh, plusieurs hypothèses quant à l'origine du retard de croissance chez les patients SN peuvent être émises.

Compte-tenu de l'association de taux normaux de GH à des taux d'IGF-I bas, évocateurs d'une GHI, l'hypothèse d'une résistance à la GH a été proposée. Cette résistance pourrait être « post récepteur », aucune mutation du récepteur de GH (R-GH) n'ayant été décrite chez les patients SN. De plus, une réponse au traitement par la GHRh étant retrouvée, cette résistance serait partielle et pourrait être spécifique de l'IGF-I et de l'ALS. Cependant, les taux normaux d'IGFBP-3 retrouvés chez les patients SN, et l'élévation des taux d'IGF-I sous traitement par GHRh pourraient refléter une anomalie hypothalamo-hypophysaire de type dysfonction neurosécrétoire. Enfin, une anomalie localisée au niveau de la plaque de croissance est également possible. Aussi, l'étude d'anomalies post-récepteur a fait l'objet de ce travail de thèse (voir annexe 1).

C. Les cardiopathies

Un trait phénotypique majeur du SN est représenté par le développement de différentes cardiopathies pouvant être sévères. En effet, des anomalies musculaires ou de structure du cœur sont retrouvées selon les études chez 65 à 85% des patients atteints de SN. Les électrocardiogrammes (ECG) des patients SN montrent de larges complexes QRS avec des ondes négatives dans les aires précordiales gauches (62%), une déviation axiale (80%) et des ondes a géantes qui reflètent typiquement la présence d'anomalies cardiaques (Allanson, 1987; Sznajer et al., 2007; van der Burgt, 2007).

La cardiopathie congénitale la plus typique est une sténose de la valve pulmonaire à valves dysplasiques retrouvée dans 40 à 70% des cas. Cette anomalie peut être isolée ou associée à d'autres défauts cardiaques (défaut du septum atrial, dysplasie étendue de l'artère et de ses branches, sténose supra-valvulaire, réaction infundibulaire hypertrophique sévère). Pour certains patients, une valvuloplastie est pratiquée et dans d'autres cas une dilatation percutanée au ballonnet peut être proposée (Hulselmans and Benit, 2010). Toutefois, le suivi à long terme des patients atteints de SN montre que 58% des patients ayant une sténose de la valve pulmonaire ne nécessitent pas d'intervention chirurgicale (Shaw et al., 2007).

Une hypertrophie cardiomyocytaire (HCM) peut également se développer, représentée dans 20% des cas (Hickey et al., 2011; Marino et al., 1999; Shaw et al., 2007; van der Burgt, 2007), ce qui en fait la deuxième cardiopathie la plus fréquente dans le SN. L’HCM peut se déclarer dès l’enfance et sa progression peut être rapide conduisant à une mort subite. Si l’HCM se déclare après l’enfance, elle peut s’améliorer, être stable ou encore progresser rapidement. Le traitement peut être médicamenteux par l’utilisation de β -bloquants ou encore chirurgical par une myomectomie afin de réduire l’obstruction de sortie du sang (Sarkozy et al., 2008). On observe une communication inter-atriale (CIA) dans 10 à 25% des cas, une communication inter-ventriculaire (CIV) dans 5% des cas et un canal artériel persistant dans 3% des cas. D’autres anomalies cardiaques extrêmement variées peuvent être associées au SN (Allanson, 1987; Altamirano and Drut, 2010; Sznajder et al., 2007; van der Burgt, 2007) (Tableau 2). Compte tenu de la fréquence élevée et de la diversité des atteintes cardiaques observées dans le SN, un bilan comprenant au minimum un ECG et une échographie doivent être réalisés chez tous les patients pour lesquels un SN est suspecté.

Cardiopathies chez le SN	Fréquence
Sténose de la valve pulmonaire à valve dysplasique	40-70%
Hypertrophie cardiomyocytaire (HCM)	9-20%
Communication inter-atriale (CIA)	10 à 25%
communication inter-ventriculaire (CIV)	5% des cas
canal artériel persistant	3% des cas
canal atrio-ventriculaire (CAV)	-
Défauts du septum atrial	-
Coarctation aortique	-
Troubles du rythme et de la conduction	-
Prolapsus de la valve mitrale	-
Tétralogie de Fallot	-
Dysplasie valvulaire aortique	-
Cardiopathie ventriculaire arrhythmogénique	-

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes cardiopathies et leurs fréquences d’apparition dans le SN.

D. Description des autres anomalies phénotypiques du syndrome de Noonan

1. Anomalies hématologiques

a) Troubles de l'hémostase

Des anomalies hématologiques sont décrites dans le SN mais leurs fréquences varient considérablement selon les études. Les enfants SN ont fréquemment des contusions et des saignements. Le temps de saignement lors de simples coupures, d'extraction de dents, d'écoulement par le nez ou encore de ménorragies est augmenté suggérant un défaut de coagulation (Patrick and Makris, 2010; Witt et al., 1988). Dans ce sens, des études sur le dosage des facteurs de la coagulation du sang ont révélé un déficit en facteur XI (anomalie la plus fréquente), en facteur VIII, en facteur XIII, une thrombopénie ou encore des troubles de la fonction plaquettaire. Ces anomalies se manifestent de façon isolée ou combinée, mais il n'existe pas de corrélation entre la tendance aux saignements et les tests de coagulation chez les patients SN (Derbent et al., 2010; Massarano et al., 1996; van der Burgt, 2007). Même si le risque d'hémorragies sévères lors d'interventions chirurgicales n'est que de 3%, une prise en compte préalable de ces troubles hémostatiques par les cliniciens est nécessaire avant toute intervention invasive pour assurer une prise en charge optimale pour le patient.

b) Risques hémato-oncologiques

Les risques de développer des complications hémato-oncologiques sont élevés dans l'enfance. Entre 26 et 51% des enfants ont un volume du foie et/ou de la rate augmenté (hépato/splénomégalie). De plus, un syndrome myéloprolifératif peut être observé, qui peut soit régresser spontanément, soit évoluer vers une leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ) ou encore vers une leucémie lymphoblastique aigüe (LLA) (Bader-Meunier et al., 1997; Bastida et al., 2011; van der Burgt, 2007). La fréquence de développer une LMMJ est de 1% des cas SN, ce qui les prédispose à ce type de cancer. Ces patients nécessitent donc une surveillance clinique, particulièrement dans l'enfance. D'autres anomalies hématologiques, plutôt modérées, sont retrouvées comme une thrombocytopénie et une splénomégalie dans les premiers mois de vie (Kratz et al., 2011).

2. Anomalies du développement psychomoteur

Les enfants SN présentent un retard modéré des acquisitions motrices dans 26% des cas qui pourrait être attribué à une hypotonie présente dès la petite enfance. L'acquisition de la tenue assise, de la marche seule et l'apprentissage du langage sont retardés. Le plus

souvent, les enfants SN ont des troubles de l'articulation (72%). Bien que la majorité des enfants suivent une scolarité normale, d'autres nécessitent un soutien éducatif, qui est indispensable dans 10% des cas à cause d'un retard des apprentissages. Le niveau d'intelligence de la majorité des cas SN se situe dans les limites normales (normes basses) avec un quotient intellectuel (QI) global moyen de 85. Un retard mental habituellement léger est observé dans 15 à 35% des cas. En moyenne, un enfant SN sur deux a des troubles du comportement dont l'irritabilité, la maladresse, l'opposition ou encore la nervosité, et des difficultés sociales et de communication, des troubles de l'attention et des troubles de l'humeur ont été rapportés (van der Burgt et al., 1999).

3. Autres anomalies

Des anomalies osseuses sont également présentes et se manifestent principalement par des malformations du thorax avec un enfoncement (*pectus excavatum*) ou une protubérance (*pectus carinatum*) du sternum pour près de 70% des patients SN. Un patient sur deux présente un *cubitus valgus* et/ou une hypermobilité articulaire. D'autres problèmes osseux comme la présence d'une scoliose, des pieds en forme *varus equin* peuvent être observés mais moins fréquemment que les anomalies osseuses précédemment citées. Des anomalies de l'appareil uro-génital peuvent apparaître particulièrement au niveau du tractus urinaire. Elles se présentent sous la forme d'une sténose pyélo-urétérale et/ou hydronéphrose (10% des cas). Des anomalies lymphatiques sont représentées par des lymphoedèmes et des lymphangiectasies (20%). La peau peut présenter des anomalies telles que des naevi (25%) et moins fréquemment, des taches café-au-lait et lentigines qui ne concernent que 10% et 3% des patients respectivement. Leurs cheveux sont souvent fins (30%) et éparses (10%) (Allanson, 1987; Tartaglia et al., 2011). Récemment, des problèmes oculaires ont été décrits, avec une proéminence des nerfs de la cornée et des modifications du fond de l'œil associées principalement à une forte myopie (da Rocha Pitta Marin et al., 2011).

E. Le diagnostic clinique du syndrome de Noonan

Avant les découvertes de la biologie moléculaire et en l'absence de marqueurs biologiques, le diagnostic du SN était purement clinique. Cependant, l'établissement de son diagnostic est difficile en raison notamment de son large spectre phénotypique et de la variabilité d'expression, selon l'âge du patient, d'un de ses traits les plus caractéristiques, la dysmorphie faciale. Les cliniciens ont donc établi des scores cliniques pour faciliter le diagnostic. Duncan *et al.*, ont proposé un premier système de score, constitué de plusieurs

items séparés en catégories distinctes évaluant les éléments cliniques principaux (taille, poids, retard mental et histoire familiale), la dysmorphie faciale, les anomalies squelettiques, les caractéristiques sexuelles (l'âge de la ménarche, présence ou non d'une cryptorchidie) et enfin l'atteinte cardiaque avec l'analyse d'un électrocardiogramme. Ainsi, le diagnostic SN est posé pour un score supérieur ou égal à 60% (Duncan et al., 1981). La probabilité de présence de la maladie reste élevée pour un score supérieur ou égal à 50%. En pratique, ce score s'avère complexe et trop détaillé pour permettre une utilisation courante.

Pour simplifier ce premier système de scores, van der Burgt *et al* ont élaboré un score clinique basé sur 6 critères. Il tient compte notamment du type de la dysmorphie faciale, qui doit être évalué par un spécialiste, et de la présence ou non d'une cardiopathie et d'un retard de croissance, symptômes majeurs de ce syndrome (van der Burgt et al., 1994) (Tableau 3).

Signes cliniques	A. Majeurs	B. Mineurs
1. Dysmorphie faciale	Typique	Evocatrice
2. Cardiopathie	Sténose de la valve pulmonaire, Cardiomyopathie hypertrophique	Autres défauts cardiaques
3. Taille	< 3 ^{ème} percentile	< 10 ^{ème} percentile
4. Thorax	Pectus carinatum/excavatum	Thorax large
5. Histoire familiale	1 ^{er} degré : SN défini	1 ^{er} degré : SN suggestif
6. Autres	Retard mental modéré, cryptorchidie et dysplasie lymphatique	Retard mental modéré, cryptorchidie ou dysplasie lymphatique

Tableau 3: Critères de diagnostic du syndrome de Noonan (van der Burgt et al., 1994)

Le diagnostic du syndrome de Noonan est posé si le patient présente :

- Une dysmorphie faciale typique (critère 1A) avec 1 signe 2A-6A ou 2 signes 2B-6B
- Une dysmorphie faciale évocatrice (critère 1B) avec 2 signes 2A-6A ou 3 signes 2B-6B

Cependant, ce score ne tient pas compte des signes cliniques pouvant apparaître lors de la période prénatale. En effet, une augmentation de la clarté nucale, en association avec un défaut cardiaque, un polyhydroamnios et/ou des épanchements peuvent aider au diagnostic précoce chez le fœtus comme l'ont proposé plusieurs auteurs (Houweling et al., 2010; Pergament et al., 2011; Schluter et al., 2005). Dans ce cas, un examen clinique des parents est souvent indiqué pour retrouver des signes évocateurs du syndrome (Baldassarre et al., 2011; van der Burgt, 2007).

II. Description clinique des syndromes apparentés au syndrome de Noonan

A. Le syndrome L.E.O.P.A.R.D.

1. Généralités

Le syndrome L.E.O.P.A.R.D. (SL) est une maladie génétique à transmission autosomique dominante, associant de multiples anomalies congénitales, principalement cutanées, faciales et cardiaques. Contrairement au SN, le SL est une maladie rare dont la prévalence reste inconnue à ce jour avec seulement 200 patients répertoriés dans le monde (Sarkozy et al., 2008).

Le SL a été décrit pour la toute première fois par Zeisler et Becker, en 1936, sur l'observation d'une jeune femme présentant un hypertélorisme, un *pectus carinatum* et une prognathie (Zeisler, Becker, 1936). Des premiers cas familiaux ont été rapportés dans les années 50 avec l'association de défauts cardiovasculaires et une pigmentation anormale d'une part et d'anomalies cardiaques avec un retard de croissance d'autre part. C'est en 1969, que Gorlin *et al.*, proposent l'acronyme L.E.O.P.A.R.D. rappelant les signes cliniques les plus fréquents que sont : « **L**entigines multiples », « **E**lectrocardiographic conduction abnormalities », « **O**ccular hypertelorism, **P**ulmonary stenosis », « **A**bnormalities of genitalia », « **R**etardation of growth », « sensorineural **D**eafness » (Gorlin et al., 1969).

D'un point de vue morphologique, le SL partage plusieurs traits phénotypiques avec le SN, que nous décrivons un peu plus loin, mais s'en distingue principalement par l'existence d'anomalies cutanées appelées des lentigines multiples et par la présence d'une surdité.

2. Spécificités et triade phénotypiques du syndrome L.E.O.P.A.R.D.

a) Anomalies cutanées et surdité

Les anomalies cutanées sont souvent absentes à la naissance ce qui rend le diagnostic clinique difficile pendant les premiers mois de vie (Sarkozy et al., 2008). En effet, lorsque le diagnostic génétique n'était pas possible, les cas de SL étaient confondus avec le SN tant que les lentigines n'apparaissaient pas. Ces anomalies cutanées sont localisées principalement au niveau du visage, du cou et de la partie supérieure du tronc. Des taches sur la peau dites « café-au-lait » sont présentes chez la moitié des patients. Néanmoins, les lentigines restent un

problème esthétique car une seule transformation maligne a été rapportée à ce jour (Kim et al., 2011; Seishima et al., 2007) (Figure 7).

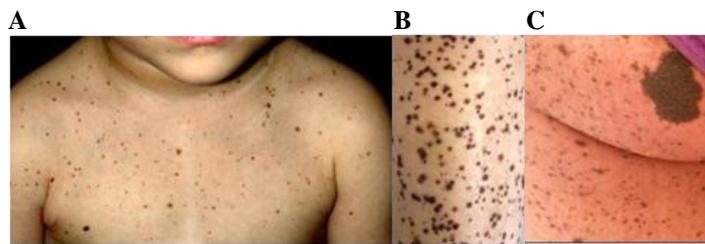


Figure 7 : Lentiginos multiples dans le syndrome de L.E.O.P.A.R.D (Maroun et al., 2000).
De nombreuses lentiginos sont situées sur le haut du tronc principalement (A), sur les jambes (B). Les lentiginos peuvent être présentes sous la forme dite de «tâches café-au-lait» (C).

Une deuxième caractéristique qui différencie le SL du SN est une surdité d'origine neuro-sensorielle, diagnostiquée à la naissance ou pendant l'enfance mais pouvant se manifester plus tardivement (15-25%) ce qui complique l'identification du SL pour ces patients (Sarkozy et al., 2004).

b) La dysmorphie faciale

Comme pour le SN, la dysmorphie faciale chez les patients SL évolue avec l'âge. Les traits phénotypiques du faciès les plus caractéristiques sont retrouvés pendant l'enfance. Les enfants atteints du SL ont un hypertélorisme, un nez avec une racine plate dans 87% des cas, des oreilles dysplasiques et une mandibule souvent en prognathie. Avec une moindre fréquence par rapport au SN, d'autres signes cliniques tels qu'un ptosis, des lèvres épaisses, des oreilles basses en rotation postérieure décollées avec un hélix épais, ou encore un *pterygium colli*, sont retrouvés (Figure 8).



Figure 8 : Signes dysmorphiques dans le syndrome L.E.O.P.A.R.D. (Ranke et al., 1988).
Noter le cou court, l'hypertélorisme, les oreilles basses et les lentiginos sur le visage et le haut du torse constituant les principales caractéristiques des patients SL.

c) Retard de croissance

A ce jour, peu d'études sur le suivi de la croissance des patients SL ont été rapportées. Cependant, d'après Digilio *et al.*, la plupart des nouveau-nés SL ont des mensurations de naissance normales, comme les nouveau-nés SN. Néanmoins, un tiers des patients analysé dans cette étude présente un poids de naissance supérieur au 97^{ème} percentile. Lors de la croissance post-natale, un ralentissement de la vitesse de croissance est observé, ce qui a pour conséquence une taille inférieure au 3^{ème} percentile, dans 25% des cas. Quelques études ont estimé une taille finale à l'âge adulte inférieure au 25^{ème} percentile pour 85% des patients SL. Ainsi, le retard statural chez les patients SL serait moins fréquent et moins développé que chez les patients SN (Coppin and Temple, 1997; Digilio *et al.*, 2006).

d) Les cardiopathies

Comme pour le SN, 80% des patients SL présentent des anomalies cardiaques. Mais la fréquence des différentes cardiopathies n'est pas représentée de la même façon que dans le SN. En effet, une HCM est retrouvée chez 80% des patients tandis qu'une sténose de la valve pulmonaire est développée par 20% des patients (Sarkozy *et al.*, 2004; Sarkozy *et al.*, 2008).

L'HCM est en général asymétrique impliquant le ventricule gauche et associée à une obstruction artérielle perturbant l'éjection du flux sanguin du ventricule gauche, présente chez 40% des patients SL. L'HCM se manifeste le plus souvent entre 7 et 14 ans, lors de la deuxième enfance, mais elle peut être aussi congénitale. L'HCM peut avoir des conséquences fatales pour le patients, des cas de mort subite et d'arrêts cardiaques ayant été rapportés (Digilio *et al.*, 2006; Limongelli *et al.*, 2007; Limongelli *et al.*, 2008; Woywodt *et al.*, 1998).

Les patients SL peuvent développer d'autres anomalies cardiaques mais avec une fréquence relativement plus faible voire rare, comme des prolapsus de la valve mitrale, des anomalies septales, des anomalies de l'artère coronaire, un élargissement du ventricule gauche ou encore un anévrisme apical et une non-compaction du ventricule gauche. Afin de diagnostiquer la plupart de ces anomalies cardiaques, des ECG sont réalisés chez les patients. Ainsi, plus de 70% des patients SL ont un ECG anormal révélant une dysfonction cardiaque en rapport avec l'HCM. Pour d'autres patients (23%), ce sont plutôt des troubles de la conduction qui sont observés (Limongelli *et al.*, 2007).

3. Autres anomalies

D'autres traits phénotypiques non désignés par l'acronyme L.E.O.P.A.D. sont retrouvés chez les patients. Des anomalies thoraciques sont observées chez les nouveau-nés SL (75%), essentiellement des *pectus carinatum ou excavatum*; ainsi que d'autres malformations squelettiques (scolioses, hyperlaxité articulaire) (Digilio et al., 2006). Au niveau de l'appareil génital, 50% des garçons développent une cryptorchidie et des hypoplasies génitales de même que des hypospadias (ouverture de l'urètre dans la face inférieure du pénis) ont été décrites. Ces anomalies pourraient expliquer une réduction de la fertilité masculine. Les filles ont principalement un retard de la puberté associé à des ovaires hypoplasiques. Des anomalies rénales sont également décrites (Sarkozy et al., 2008). Sur le plan neurologique, une hypotonie des membres à la naissance peut être présente et conduire à un retard du développement psychomoteur. Ainsi, les enfants SL ont des difficultés modérées dans l'apprentissage (30%) et les retards mentaux bien que décrits, restent rares (Digilio et al., 2006). Enfin, des cas de tumeurs hématologiques de type leucémies lymphoblastique aiguë (LLA) et myéloïde aiguë (LAM) ainsi que des cas de tumeurs solides (neuroblastomes, mélanome malin et une tumeur de la cornée) ont été également rapportés (Merks et al., 2005; Ucar et al., 2006).

4. Diagnostic clinique du syndrome L.E.O.P.A.R.D

Des critères de diagnostic ont été proposés par Voron *et al.*, en 1976, qui consistent en la présence de multiples lentigines et 2 des autres signes cliniques ou dans le cas d'absence de lentigines, l'association de 3 des autres signes cliniques du SL (Voron et al., 1976). Plus récemment, Digilio *et al.* proposent d'évoquer le diagnostic clinique SL dans les premiers mois de vie chez les patients présentant trois critères principaux: la dysmorphie faciale typique, une HCM et la présence de lentigines lorsque cela est possible. Parce que l'HCM et la présence de lentigines sont des signes cliniques importants pour le diagnostic du SL, leur évaluation précoce et un conseil génétique adapté contribuent à une rapide et meilleure prise en charge des patients (Digilio et al., 2006). Le retard statural, le développement moteur, les anomalies cardiaques et le déficit auditif des patients atteints de SL doivent être contrôlés chaque année. A l'exception des patients qui présentent une HCM, le pronostic à long terme des adultes atteints par le SL est bon (Sarkozy et al., 2008). Comme nous le verrons dans le chapitre II, ce diagnostic est à ce jour confirmé par un diagnostic moléculaire car des mutations responsables du SL ont été identifiées.

B. Le syndrome Cardio-Facio-Cutané

Le syndrome Cardio-facio-cutané (CFC) a été décrit en 1986 pour la première fois par Reynolds *et al.* (Reynolds *et al.*, 1986). La prévalence de cette maladie n'est pas définie à ce jour (Roberts *et al.*, 2006). Sa survenue est sporadique, très probablement liée à des mutations *de novo* dominantes. Un certain nombre d'éléments morphologiques sont identiques à ceux retrouvés dans le SN, particulièrement entre 5 et 6 ans. Ainsi, des critères cliniques spécifiques du CFC ont donc été proposés afin de faciliter le diagnostic vers le CFC et d'en différencier les formes légères et sévères (Grebe and Clericuzio, 2000; Kavamura *et al.*, 2002).

1. Spécificités et triade phénotypiques dans le CFC

Chez les enfants CFC, les signes faciaux sont plus marqués que chez les enfants SN. Leur visage est plutôt large, le front est haut, étroit et bossu. Certains patients ont un ptosis, un hypertélorisme ou encore un repliement vertical de la peau de la paupière supérieure vers le nez (épicanthus). Le nez est court avec une base large. Les oreilles sont basses implantées en rotation postérieure. A l'adolescence, le visage reste large et grossier contrairement au SN où l'on retrouvait un visage de forme triangulaire. Cependant, les signes faciaux sont difficiles à différencier du SN. De plus, les enfants ont des anomalies ectodermiques rendant les cheveux frisés et épars et une absence de sourcils (Roberts *et al.*, 2006) (Figure 9).



Figure 9 : Signes cliniques du syndrome Cardio-Facio-Cutané (Sarkozy *et al.*, 2008).

Patients atteints d'un syndrome CFC (A), (B) et (C). En (A), une patiente CFC à l'âge de 10 mois et 6 ans. Noter la dysmorphie faciale typique du CFC, des cheveux fins, frisés et épars, et l'absence de sourcils.

Le retard de croissance est une caractéristique majeure du CFC. Comme pour le SN, les mensurations à la naissance sont généralement normales. Il se manifeste en période post-natale chez environ 80% des patients, mais le retard statural dans le CFC est moins accentué que dans le SN. En effet, l'évolution de la croissance suit de près le 5^{ème} percentile sur la courbe de référence. Il est à noter que l'évolution de la croissance de la tête est anormale, si

bien que les enfants ont une macrocéphalie relative qui en fait une caractéristique de ce syndrome (Allanson et al., 2011; Grebe and Clericuzio, 2000).

Comme pour le SN, la fréquence des cardiopathies est élevée dans le CFC. Estimées à 75% des cas, elles se manifestent principalement par une sténose de la valve pulmonaire (45%) et une HCM (40%) et moins fréquemment par une CIA (23%). L'incidence de la sténose de la valve pulmonaire dans le CFC est plus faible que celle du SN, alors que l'incidence de la HCM en est plus importante (Roberts et al., 2006).

2. Autres anomalies

Le développement psychomoteur peut présenter des anomalies de pénétrance variable avec un retard mental léger à sévère, et des atteintes cognitives plus modérées que celles retrouvées dans le SN. De plus, le langage peut être retardé avec des difficultés d'apprentissage. Des anomalies du squelette (notamment un *pectus carinatum*, une scoliose), des problèmes ophtalmiques et autres anomalies plus mineures peuvent survenir dans le CFC (Grebe and Clericuzio, 2000; Nanda et al., 2004; Yoon et al., 2007).

La prise en charge des patients CFC est symptomatique et comprend une éducation spécialisée, un suivi orthophonique, une prise en charge dermatologique, cardiologique, gastro-entérologique, neurologique et ophtalmologique.

C. Le syndrome de Costello

Le syndrome de Costello (SC, MIM 214080) est une maladie sporadique rare, avec seulement 200 à 300 cas rapportés dans le monde. Le SC fut décrit par le Dr Costello pour la première fois en 1971 et de façon plus détaillé en 1977 (Costello, 1977). Dans ces études, les patients étaient décrits comme développant une dysmorphie cranio-faciale plus sévère que celle retrouvée dans le SN, associée à des anomalies de l'ectoderme (papillomes), un retard de croissance et un retard mental.

1. Spécificités et triade phénotypique du syndrome de Costello

Les traits de la face sont généralement plus grossiers que dans les autres syndromes NCFCs. Les enfants SC peuvent avoir un crâne large (macrocéphalie) avec un front bombé, un petit nez, une bouche plutôt grande avec des lèvres charnues et, parfois une grosse langue, des paupières tombantes et un léger strabisme. Le cou est relativement court avec un *pterygium colli*. Cette dysmorphie faciale est caractéristique pendant l'enfance, mais peut

devenir moins prononcée avec l'âge (Fryns et al., 1994). La peau est plissée au niveau du dos, des mains et des pieds avec des plis palmo-plantaires anormalement profonds et marqués (Delrue et al., 2002; Hennekam, 2003). Une des manifestations les plus caractéristiques du SC est la présence d'excroissances cutanées ou « papillomes » qui peuvent apparaître autour du nez, de la bouche et/ou de l'anus. Ces excroissances se développent entre 2 ans et la fin de l'adolescence, ce qui permet d'orienter le diagnostic vers un SC dans près de la moitié des patients SC. De plus, les enfants ont généralement des cheveux frisés et peu fournis (Figure 10).

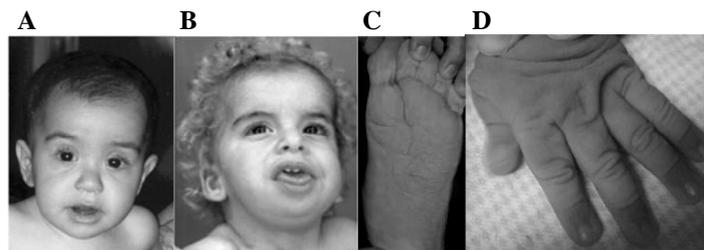


Figure 10 : Signes cliniques du syndrome de Costello (Sarkozy et al., 2004; Sarkozy et al., 2008)

(A) et (B): Faciès de deux enfants atteints du syndrome de Costello. Les traits du visage sont grossiers et marqués, les narines larges, les lèvres épaisses, les oreilles basses en position postérieure avec des lobes charnus repliés vers l'avant, les cheveux épars et frisés.

(C) et (D) : présence des plis marqués et profonds sur les pieds et sur les mains, respectivement).

Une deuxième caractéristique du SC est un risque élevé de développer des tumeurs malignes (15% des cas). Ces cancers se manifestent chez l'enfant par un rhabdomyosarcome ou un neuroblastome situés le plus souvent au niveau de l'abdomen (Ahmadi and Harley, 2010; Kratz et al., 2011). Parfois, les neuroblastomes sont localisés au niveau du thorax, et plus rarement, au niveau du cou. Chez les adolescents et les jeunes adultes, le risque de développer un cancer de la vessie est augmenté. Ces tumeurs de la vessie classiquement liées à l'adulte plus âgé, sont inhabituelles et ne sont pas retrouvées dans les autres NCFC ou dans d'autres syndromes génétiques de prédisposition tumorale comme le SN, ce qui en fait une caractéristique du SC (Gripp, 2005). Des protocoles de surveillance tumorale ont été proposés afin de prévenir la tumeur. Ils comprennent des échographies abdomino-pelviennes avec une recherche de la présence de sang dans les urines (hématurie) (DeBaun, 2002; Gripp, 2005; Gripp et al., 2002).

Concernant la croissance, à la naissance, les mensurations du nouveau-né sont dans 90% des cas supérieures à la normale avec un poids de naissance supérieur au 50^{ème} percentile et une taille au 90^{ème} percentile (Philip and Sigaudy, 1998). Cependant, les patients SC

deviennent rapidement plus petits et plus maigres que la moyenne, perdant «l'avance» qu'ils avaient à la naissance. Ainsi, à l'âge de 1 an, la taille et le poids n'atteignent pas le 3^{ème} percentile. Ceci s'explique probablement par un problème de contrôle de la déglutition et par une souplesse excessive locale des tissus du pharynx (Lin et al., 2002). Malgré le recours à la nutrition parentérale, le retard de croissance est maintenu jusqu'à la taille finale. A l'âge adulte, les patients ont une taille en moyenne de 137 cm pour les filles et 142 cm pour les garçons (Gripp, Lin *et al.*, 2005). Ainsi, le retard de croissance chez les patients SC s'installe plus tôt et est plus sévère que celui retrouvé chez les patients SN.

Les problèmes cardiaques sont souvent observés dans le SC car ils touchent entre 60 et 75% des patients. La cardiopathie la plus fréquente (34% des cas) est l'HCM. De façon moins fréquente, des sténoses de la valve pulmonaire sont observées et des troubles du rythme cardiaque (tachycardie atriale) sont également présents (Laux et al., 2011; Lin et al., 2011). Ces différentes anomalies peuvent menacer le pronostic vital du patient SC. Ainsi, un suivi chez le cardiologue comportant au minimum une échographie et un ECG sur 24h sont recommandés pour tous les patients SC (Lin et al., 2002; Siwik et al., 1998).

2. Autres anomalies

Les patients SC présentent des altérations au niveau du développement se traduisant par un retard du langage, de la marche, acquise vers l'âge de 4 ans et un retard mental moyen à léger avec un QI moyen de 47 à 85 (Axelrad et al., 2011). Le système nerveux central peut présenter des anomalies telles qu'une malformation du cervelet (de type Arnold-Chiari), une hydrocéphalie, une atrophie cérébrale ou cérébelleuse. Il est à noter que la macrocrairie n'est pas rare et est souvent associée à un retard de fermeture de la fontanelle du crâne des nouveau-nés SC. Un retard de la puberté a été observé chez les garçons et les filles SC. Environ 10% des garçons ont une cryptorchidie et les filles peuvent présenter une aménorrhée (White et al., 2005).

Le diagnostic est établi à partir des symptômes que présente l'enfant : la papillomatose constituant la manifestation la plus caractéristique du SC. Etant donné son apparition plus tardive, dans certains cas, ce critère ne suffit pas pour poser le diagnostic précocement. D'autres critères sont pris en compte, notamment la dysmorphie faciale, les caractéristiques de la peau et les problèmes cardiaques. Néanmoins, le diagnostic est difficile à poser étant donné le chevauchement des symptômes du SC avec les autres syndromes NCFCs. Un test génétique est souvent indiqué pour aider au diagnostic.

D. La neurofibromatose de type I et le syndrome de Legius

La neurofibromatose de type I (NF-1) est une maladie génétique de transmission autosomique dominante dont la prévalence est estimée entre 1/3000 à 1/5000 selon les études. D'une manière générale, son phénotype est caractérisé par l'association de plusieurs anomalies, telles qu'une altération de la pigmentation de la peau par la présence de taches café-au-lait et des lentigines, des neurofibromes qui apparaissent dès la naissance ou plus tard jusqu'à la puberté, des nodules de Lisch au niveau de l'iris. On observe aussi une macrocéphalie, un gliome des voies optiques et une dysplasie osseuse (sur l'os sphénoïde). Les enfants NF-1 peuvent avoir un retard statural, des difficultés d'apprentissage, des problèmes de comportement et une atteinte intellectuelle avec un QI compris dans la fourchette inférieure (Jouhilahti et al., 2011). Dans certains cas, les symptômes de la NF-1 sont très proches du SN, on caractérise alors ces patients comme étant atteints d'un syndrome Noonan-NF-1 (Carey, 1998; Reig et al., 2011).

Le syndrome de Legius ou « NF1-like » est une maladie autosomique dominante qui partage de nombreuses caractéristiques avec la NF-1. Il se manifeste par des taches café-au-lait, des lentigines et une macrocéphalie. Néanmoins, il se distingue de la NF-1 par l'absence de neurofibromes, de nodules de Lisch ou de manifestations tumorales du système nerveux (Jouhilahti et al., 2011).

E. Les « NS-like »

Le SN peut se décliner sous différentes autres formes plus rares car peu décrites à ce jour, mais qui, avec l'identification de symptômes originaux, a conduit à la définition de nouveaux syndromes (Tartaglia et al., 2011).

- le SN-like avec perte anagène de cheveux (*SN-like with loose anagen hair*, SN-LAH) montre des signes cliniques ressemblant de près au SN. Les patients SN-LAH ont une taille réduite souvent associée à une déficience en GH, et des déficits cognitifs. Ils sont le plus souvent minces et ont une croissance lente des cheveux dans la phase anagène du développement du cheveu, principale caractéristique de ce syndrome. La majorité des patients montrent une perte des cheveux et une altération cutanée avec la présence d'eczéma et une tendance au prurit, des sourcils clairsemés et des ongles fins. Des anomalies cardiaques sont retrouvées comme une dysplasie de la valve mitrale et des défauts du septum qui sont plus fréquents que dans le SN (Cordeddu et al., 2009; Mazzanti et al., 2003).

-Un autre syndrome appelé « Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene, Cbl-mutation associated syndrome », a été récemment rapporté. Les patients ont un retard variable

dans le développement avec une croissance limitée, une dysmorphie faciale et des taches « café-au-lait ». Les patients ont une prédisposition aux tumeurs de type LMMJ pendant l'enfance (Martinelli et al., 2010).

III. Conclusion

Le syndrome de Noonan et ses syndromes apparentés sont donc des maladies du développement qui se caractérisent par un ensemble de traits phénotypiques complexes, associant, avec une pénétrance variable, une triade commune (dysmorphie faciale, cardiopathie, retard de croissance) avec de multiples autres anomalies (Tableau 4). Ces phénotypes étant relativement proches et l'existence de symptômes identiques entre les syndromes dans certains cas font que les analyses cliniques peuvent ne pas suffire à établir un diagnostic fiable. Comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, la mise en place d'outils moléculaires et l'identification de mutations sur différents gènes responsables des syndromes NCFC permettent maintenant de faciliter le diagnostic clinique et d'améliorer la prise en charge des patients.

Syndrome	Incidence	Principales caractéristiques
Syndrome de Noonan (SN)	1/1000-1/2500	Dysmorphie faciale (hypertélorisme, ptosis, oreilles basses en orientation postérieure, <i>pterygium colli</i>) Retard de croissance (80%) taille <3 ^{ème} percentile Mauvaise prise pondérale dans la petite enfance (75%) Retard pubertaire Cardiopathies congénitales : sténose de la valve pulmonaire (40-70%), HCM (9-20%), CIA (6-10%), CIV (5%), anomalies de l'ECG (60%) Hépatosplénomégalie (20-30), syndrome myéloprolifératif (1%), LMMJ (<1%), LLA, anomalies de la coagulation Retards de l'acquisition motrice (25%), du langage (20%), de l'apprentissage (25%), troubles du comportement (hyperactivité, diminution de l'attention), retard mental (15-35%). Déformations osseuses : <i>pectus excavatum</i> et/ou <i>carinatum</i> (70%), cubitus valgus (50%), hypermobilité articulaire (50%), clinobrachydactylie (30%), scoliose (15%) Anomalies uro-génitales (sténose pyélo-urétrales, hydronéphroses 10%), Anomalies lymphatiques (Lymphodœmes, lymphangiectasies) (20%), Naevi (25%) tâches « café-au-lait » (10%), lentigines multiples (3%) cheveux fins (30%) et éparses (10%) Myopie, strabisme
Syndrome L.E.O.P.A.R.D. (SL)	ND	Dysmorphie faciale (hypertélorisme, ptosis, oreilles basses en orientation postérieure, <i>pterygium colli</i>) Retard de croissance (25%) taille <3 ^{ème} percentile Retard pubertaire HCM (80%), sténose de la valve pulmonaire (20%), anomalies de la conduction Retard mental (30%) Lentigines multiples, tâches « café-au-lait » sur la peau (visage, tronc, membres supérieurs et inférieurs) Surdité
Syndrome Cardio-Facio-Cutané (CFC)	ND	Dysmorphie faciale marquée (hypertélorisme, épicanthus, ptosis, oreilles basses en orientation postérieure, nez court et large, macrocéphalie relative) Retard de croissance (78%) taille <5 ^{ème} percentile Sténose de la valve pulmonaire (45%), HCM (40%) Retard mental léger à sévère Retard du langage et de l'apprentissage Hyperkératose folliculaire, absence de sourcils, cheveux éparses
Syndrome de Costello (SC)	ND	Dysmorphie faciale marquée (joues pleines, lèvres et langues épaisses, cou court, <i>pterygium colli</i> , ptosis, épicanthus) Poids et taille de naissance supérieurs à la normale Retard de croissance statural et pondéral Peau plissée (mains, dos, pieds) avec plis palmo-plantaires profonds et marqués Papillomes (nasaux, anales) (48%) Rhabdomyosarcomes, neuroblastomes (10-15%) et carcinomes de la vessie Hypoglycémie précoce Anomalie de la déglutition, souplesse du pharynx Retard puberté avec cryptorchidie chez les garçons (10%) et aménorrhées chez les filles HCM, sténose de la valve pulmonaire, troubles du rythme cardiaque Retard de la marche, du langage, de l'apprentissage, retard mental cheveux éparses
Neurofibromatose de type-I (NF-1)	1/3000-1/5000	Retard de croissance statural Sténose de la valve pulmonaire Lentigines multiples, tâches « café-au-lait », neurofibromes (7-12%) Nodules de Lish Macrocéphalie Gliomes des voies optiques Dysplasie osseuse Retard dans l'apprentissage
Syndrome de Legius	ND	Lentigines multiples, tâches « café-au-lait » Macrocéphalie

Tableau 4 : Récapitulatif des principales caractéristiques du syndrome de Noonan et des principaux syndromes apparentés (d'après (Tartaglia et al., 2011)).

ND : non déterminée

Chapitre II- Aspects génétiques du syndrome de Noonan et de ses apparentés

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, le diagnostic clinique du syndrome de Noonan et des syndromes apparentés est parfois difficile à poser étant donnée la superposition des traits phénotypiques entre ces différents syndromes. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de rechercher les causes moléculaires de ces maladies et d'identifier des mutations spécifiques sur différents gènes responsables du développement de ces syndromes. Ainsi, le diagnostic moléculaire est de plus en plus appliqué et est devenu un très bon outil de pronostic informatif car il permet de compléter les critères cliniques parfois subjectifs et de conduire à une meilleure prise en charge des patients.

Nous décrivons dans ce chapitre les gènes impliqués dans le syndrome de Noonan et de ses apparentés ainsi que les conséquences fonctionnelles de leurs mutations. Ainsi, après les avoir brièvement présentés, nous verrons que ces différents gènes sont tous des acteurs d'une voie de signalisation commune, la voie Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase. Dans la partie suivante, nous décrivons plus précisément les différents acteurs de cette voie, puis nous discuterons des conséquences fonctionnelles des mutations de ces gènes en lien avec le développement des syndromes NCFC.

I. Identification des gènes impliqués dans le syndrome de Noonan et de ses apparentés

Des premières études d'analyse par liaison génétique ont permis de localiser un gène impliqué dans le SN sur le bras long du chromosome 12 (Kraft et al., 2011). Plus tard, ces analyses délimitaient plus précisément le locus de ce gène dans la région 12q24 (Allanson, 1987; Romano et al., 2010; Sharland et al., 1992). C'est au début des années 2000, à l'aide d'une approche par gène candidat, que des mutations sur le gène *PTPN11* ont été découvertes et retrouvées dans la moitié des cas SN et dans 80% des cas SL. De plus, il a été montré que seul un des deux allèles du gène *PTPN11* est muté (Jamieson et al., 1994). Compte-tenu de la superposition de traits phénotypiques entre les syndromes, plusieurs auteurs se sont penchés sur la recherche de mutations de *PTPN11* pour d'autres NCFC. Cependant, parmi les syndromes apparentés au SN, seuls les patients SL manifestent des mutations de *PTPN11*.

Par la suite, grâce au développement d'outils moléculaires performants, d'intenses efforts ont été faits dans la recherche d'autres gènes et ont permis de découvrir plus d'une dizaine de gènes différents impliqués dans les NCFC (Tableau 5).

Syndromes	Gènes mutés	Locus du gène	Fréquences
SN	<i>PTPN11</i>	12q24.1	40-50%
	<i>SOS1</i>	2p22.1	20%
	<i>KRAS</i>	12p12.1	<2%
	<i>NRAS</i>	1p13.2	ND
	<i>RAF1</i>	3p25.1	5-15%
	<i>BRAF</i>	7q34	< 2%
	<i>MEK1</i>	15q22.1	4%
SL	<i>PTPN11</i>	12q24.1	80%
	<i>RAF1</i>	3p25.1	ND
CFC	<i>SOS1</i>	2p22.1	ND
	<i>KRAS</i>	12p12.1	44%
	<i>BRAF</i>	7q34	50-75%
	<i>MEK 1</i>	15q22.31	25%
	<i>MEK 2</i>	19p13.3	25%
SC	<i>HRAS</i>	11p15.5	85%
	<i>KRAS</i>	12p12.1	ND
NF-1	<i>NF1</i>	5q14.3	90% (mutation); 5-10% (perte intragénique)
Syndrome de Légius	<i>SPRED1</i>	15q14	5%
NS-Like	<i>SHOC2</i>	10q25	ND
	<i>Cbl</i>	11q23.3	ND
	<i>MYST4</i>	10q22.2	ND

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents gènes identifiés dans le SN et apparentés (Brady et al., 1997; Legius et al., 1998).

A ce jour, bien que 75% des cas de NCFC ont pu être associés à des mutations d'un des gènes cités dans le Tableau 5, 25% des cas restants sont, pour le moment, sans cause moléculaire déterminée. De façon intéressante, tous les gènes identifiés dans les SN et dans ses apparentés se sont avérés être des acteurs clés ou des régulateurs d'une voie de signalisation majeure, à savoir la voie Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (Ras/MAPK), qui régule de nombreux processus biologiques (développement, organogenèse, prolifération...). Ces observations suggèrent que l'identification des mutations retrouvées sur les gènes les plus fréquemment décrits dans les NCFC en facilitera le diagnostic moléculaire. En outre, l'ensemble des gènes responsable des NCFC regroupés d'un point de vue fonctionnel, permettra, dans le cas d'absence de résultat, d'ouvrir les recherches sur de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de la voie Ras/MAPK, bien qu'il ne soit pas exclu que des mutations d'autres gènes non impliqués dans cette voie puissent être à l'origine de certains cas de ces syndromes.

Avant de décrire les différentes anomalies génétiques retrouvées dans le SN et ses apparentés, il nous paraît nécessaire, dans la partie suivante, de présenter et de décrire les différents acteurs composant la voie Ras/MAPK.

II. La voie de signalisation Ras/MAPK

A. Généralités

La voie de signalisation RAS/MAPK permet la transduction d'un stimulus extracellulaire (sous la forme d'un facteur de croissance, d'hormones, de cytokines, d'un contact avec un support, ou encore de stress) de la membrane plasmique vers le noyau de la cellule pour y réguler différents programmes génétiques. La régulation de multiples gènes cibles par cette voie permet le contrôle de divers processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires nécessaires au développement normal et au maintien de l'homéostasie de l'organisme (Plotnikov et al., 2011). La dérégulation de la voie Ras/MAPK, associée notamment à l'apparition de nombreux cancers humains mais aussi à des défauts développementaux qui sont retrouvés dans des maladies génétiques telles que le SN et ses apparentés (Karnoub and Weinberg, 2008).

La voie Ras/MAPK est constituée de plusieurs protéines principalement à activité kinase qui, par des phosphorylations séquentielles, transduisent le signal induit par le stimulus vers le noyau de la cellule. Ainsi, cette cascade de phosphorylations met en jeu les MAPK

kinases kinases (MAPKKK), les MAPK kinases (MAPKK) et les MAPK. Ces dernières sont cruciales car ce sont elles qui, en modulant directement ou indirectement l'activité de différents facteurs de transcription, atteignent les gènes cibles de cette voie et vont permettre leur régulation. Il existe 4 types de MAPK que sont les Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (Erk1/2) MAPK, les p38 MAPK, les c-Jun N-terminal Kinase (JNK) MAPK et les Erk5 MAPK, qui sont différemment mobilisées selon la nature du stimulus. D'une manière générale, les Erk1/2 sont activées par des facteurs de croissance, hormones ou mitogènes, alors que les MAPK p38, JNK et Erk5 sont activées en réponse à des signaux de stress oxydatifs ou provenant de l'environnement, notamment à la suite d'un choc osmotique ou de radiations ionisantes (Johnson and Lapadat, 2002).

Nous nous limiterons, dans la partie suivante, à la description des différents acteurs de la voie Ras/Erk1/2 étant donné que les gènes mutés décrits dans la littérature concernant le SN et ses apparentés concernent principalement cette voie (Tableau 5).

B. Description de la voie Ras/Erk1/2

1. Les protéines Ras : structure, fonction et activation

Dans le génome des mammifères, les protéines Ras ou *Rat sarcoma* sont codées par 3 gènes à savoir, *Neuroblastoma-RAS (N-RAS)*, *Harvey-RAS (H-RAS)* et *Kirsten-RAS (K-RAS)*. Ces isoformes sont pratiquement toutes ubiquitaires, bien que leur propre expression varie d'un tissu à un autre. Elles font partie des 150 membres de la superfamille des petites guanosine-triphosphatases (GTPases) (pour revue, voir (Wennerberg et al., 2005)).

a) Structure et fonction de Ras

Quel que soit son isoforme, Ras possède une séquence relativement conservée constituée d'un large domaine catalytique situé en N-terminal (résidus 5-166) et d'un domaine hypervariable en C-terminal (résidus 167-188/189) portant la séquence d'adressage à la membrane (Figure 11).

Le domaine catalytique est composé de plusieurs régions aux fonctions distinctes : une région d'interaction avec les groupements phosphates des nucléotides, une région contenant une boucle ou « switch I » permettant la liaison de Ras avec ses effecteurs et une autre région contenant une autre boucle « switch II » qui permet la liaison avec ses activateurs. Selon l'état d'activité de Ras, inactif ou actif, les deux boucles peuvent changer de conformation lors de

leur fonction. La région hypervariable contient un motif de type CAAX (où C est une cystéine, A une alanine et X un résidu quelconque) qui va subir des modifications post-traductionnelles pour un adressage de Ras à la membrane plasmique. En effet, une farnésyltransférase permet l'ajout d'un groupe farnésyl sur la cystéine du motif CAAX, induisant la localisation des protéines Ras vers le réticulum endoplasmique pour subir d'autres modifications nécessaires à leur maturation. Alors que K-RasB est envoyée directement à la membrane plasmique, K-RasA, N-Ras et H-Ras subissent une palmitoylation, transitent par l'appareil de Golgi puis sont adressées à la membrane plasmique (Hancock, 2003).

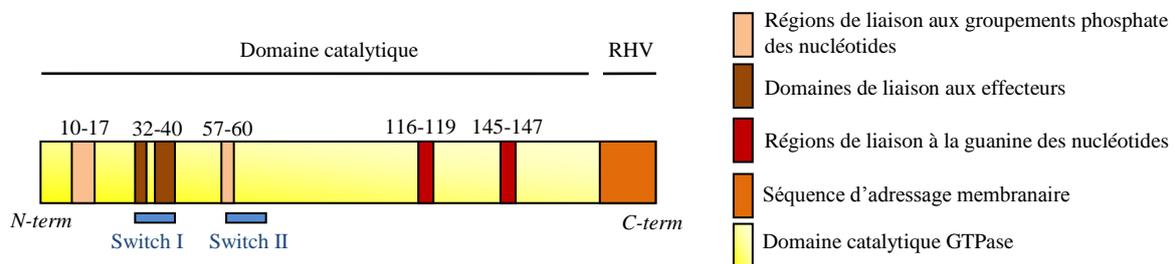


Figure 11 : Structure de la protéine Ras (Roberts et al., 2006).

b) Mécanisme d'activation de Ras : la voie canonique Grb2/Sos1

A l'état basal, Ras est sous une forme inactive liée au GDP (RasGDP). Pour être active, elle doit être sous une forme liée au GTP (RasGTP). Bien qu'elle possède une activité GTPase intrinsèque et que les affinités pour le GDP et le GTP soient élevées, elle n'est pas capable, à elle seule, de transférer le GDP de sa forme inactive en GTP. Cette dernière étape est possible grâce au facteur d'échange nucléotide (Guanosine Exchange Factor, GEF), Son of Sevenless 1 (Sos1), qui peut se lier aux deux formes de Ras Figure 12. Par son domaine catalytique, Sos1 déplace les nucléotides à guanosine par un mécanisme biochimique complexe impliquant la formation de différents complexes avec Ras (Margarit et al., 2003). Le remplacement du GDP par le GTP permet ainsi le passage de Ras de sa forme inactive à sa forme active, sous laquelle Ras peut exercer sa fonction (Buday and Downward, 2008). Un retour à l'état inactif est assuré par l'hydrolyse du GTP en GDP grâce à l'activité GTPasique intrinsèque de Ras, qui est catalysé par une GTPase Activating Protein (GAP) comme la p120RasGAP ou la Neurofibromine (Figure 12, Figure 13).

Les protéines Ras, ancrées à la membrane plasmique, sont activées en aval de plusieurs récepteurs transmembranaires, tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase (Receptor Tyrosine Kinase, RTKs), les récepteurs aux cytokines, les intégrines, les RCPG et les canaux calciques. Plusieurs mécanismes d'activation de Ras ont été proposés. Néanmoins, un des mécanismes les mieux décrits dans la littérature est l'activation de Ras par le recrutement sous-membranaire du module Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2)/Sos1 par les RTK, qui constitue la voie canonique d'activation de la voie Ras/MAPK (Dance et al., 2008b).

De façon générale, l'activation d'un RTK survient lors de la liaison d'un ligand (facteur de croissance ou mitogène) au niveau des domaines extracellulaires du récepteur. Cette liaison entraîne la dimérisation du récepteur et son autophosphorylation sur des résidus tyrosines du domaine intracellulaire. Ces phosphotyrosines servent alors de points d'ancrage pour le recrutement de protéines de nature diverses, possédant des domaines de liaison aux phosphotyrosines (PhosphoTyrosine Binding, PTP) ou Src Homology-2 domain (SH2). C'est notamment le cas de Grb2, qui s'associe par ses domaines SH2 sur le RTK phosphorylé, et en étant constitutivement associé à Sos1, assure la relocalisation de cette dernière en position sous membranaire à proximité de son substrat Ras (Buday and Downward, 1993).

Sos1 est une protéine à la structure complexe dans laquelle le domaine catalytique Cdc25 est précédé par les domaines Histone Folds (HF), Dbl Homology-Pleckstrin Homology (DH-PH) et Ras Exchange Motif (REM), et suivi par la région polyproline (PxxP) enC-terminal (Figure 12).

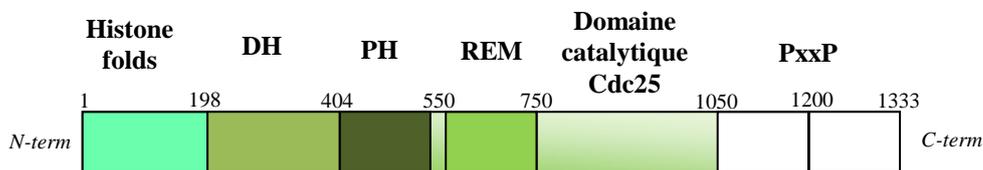


Figure 12 : Représentation schématique de la structure de Sos1.

DH : Dbl Homology domain; PH, Plekstrin Homology domain; REM, Ras Exchanger Motif.

A l'état basal, Sos1 est dans une conformation auto-inhibée faisant intervenir des interactions intra- et inter-moléculaires complexes impliquant notamment l'unité DH-PH, mais le mécanisme précis de l'activation de Sos1 n'est pas tout à fait compris.

c) Régulation de Ras par les GAP

La régulation négative de l'activation de Ras est réalisée par les protéines GAP p120RasGAP (RasGAP) et la Neurofibromine (Nf). Ces GAP, sont capables d'hydrolyser la forme Ras associée au GTP en GDP, conduisant cette dernière dans un état inactif. RasGAP et Nf sont deux molécules co-exprimées de manière ubiquitaire, mais elles semblent agir différemment dans cette inactivation. En effet, RasGAP possède deux domaines SH2 qui lui permettent d'être recrutée *via* des phosphotyrosines sur des récepteurs activés (e.g. récepteur du Platelet-Derived-Growth-Fractor, R-PDGF) ou sur des protéines adaptatrices (e.g. Gab1). Nf, quant à elle, ne possède pas de domaine SH2 mais a une haute affinité pour de faibles niveaux de Ras lié au GTP. Ces observations suggèrent que la Nf serait responsable du maintien de Ras dans sa forme inactive en l'absence de stimulation alors que RasGAP régulerait de manière négative Ras comme cela a été montré en réponse à plusieurs facteurs de croissance (Pamonsinlapatham et al., 2009; Trovo-Marqui and Tajara, 2006) (Figure 13).

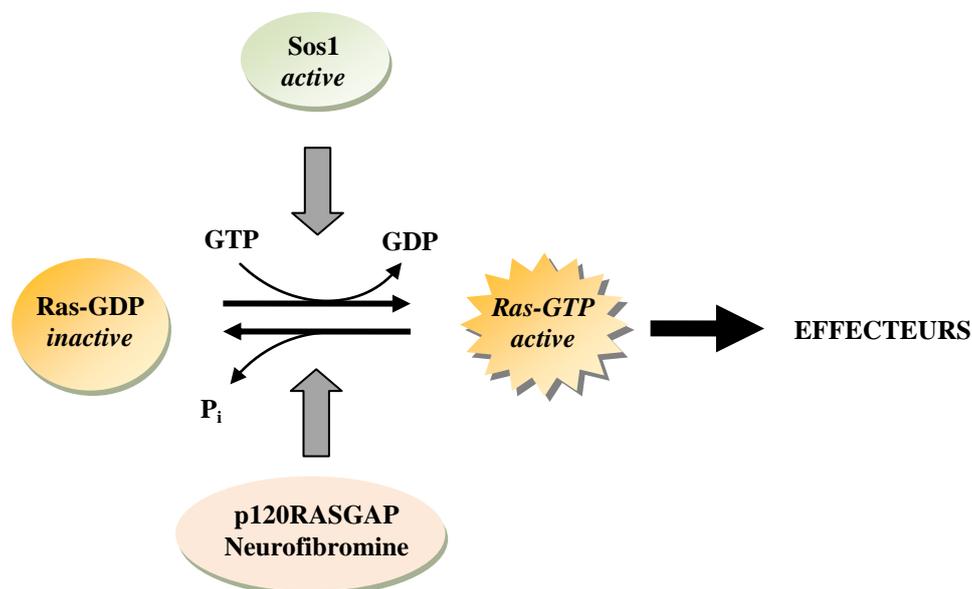


Figure 13 : Activation et régulation de la GTPase Ras.

2. Les effecteurs de Ras dans la cascade Ras/Erk1/2

a) Les protéines Raf, effecteurs directs de Ras

Les effecteurs directs de Ras dans la cascade Ras/MAPK sont les sérine/thréonine kinases Raf. Il existe 3 isoformes de Raf, A-Raf, B-Raf et C-Raf (appelée aussi Raf1). Toutes ces isoformes possèdent 3 régions conservées (Conserved Regions, CR) : CR1, CR2 et CR3 et un domaine de liaison à Ras, ou Ras Binding Domain (RBD) qui possède une forte affinité pour la forme liée au GTP de Ras. Une fois liées à RasGTP, les Raf subissent un changement de conformation qui favorise leur activation. En revanche, bien qu'elles aient des structures communes, ces isoformes diffèrent dans leur distribution tissulaire, leurs modes d'activation et de régulation.

La région CR1 contient deux domaines impliqués dans la translocation membranaire que sont le domaine RBD et le domaine riche en cystéine ou Cysteine-Rich Domaine (CRD). La région CR2, contient un site de liaison pour une protéine chaperonne 14-3-3, qui stabilise la forme inactive de Raf. Il a été montré que la suppression des régions CR1 et CR2 conduit à l'activation oncogénique de Raf1 suggérant que ces régions constituent des domaines de régulation négative de l'activité de Raf1 (Chan et al., 2002). La région 3 porte le domaine catalytique et le segment d'activation de Raf1. En absence de stimulus, la portion N-terminal interagit avec le domaine catalytique, maintenant Raf dans une conformation auto-inhibée. L'activation de Raf1 par Ras induit la libération de la protéine chaperonne et stimule simultanément la phosphorylation de sites spécifiques présents dans la région CR2 pour activer le domaine kinase de Raf 1. Il a été montré que le site de liaison de la protéine chaperonne sur Raf est déphosphorylé par des protéines phosphatases telles que PP1 et PP2A, ce qui régule positivement l'activation de Raf1 en favorisant d'une part, son interaction avec Ras et d'autre part, son recrutement à la membrane plasmique (Kobayashi et al., 2010; Roskoski, 2010).

De plus, il a été montré que Raf1 pouvait être activée après une hétérodimérisation avec l'isoforme B-Raf (Garnett et al., 2005). Cette hétérodimérisation B-Raf/Raf 1 induirait une phosphorylation du segment d'activation de Raf 1, pour permettre une conformation active de la kinase. Cependant, à l'heure actuelle, on ne connaît pas avec précision le véritable acteur responsable de cette phosphorylation. Il se pourrait que ce soit B-Raf, une autre kinase, ou encore une autophosphorylation de Raf 1. On ne sait également pas si Raf 1 peut moduler l'activité de B-Raf et si l'hétérodimérisation concerne également l'isoforme A-Raf (Figure 14).

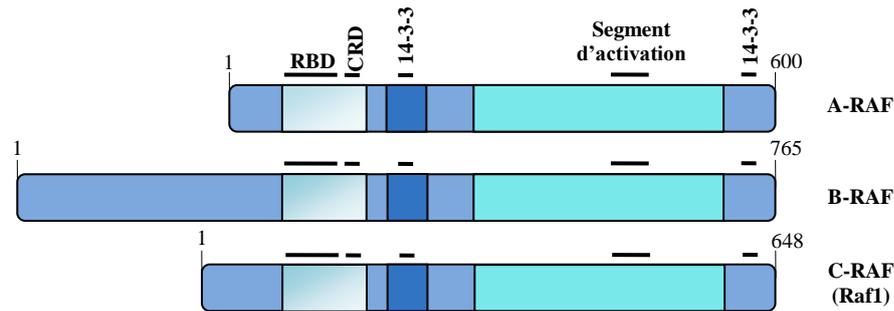


Figure 14 : Représentation schématique de la structure des isoformes A-RAF, B-RAF et C-RAF (Raf1) (Delrue et al., 2002).

RBD : domaine de liaison à Ras (Ras Binding Domain), CRD : domaine riche en cystéines (Cystein Rich Domain). Le segment d'activation et les régions de liaison de la chaperonne 14-3-3 figurent sur le schéma.

b) Les protéines Mek

Lorsqu'elle est active, Raf1 phosphoryle à son tour d'autres kinases, les protéines MAPKK, représentées par les isoformes Mek 1 et Mek 2. Les protéines Mek sont constituées d'un domaine régulateur en N-terminal et d'un domaine catalytique à activité kinase leur permettant de phosphoryler leurs substrats, Erk 1 et Erk 2. Ces isoformes sont capables d'être pleinement actives par la phosphorylation de leur segment d'activation présent dans le domaine kinase. Des études réalisées à partir de modèles murins où le gène pour chaque isoforme de Mek a été invalidé, attribuent à Mek 1 mais pas Mek 2, un rôle essentiel dans le développement embryonnaire (Giroux et al., 1999) (Figure 15).

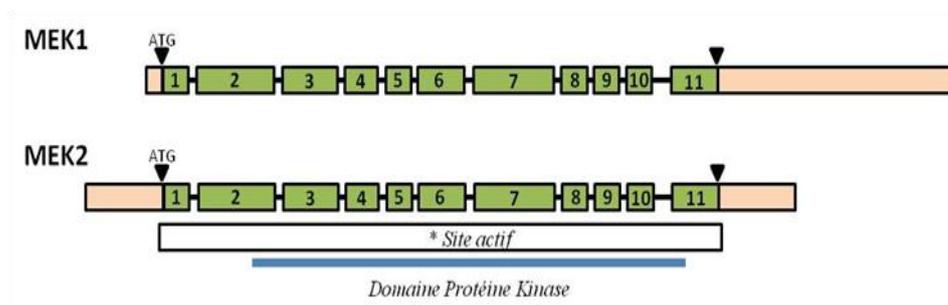


Figure 15 : Représentation schématique de la structure de MEK

Les exons sont représentés en par des rectangles vert sont numérotés. La délimitation de la partie traduite (protéines Mek 1 et Mek 2) est modélisée par le rectangle blanc. Le domaine protéine kinase est représenté et le site actif de l'enzyme est indiqué par un astérisque.

c) Les protéines Erk

Derniers acteurs de la cascade Ras/Erk1/2, les MAPK Erk1 et Erk2 sont phosphorylées par les protéines Mek1 et Mek2. Comme pour les Mek, leur pleine activation est médiée seulement par la phosphorylation de leur segment d'activation sur leur domaine catalytique. Ces protéines exercent leur fonction sur les substrats nucléaires incluant des facteurs de transcription, mais aussi des protéines membranaires et des protéines kinases contrôlant la progression du cycle cellulaire, la différenciation et la prolifération (Yoon and Seger, 2006). Il a été montré que l'isoforme Erk2 serait essentielle lors du développement embryonnaire mais pas l'isoforme Erk1 (Giroux et al., 1999).

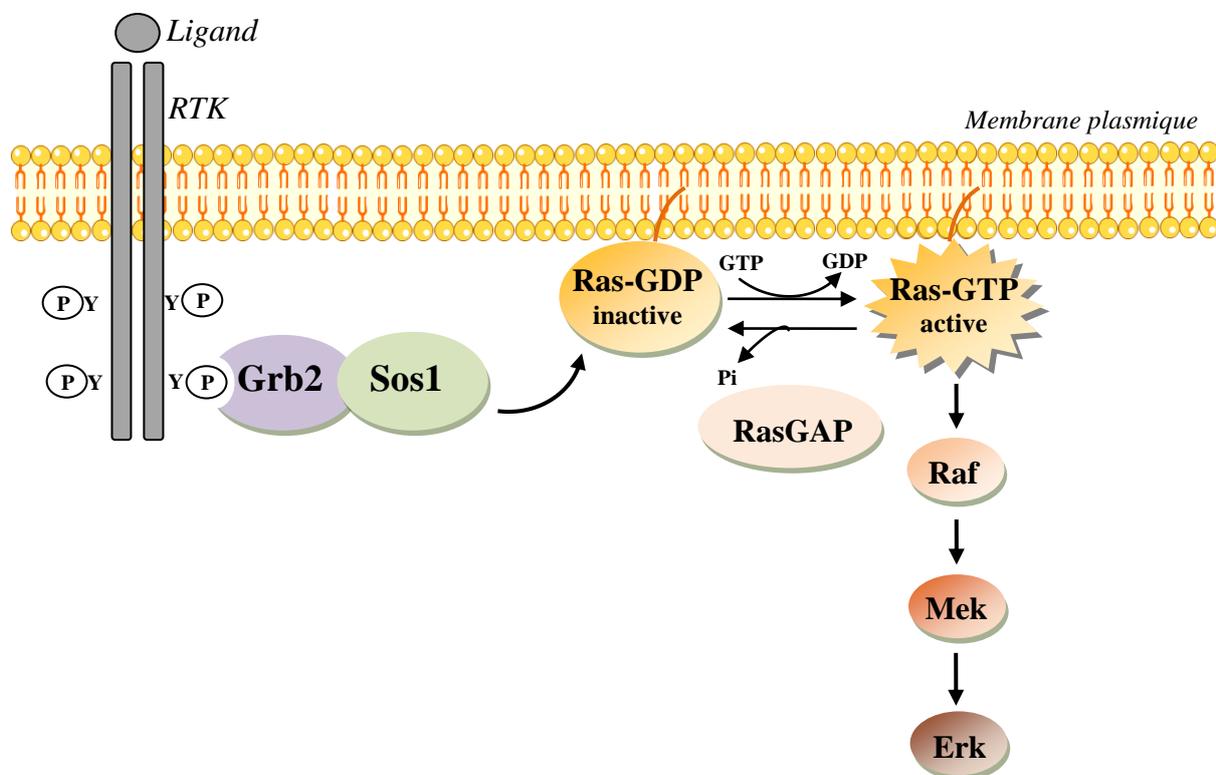


Figure 16 : Modèle classique de l'activation et de la régulation de la voie Ras/MAPK

Les tyrosines phosphorylées du RTK constituent des sites de liaison pour Grb2, qui via ses domaines SH3 (domaine de liaison à des prolines) interagit donc avec les domaines riches en proline de Sos1, le relocalisant ainsi auprès de Ras. Sos1 pourra alors catalyser l'échange du GDP en GTP sur Ras, et ainsi l'activer. RasGAP vient à son tour catalyser la réaction GTP en GDP pour un retour de Ras sous sa forme inactive.

III. Conséquences physiopathologiques des anomalies de la voie Ras/MAPK : les « RASopathies »

Compte-tenu de ses rôles pléiotropiques dans la régulation de multiples fonctions cellulaires, l'activation de la voie Ras/MAPK est soumise à de multiples régulations, tant positives que négatives, qui assurent un contrôle fin de son intensité et de sa cinétique d'activation. En conséquence, il est largement établi qu'une dérégulation de ces acteurs est associée à diverses pathologies, comme notamment la tumorigenèse, le dysfonctionnement de divers organes mais aussi des anomalies du développement (Young et al., 2009). L'identification au cours des dernières années de mutations des acteurs ou régulateurs de cette voie comme facteurs causaux des différents syndromes NCFC a conduit plusieurs auteurs à redéfinir cette famille de syndromes génétiques sous le terme de « **RASopathies** » (Rauen et al., 2010; Tidyman and Rauen, 2009) (Tableau 5 et Figure 17).

A. Anomalies dans l'activation de Ras par les mutations de *SOS1* et de *RAS*

Les mutations du gène *SOS1* (MIM #182530) sont la cause de 20% des cas de SN et sont également retrouvées dans le syndrome CFC. Ces mutations de type faux sens, affectent les différents domaines de la protéine. La moitié d'entre elles sont localisées dans la boucle « short helical linker » qui permet la connexion entre le domaine PH et le motif REM (Figure 12). D'autres mutations sont localisées dans le domaine PH, dans la région d'interaction entre le domaine DH et le domaine REM ou encore dans le domaine catalytique. Il a été récemment démontré que ces différentes modifications, en conférant à la protéine Sos1 une conformation constitutivement active, avaient un effet gain de fonction et étaient capables de provoquer une hyperactivation de la voie Ras/MAPK (Lepri et al., 2011).

Les mutations faux sens de *RAS* sont retrouvées sur les 3 isoformes de cette GTPase. Dans le SN, ces mutations sont portées par les gènes *KRAS* (MIM# 190070) et *NRAS* (MIM#164790) mais y sont faiblement retrouvées. Des mutations de *KRAS* sont également responsables de cas de CFC. Il a été montré que des mutations du gène *HRAS* (MIM#190020) étaient à l'origine de plus de 85% des cas de CS. Quelle que soit la mutation de chacune de ses isoformes, Ras est altérée au niveau de son activité GTPase intrinsèque et cette altération perturbe l'équilibre entre ses formes active et inactive. Cette instabilité a donc pour conséquence une hyperactivité de la protéine résultant en une hyperactivation de la voie Ras/MAPK (Cirstea et al., 2010; Gripp and Lin, 2011; Rauen et al., 2011).

B. Perturbation de la régulation négative de Ras par les mutations de *NF-1*

Les mutations du gène *NF1* (MIM #613113) retrouvées chez les patients atteints de NF-1, sont dans 90% des mutations de type faux sens hétérozygotes, et entre 5 et 10% des délétions. Toutes ces mutations causent une perte de fonction de la GAP. Ainsi, cette perte de fonction conduit à un déséquilibre du contrôle de l'activation de Ras, en faveur hyperactivation de la GTPase (Jett and Friedman, 2010; Tartaglia and Gelb, 2010).

C. Anomalies de la transduction du signal par les mutations de *RAF* et *MEK*

Les mutations *RAF1* (MIM#164760), faiblement représentées dans le SN (5-15%) ont été retrouvées également chez des patients SL. Elles sont localisées le plus souvent dans la région N-terminal de la protéine (70%), dans son domaine kinase (15%) ou moins fréquemment, dans sa région C-terminal. Les mutations affectant les domaines N- et C-terminaux favorisent l'activité kinase de Raf1, ce qui entraîne une hyperactivation de la cascade MAPK (Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007).

Les mutations de *BRAF* (MIM#164757) ont été rapportées avec une faible fréquence chez les patients SN et SL. Cependant, elles ont été identifiées initialement chez les patients CFC avec une fréquence élevée (plus de 50%). Toutes les mutations *BRAF* sont retrouvées sur le domaine riche en cystéine de la protéine qui lui confère, le plus souvent, une activité augmentée (Rodriguez-Viciano et al., 2006b; Sarkozy et al., 2009).

Les mutations de *MEK1* (MIM#176872) sont présentes dans moins de 5% des SN, alors que plus d'un quart des patients CFC portent des mutations de *MEK1* ou de *MEK2* (MIM#601263). Les mutations de *MEK1* ou *MEK2*, affectent la région régulatrice de la kinase qui induit un gain de fonction de la protéine, conduisant à l'hyperactivation de la cascade (Dentici et al., 2009; Nava et al., 2007; Rodriguez-Viciano et al., 2006b).

D. Perturbation de la régulation de la cascade Ras/Erk1/2

1. Mutations de *PTPN11* dans les SN et SL

Les mutations du gène *PTPN11*, comme nous l'avons évoqué précédemment, sont les plus fréquentes dans le SN et le SL car elles concernent plus d'un patient SN sur deux et la majorité des patients SL. A ce jour, il n'y a pas de mutations de *PTPN11* rapportées dans les autres syndromes apparentés. *PTPN11* code pour une tyrosine phosphatase cytoplasmique, nommée SHP2, qui est un composant essentiel des voies de transduction du signal intracellulaire, notamment la voie Ras/MAPK (Neel et al., 2003b). De façon intéressante, les

mutations de *PTPN11* associées au SN et au SL ont des effets opposés sur son activité enzymatique mais conduisent à des syndromes relativement proches (Edouard et al., 2007a). Nous consacrerons une description et une analyse plus approfondie des conséquences physiopathologiques de ces mutations dans le chapitre III.

2. Mutations de *CBL*, *SHOC2* et de *MYST4* dans des syndromes « SN-like »

Des mutations de *CBL* (Casitas B-lineage Lymphoma) (MIM#613563) ont récemment été retrouvées dans certains cas de SN, qualifiés de syndromes « SN-like » (Martinelli et al., 2010). Les protéines Cbl sont des E3 ubiquitine ligases qui permettent la régulation de la signalisation intracellulaire via l'ubiquitinylation et la dégradation subséquente par le protéasome, des RTK. Il existe 3 homologues de Cbl, dont c-Cbl et Cbl-b, qui ont des orthologues chez la drosophile et chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), suggérant une conservation au cours de l'évolution. Elles sont composées d'un domaine de liaison aux tyrosines kinases en son extrémité N-terminal, un motif en doigt de zinc pour le recrutement des enzymes impliquées dans l'ubiquitinylation, une région riche en proline donnant à Cbl une fonction d'adaptateur protéique, et un domaine pour son association avec l'ubiquitine en son extrémité C-terminal (Swaminathan and Tsygankov, 2006, Schmidt and Dikic, 2005). Les mutations de *CBL* retrouvées dans le SN causent une perte de sa fonction. Ainsi, Cbl mutée ne peut plus permettre la ligature d'une ubiquitine sur le domaine intracellulaire du récepteur membranaire qui n'est donc plus internalisé. Ceci a pour conséquence une hypersensibilité des récepteurs de surface aux facteurs de croissance activant constitutivement la voie Ras/MAPK (Martinelli et al., 2010).

L'analyse génétique d'autres patients a permis de mettre en évidence des mutations sur le gène Soc-2 suppressor Of Clear Homolog 2, *SHOC-2* (MIM#602775). Il a été montré que la protéine SHOC-2 forme un complexe ternaire avec Ras et Raf 1 et qu'elle joue un rôle positif dans la voie de signalisation Ras/MAPK. Au niveau fonctionnel, il a été proposé que SHOC-2 soit une protéine « scaffold » ou chaperonne, maintenant l'interaction entre ces deux protéines, mais aussi qu'elle puisse moduler certains états de phosphorylation de Raf 1 ou de ces régulateurs par un effet sur la phosphatase PP1c (Matsunaga-Udagawa et al., 2010; Rodriguez-Viciano et al., 2006a). Les mutations de *SHOC-2* causent, une myristoylation aberrante de la protéine en N-terminal, qui localise de manière inattendue SHOC-2 à la membrane plasmique. Ainsi, à proximité de ses cibles, SHOC-2 mutée maintiendrait

l'activation de la voie Ras/MAPK en favorisant l'association entre Raf 1 et Ras (Cordeddu et al., 2009; Rodriguez-Viciano et al., 2006a).

Récemment, un nouveau cas de NS-like a été rapporté, présentant des anomalies communes aux NCF1 mais avec une haploinsuffisance du gène *MYST4*, mutation qui n'avait pas été décrite jusqu'à présent. Le gène *MYST4* code pour une histone acétyltransférase, et des premières études suggèrent que son inactivation conduise à une hyperactivation de la voie RAS/MAPK, par des mécanismes qui restent à élucider (Kraft et al., 2011).

3. Mutations de *SPRED1* dans le syndrome de Legius

Des mutations du gène Sprouty-related proteins with an EVH1 domain, *SPRED1* ont été identifiées dans différents cas du syndrome de Legius (Brems et al., 2007). La protéine Spred1, et son isoforme Spred2, présentent des homologies avec la famille des protéines Sprouty (Spry) qui seraient impliquées dans divers processus physiologiques et développementaux en exerçant un effet négatif sur la cascade Ras/MAPK. Bien que les mécanismes moléculaires précis soient mal connus, il a été proposé que les protéines Spry interagiraient, par leurs résidus phosphotyrosines, avec la molécule adaptatrice Grb2 et que l'association Spry/Grb2 entraîne une séquestration de Grb2 empêchant la transmission du signal (Hanafusa et al., 2002). Un autre mode d'action serait l'interaction des protéines Spry, par leur domaine riche en cystéine, avec le domaine catalytique de raf. Cette interaction bloquerait l'activation de Raf par la protéine kinase C δ (PKC δ) mais pas l'activation de Raf dépendante de Ras. Néanmoins, le rôle de régulateur négatif de Spry dans l'activation des RTKs reste controversé car ses effets dépendent de l'isoforme de Spry, du récepteur activé, du type et du contexte cellulaires (Mason et al., 2006). Les protéines Spred, quant à elles, semblent agir principalement en aval de Ras en inhibant la phosphorylation et l'activation de Raf. Ainsi, Spred 1 s'associe à Ras qui n'empêche pas l'activation de Ras ni le recrutement membranaire de Raf. Par contre, Spred prolonge l'association de Raf à Ras ce qui pourrait diminuer son activation en altérant sa distribution cellulaire (Bundschi et al., 2007; Wakioka et al., 2001).

Les mutations de *SPRED1* associées au syndrome de Legius, ont été décrites comme des mutations perte de fonction. Compte-tenu du rôle négatif des Spry/Spred dans la régulation de la voie Ras/MAPK, ces mutations perte de fonction pourraient induire une hyperactivation de la voie Ras/MAPK.

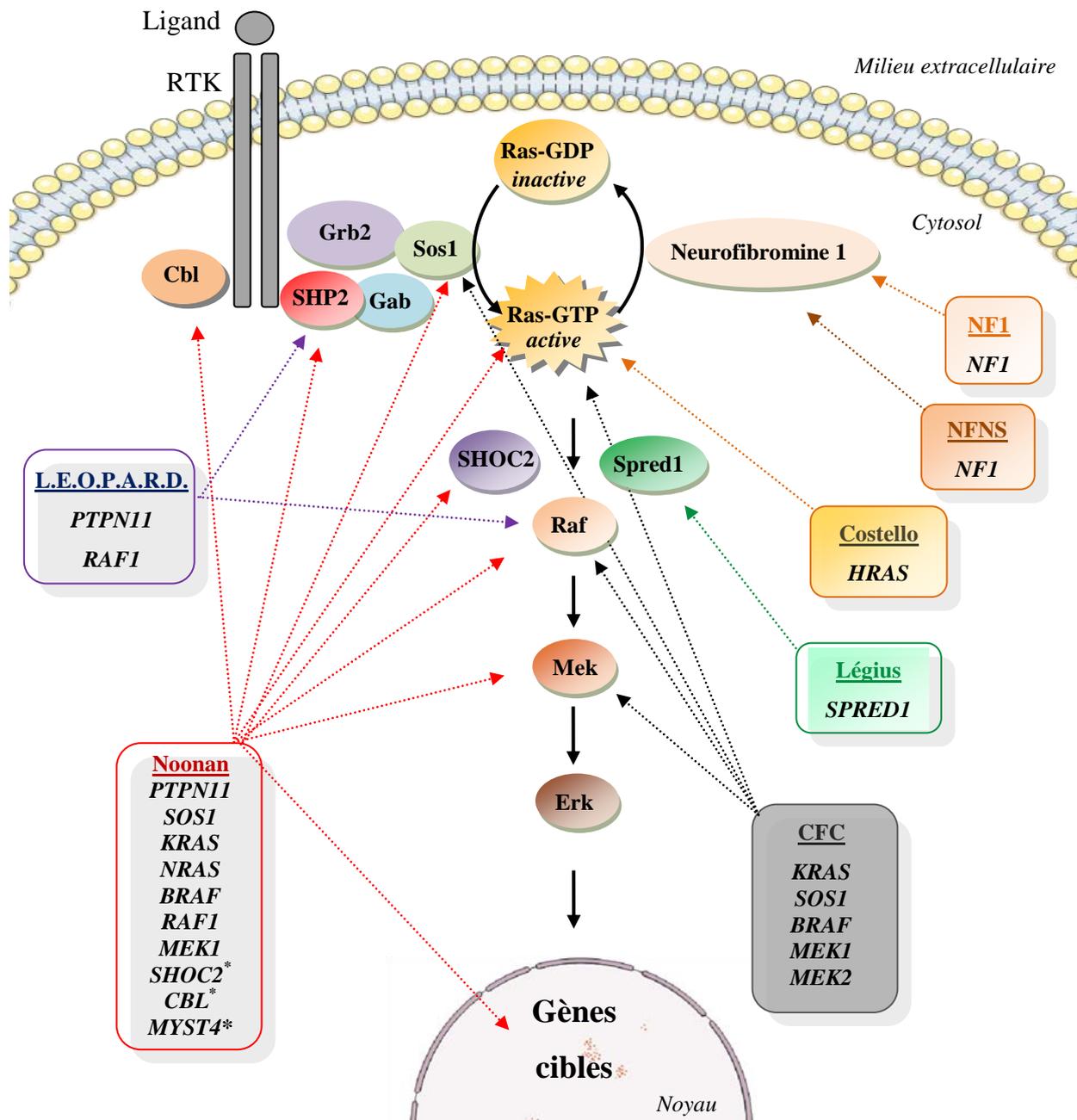


Figure 17 : Les « RASopathies » : anomalies de la voie de signalisation Ras/MAPK (Ekvall et al., 2011).

Les « SN-like » sont symbolisés par un astérisque.

IV. Principales corrélations génotype-phénotype dans le syndrome de Noonan et ses apparentés

Le diagnostic clinique souvent difficile à poser du fait du chevauchement des traits phénotypiques des syndromes NCFC, a été complété par le diagnostic moléculaire qui a permis d'associer chaque syndrome à des mutations de gènes spécifiques. Des études pour émettre des corrélations entre le génotype et le phénotype des patients ont été réalisées par plusieurs auteurs pour délimiter plus précisément les syndromes. Nous décrirons, dans cette deuxième partie, les principales corrélations citées dans la littérature en nous limitant aux principaux traits cliniques du SN et de ses apparentés. Par ailleurs, nous discuterons des limites du diagnostic moléculaire car les mutations découvertes d'un même gène pouvaient être associées à différents syndromes.

A. Corrélations génotype-phénotype dans le SN

Les analyses de corrélations génotype-phénotype dans le SN ont révélé l'existence d'une variabilité d'expression des signes cliniques en fonction de la présence ou non de mutations sur les différents gènes actuellement identifiés.

1. Retard statural

Trois études récentes ont montré que 56% à 76% des patients SN porteurs d'une mutation *PTPN11* ont une taille plus petite (inférieure au 3^{ème} percentile) que les patients sans modification de ce gène (Ko et al., 2008; Lee et al., 2011; Papadopoulou et al., 2011). Il a été montré dans une cohorte de patient Noonan, avec un âge moyen de 6 ans, que le retard de croissance lors de la croissance post-natale était plus important chez les patients mutés sur *PTPN11* que chez les autres SN (-3,1 DS vs -2,4 DS p=0,04). De plus, une autre étude montre que plus de 80% des patients porteurs de mutations sur *PTPN11* ont une petite taille de -3,1 DS alors que le groupe contrôle (pas de mutations sur *PTPN11*) ont un retard de croissance pour 57% d'entre eux et une petite taille de -2,4DS (Jongmans et al., 2005; Limal et al., 2006b; Tartaglia et al., 2002; Zenker et al., 2004). Toutefois, certains auteurs n'ont pas observé cette différence, probablement à cause d'un faible nombre de patients dans les cohortes ou encore d'une variabilité trop importante des âges au moment des mesures des différents paramètres de croissance (Binder et al., 2005b; Maheshwari et al., 2002; Musante et al., 2003). Ainsi, l'étude de Binder *et al.* montrait un retard identique de -3 DS entre les groupes mutés et non mutés sur *PTPN11* (Binder et al., 2005b). Deux études récentes retrouvent des tailles similaires aux études précédentes avec une valeur de taille de -2,75 DS

et -2,6 DS pour une âge moyen de 2,5 et 4,6 ans, respectivement (Ko et al., 2008; Lee et al., 2011).

Malgré une fréquence élevée d'un retard de croissance chez les patients portant une mutation sur le gène *SOS1* (40%), ce critère reste relativement moins fort que pour celui des patients associés à des mutations de *PTPN11*, avec une taille moyenne de -1,94 DS (Lee et al., 2011). A l'inverse, le retard de croissance serait moins fréquent chez les patients porteurs de mutations *PTPN11* que chez les patients ayant une mutation sur les gènes *RAF1* (85%) et *KRAS* (84%), bien que ces dernières études aient été faites sur des cohortes de petit nombre (Carta et al., 2006; Nava et al., 2007; Pandit et al., 2007). En période prénatale, la croissance du fœtus semble être identique chez les SN porteurs d'une mutation *PTPN11* et chez les autres SN (-1,4DS +/- 1,2DS vs -0,9 +/- 1,0 DS p=0,4) (Limal et al., 2006b). A la naissance, les tailles semblent être également identiques entre ces deux groupes (Binder et al., 2005b; Yoshida et al., 2004).

Les profils hormonaux des patients SN ont aussi été évalués en fonction du gène muté, par des mesures des taux de GH, d'IGF-I et d'IGFBP3. Ainsi, dans plusieurs études avec test de génération, les taux de GH sont normaux avec une tendance à la hausse pour les patients porteurs de mutations sur *PTPN11* (Binder et al., 2005b; Ko et al., 2008; Limal et al., 2006b). De plus, des taux bas d'IGF-I et des taux normaux d'IGFBP3 retrouvés chez les patients SN porteurs d'une mutation *PTPN11* ne sont pas significativement différents de ceux des patients non mutés sur ce gène ou mutés sur *SOS1* (Lee et al., 2011; Limal et al., 2006b). Dans l'étude de Binder *et al*, après un an de traitement avec GH, les enfants ont un gain de taille plus important que pour ceux n'ayant pas de mutation sur *PTPN11*. Noordam *et al*, ont montré qu'après un traitement par GH des patients SN à long terme, le gain de taille était relativement similaire entre les groupes porteurs ou non du gène *PTPN11* muté mais les auteurs précisent une meilleure efficacité du traitement pour les patients dont aucune mutation n'a été retrouvée sur *PTPN11* (Noordam et al., 2008b). Ainsi, ces différents profils hormonaux chez les patients SN porteurs de mutations sur *PTPN11* appuient l'hypothèse d'une résistance à GH, et cette résistance serait plus importante chez ces patients, se traduisant par une moins bonne réponse au traitement par GHrh.

2. Les cardiopathies

Les anomalies cardiovasculaires, retrouvées chez les patients SN, ont une fréquence élevée comme nous l'avons vu précédemment, mais qui peut varier selon le gène muté. Récemment, une étude a montré que parmi les patients SN ayant une cardiopathies (83% des cas dans cette cohorte), les patients porteurs d'une mutation sur *PTPN11* ont une fréquence significativement plus élevée de sténose de la valve pulmonaire que les autres patients (65% versus 44% des cas), alors que l'HCM est plus commune chez les patients n'ayant pas de mutations sur ce gène (Kobayashi et al., 2010; Papadopoulou et al., 2011). Ces données sont en accord avec des études précédemment rapportées (Sznajder et al., 2007; Tartaglia et al., 2002; Zenker et al., 2004). Pour les autres gènes impliqués dans le SN, il a été montré que les cardiopathies étaient souvent présentes, avec une fréquence de 72%, 67% et 94% en association avec les mutations des gènes *SOS1*, *KRAS* et *RAF1*, respectivement, mais que le type de cardiopathie différait. En effet, les mutations sur les gènes *SOS1* et *KRAS* sont le plus souvent associées à une sténose de la valve pulmonaire dans 70-80% et 67% des cas, respectivement, alors que les mutations de *RAF1* semblent plutôt à l'origine des HCM (76%) (Ko et al., 2008; Kobayashi et al., 2010; Lee et al., 2011; Pandit et al., 2007).

3. La dysmorphie faciale

Comme évoqué précédemment, la dysmorphie faciale associée au SN, bien que typique, présente des caractéristiques très variables (Musante et al., 2003). Une étude récente réalisée sur une centaine de patients atteints de SN n'a pas révélé de corrélation génotype/phénotypes entre les critères dysmorphiques et la présence de l'une ou l'autre des mutations associées au SN. Ainsi, cela suggère que le phénotype de « dysmorphie faciale » seul ne peut pas prédire le génotype (Allanson et al., 2010).

4. Autres corrélations

Les anomalies hématologiques et la présence de LMMJ telles que nous les avons présentées dans le chapitre I, sont significativement plus fréquentes chez les patients porteurs de mutations sur *PTPN11* comparés aux autres patients (Ko et al., 2008; Yoshida et al., 2004; Zenker et al., 2004). La recherche de mutation de *PTPN11* chez 7 patients SN présentant une LMMJ, s'est révélée positive pour tous les cas (Tartaglia et al., 2003). Dans cette étude, la substitution Thr73Ile (T73I) a été retrouvée et présente chez 2% des patients SN. Cette mutation est présente dans près de la moitié des patients SN avec une LMMJ (Kratz et al.,

2005; Tartaglia et al., 2003). Ces observations suggèrent donc que la présence d'anomalies spécifiques de *PTPN11* permettrait d'identifier le sous-groupe de patients SN à risque de LMMJ.

B. Corrélations Génotype-Phénotype dans les syndromes apparentés au syndrome de Noonan

1. Le syndrome L.E.O.P.A.R.D.

Concernant le SL, les études comparant les mutations de *PTPN11* et les mutations de *RAF1* associées à ce syndrome n'ont pas permis de faire émerger de corrélations génotype-phénotype. Quelques études suggèrent que certaines mutations de *PTPN11* (comme celle conduisant à la substitution T468M), soient associées à une fréquence de retard de croissance plus faible, car seulement deux patients, ayant cette substitution, sur 10 ont été diagnostiqués de petite taille (Digilio et al., 2006; Zenker et al., 2004).

Si l'on compare les mutations SL et SN de *PTPN11*, les mutations SL de *PTPN11* ne provoquent pas une fréquence dans le retard de croissance comparable à celle du SN. En effet, certains estiment la fréquence de ce symptôme à 20% des cas SL ayant une mutation pour ce gène (Digilio et al., 2006; Sarkozy et al., 2004). Actuellement, il n'existe pas de données sur les profils hormonaux de ces patients. Par ailleurs, la fréquence des cardiopathies est identique chez les patients SL et SN porteurs de mutations sur *PTPN11* et est estimée à 80% en moyenne. Cependant, les patients SL et SN ayant *PTPN11* muté se différencient notamment par le type de leurs cardiopathies. En effet, ces patients SL ont une fréquence plus importante pour une HCM (54%, pour le SL versus 8% pour le SN) et une fréquence moins importante pour une sténose de la valve pulmonaire (15% pour le SL versus 66% pour le SN). Comme nous le verrons dans le chapitre III, ces différences pourraient s'expliquer par la nature différente des mutations associées à ces deux syndromes, qui se traduisent par des conséquences fonctionnelles différentes. Alors que ceci pourrait expliquer certaines spécificités phénotypiques, comme les occurrences inversées pour la sténose pulmonaire et l'HCM, cela pose également la question de comprendre comment des mutations aux effets différents, voire opposés, peuvent conduire à des symptômes similaires (pour revue, voir annexe 1 (Edouard et al., 2007a)).

Enfin, dans le cas des mutations de *RAF1*, responsables de 5-15% des cas de SN et de 6% des cas de SL, il apparaît que ces mutations, bien qu'affectant des résidus différents, aient

des conséquences fonctionnelles identiques et soient spécialement associées au développement d'une HCM (Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007).

2. Le syndrome Cardio-Facio-Cutané

Concernant près de 25% des patients CFC, les mutations de *MEK* causent un phénotype plus modéré que celui causé par les autres gènes mutés de ce syndrome. D'un point de vue morphologique, l'hypertélorisme, les anomalies oculaires et les cheveux épars sont des signes moins fréquents chez ces patients. De plus, le retard du développement, tel que l'acquisition de la marche, est modéré contrairement aux mutations des gènes *B-RAF* et *K-RAS*. Les défauts cardiaques, particulièrement ceux de la valve mitrale et du septum, sont plus fréquents chez ces patients (Dentici et al., 2009; Nava et al., 2007).

Il est à noter également que, comparés aux patients SN, les patients CFC, quel que soit l'atteinte génétique, ont une fréquence accrue de difficultés prolongées d'alimentation, d'anomalies du système nerveux central, de convulsions et d'hypoplasie du nerf optique. Ainsi, dans l'étude de Armour *et al.*, 84% des patients CFC présentent au moins un de ces 4 signes et 5% des patients présentent les quatre, ce qui peut aider à distinguer le CFC du SN (Armour and Allanson, 2008).

3. Le syndrome de Costello

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre I, les patients atteints de SC ont une dysmorphie faciale typique et marquée et des difficultés à grossir. De plus, le retard de croissance et le retard mental sont sévères. Ces symptômes, plus sévères que ceux des SN et de ses apparentés, sont causés par les mutations du gène *H-RAS*. Etant donné qu'aucune mutation de *H-RAS* n'ait été retrouvée dans le SN, ni dans ses apparentés, ces caractéristiques typiques du SC pourraient être corrélées aux mutations de ce gène. De plus, les mutations *H-RAS* augmentent l'incidence de tumeurs solides, notamment des rhabdomyosarcomes, des neuroblastomes ou des cancers de la vessie, caractéristique importante de patients SC. Cette incidence est de l'ordre de 15% pour l'ensemble des patients mais varie en fonction du type de mutation : 10% pour les patients présentant la mutation la plus fréquente causant la substitution G12S contre 40% pour ceux présentant la substitution G12A. Ces données justifient un dépistage tumoral systématique chez ces patients en particuliers ceux présentant la mutation G12A. De plus, parmi les 26% des cas ayant une cardiopathie, les patients SC ont majoritairement une HCM (Gripp, 2005).

4. Les « SN-like »

Les syndromes « SN-like » ont des caractéristiques phénotypiques communes aux SN qui nécessitent souvent le cas d'un diagnostic moléculaire pour les distinguer. Cependant, certaines études montrent des différences dans certains traits phénotypiques selon le gène muté. Ainsi, les patients mutés sur le gène *SHOC2* ont le plus souvent des défauts importants de la pigmentation avec de l'eczéma et une tendance au pruritus, des sourcils épars, des ongles fins et dystrophiques. Absents chez les patients SN, ces différents critères retrouvés dans ce « SN-like » pourraient ainsi les distinguer des « vrais » patients SN. Ces patients développent aussi des cardiopathies, le plus souvent des défauts de la valve mitrale et du septum, significativement plus fréquents que chez les SN. Les patients dont le gène *CBL* est muté ont de façon plus variable un retard du développement et de la croissance, une dysmorphie faciale ainsi que des taches « café-au-lait » sur la peau. Ils se distinguent des patients SN notamment par une fréquence plus élevée pour des tumeurs de type myéloïde comme les LMMJ (Perez et al., 2010).

V. Conclusion

Compte-tenu des difficultés de diagnostic clinique chez les patients SN et chez ses apparentés, les outils moléculaires dont nous disposons actuellement ont permis d'apporter une dimension nouvelle au diagnostic de ces patients et de mieux délimiter les pathologies aux traits phénotypiques souvent très similaires. Ainsi, de nombreux gènes ont été identifiés en tant qu'acteurs directs de la voie Ras/MAPK ou en tant que régulateurs de cette voie, mais de manière intéressante appartenant tous à cette dernière. En conséquence, la définition de syndromes Neuro-Cardio-Facio-Cutané tend vers une nouvelle dénomination en rapport avec les gènes identifiés, que sont les « **RASopathies** ». Etant donné que pour certains patients aucun gène n'a été décelé aujourd'hui, cette nouvelle classification pourrait permettre de rechercher d'autres gènes cibles en rapport avec la voie Ras/MAPK. Il n'est pas exclu malgré tout que d'autres gènes non associés à cette voie soient impliqués. Par ailleurs, bien que l'analyse fonctionnelle de la plupart des mutations ait révélé une tendance commune à l'hyperactivation de la voie Ras/MAPK, la variabilité des phénotypes laisse penser que les mutations des différents gènes ne sont pas équivalentes et que, même au sein d'un gène, les différentes mutations puissent causer des perturbations différentes. Des analyses de corrélations génotype/phénotype plus approfondies seront nécessaires pour mieux cerner ces différentes pathologies.

Chapitre III : Rôle physiologiques de SHP2 et conséquences physiopathologiques de ses mutations

La protéine tyrosine phosphatase SHP2 appartient à une famille d'enzymes très conservée au cours de l'évolution, les tyrosines phosphatases, qui jouent des rôles majeurs dans la régulation de la signalisation dépendante des tyrosine kinases. Contrairement aux autres tyrosines phosphatases, qui ont plutôt des fonctions de modulation négative, SHP2 présente la particularité de pouvoir promouvoir diverses voies de signalisation en aval de nombreux récepteurs membranaires. Elle régule ainsi différents processus cellulaires telles que la prolifération, la différenciation ou encore la survie cellulaires. Compte tenu de ses divers rôles, la dérégulation de SHP2, suite à des mutations de son gène, est responsable de différentes pathologies. Ces pathologies incluent le développement tumoral pour les mutations sporadiques et des anomalies du développement comme les syndromes de Noonan et L.E.O.P.A.R.D pour les mutations germinales. Au cours de ces dix dernières années, d'intenses efforts ont été réalisés pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter ces syndromes polymalformatifs, notamment en recherchant les mécanismes moléculaires dérégulés.

Dans ce troisième chapitre, nous ferons tout d'abord une présentation générale de SHP2 en décrivant sa structure, sa fonction et sa régulation puis ses principales fonctions cellulaire et tissulaire. Après avoir précisé les diverses rôles physiologiques de SHP2, nous nous intéresserons plus particulièrement aux fonctions physiopathologiques des mutations de SHP2 responsables des syndromes de Noonan et L.E.O.P.A.R.D.

I. Rôles physiologiques de la tyrosine phosphatase SHP2

A. Généralités

Les phosphorylations et déphosphorylations sur tyrosines sont des modifications post-traductionnelles fondamentales réalisées par des protéines tyrosine kinases et des protéines tyrosines phosphatases, respectivement. Ces modifications ont toutes leur importance car elles permettent la transduction d'un signal extracellulaire vers le noyau de la cellule pour activer l'expression de gènes impliqués dans divers processus biologiques (pour revue, voir (Soulsby and Bennett, 2009)).

Les phosphorylations sur tyrosine ont initialement été découvertes par la mise en évidence d'une activité tyrosine kinase portée par la protéine v-Src, enzyme inductrice de la transformation néoplasique de fibroblastes de poulet, issue du virus du Sarcome de Rous (Hunter and Sefton, 1980; Levinson et al., 1980). Cette activité tyrosine kinase a été décrite par la suite par d'autres auteurs, montrant qu'elle n'était pas restreinte aux enzymes virales, mais pouvait également être portée par des récepteurs membranaires (récepteurs aux facteurs de croissance, aux hormones et aux cytokines) et diverses protéines cytosoliques (Hunter and Sefton, 1980).

Au cours des années 1980, la première tyrosine phosphatase a été découverte lors de la purification et l'isolation de la protéine tyrosine phosphatase (PTP) nommée PTP1B (Tonks et al., 1988). A l'ère du séquençage du génome humain, de nombreuses autres molécules à activité tyrosine phosphatases ont été identifiées et constituent aujourd'hui une nouvelle classe de phosphatases. D'une façon générale, alors que les PTK contrôlent positivement diverses voies de signalisation cellulaire en phosphorylant leurs substrats, les PTP ont un rôle inverse, c'est-à-dire contrôlent négativement ces voies par déphosphorylations de leurs substrats. Un équilibre entre ces deux types d'enzymes est donc essentiel dans le maintien et le contrôle d'une réponse biologique normale.

Une des PTP ayant suscité un intérêt majeur depuis sa découverte, est la protéine **tyrosine phosphatase SHP2**, dont les multiples rôles dans la signalisation cellulaire montrent son importance en tant que régulateur de la réponse biologique. De façon surprenante, cette PTP globalement un rôle positif sur l'activation des voies de signalisation contrairement aux autres membres des PTP. SHP2 fut donc décrite comme la première PTP au rôle positif dans la réponse biologique si bien que certains auteurs la considèrent comme un véritable proto-oncogène.

B. Présentation de SHP2

SHP2 appartient à la superfamille des PTP, qui se caractérise par un motif conservé au cours de l'évolution dans le cœur du domaine catalytique. Ce motif, localisé précisément dans le site actif de l'enzyme a pour séquence consensus HC(X)₅-R où H est une histidine (His), C une cystéine (Cys), (X)₅ une série de 5 acides aminés quelconques et R une arginine (Arg). Plus d'une centaine de PTP ont été retrouvées dans le génome humain et réparties en 4 classes distinctes (classes I à IV) selon leur spécificité de substrat. SHP2 fait partie des PTP de classe I, groupe le plus décrit dans la littérature, qui est lui-même divisé en deux sous-groupes : les PTP classiques ou « classical PTP » transmembranaires et non transmembranaires, qui sont spécifiques des phosphotyrosines et les PTP à double spécificité (ou dual specificity phosphatases, DSP) qui, comme leur nom l'indique, peuvent reconnaître des tyrosines, des sérines/thréonines phosphorylées (Soulsby and Bennett, 2009).

1. Structure de SHP2

SHP2 a été identifiée dans les années 90 par plusieurs auteurs et nommée Syp, SHP-PTP2, SHP-PTP3, PTP1D ou encore PTP2C (Adachi et al., 1992; Ahmad et al., 1993; Feng et al., 1993; Vogel et al., 1993). SHP-2 est une tyrosine phosphatase qui constitue chez les vertébrés avec son homologue SHP-1 (appelée aussi PTP1C, SHPTP-1, ou encore HCP), la famille des PTP classiques non transmembranaires à domaines SH2. Chez les invertébrés, seule SHP2 partage des homologies de séquences avec ses orthologues Ptp-2 (*C. elegans*) et Corkscrew (ou Csw, *Drosophila melanogaster*) (Perkins et al., 1992). Alors que SHP1 est exprimée majoritairement au niveau des cellules hématopoïétiques, SHP2, quant à elle, est retrouvée de manière ubiquitaire (Feng and Pawson, 1994; Neel, 1993).

SHP2 est codée par le gène *PTPN11* (Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type, 11) localisé sur la région chromosomique 12q24. Ce gène fait partie des 37 gènes représentant la famille des PTPs classiques humaines. Il est composé de 16 exons : l'exon 1 contient le codon 5'-UTR et le codon ATG d'initiation de la traduction et quelques codons additionnels. Le codon stop est porté par l'exon 15, tandis que l'exon 16 contient une grande partie de la portion 3'-UTR. D'autres éléments du gène *PTPN11* tels que la région promotrice et des éléments « enhancers » ont été découverts mais n'ont pas été délimités à ce jour (Figure 18 (A)).

SHP2 est composée de deux domaines SH2 (N-SH2 et C-SH2) en N-terminal, suivis d'un domaine catalytique et d'une queue C-terminal. Les domaines SH2 sont des domaines

d'interaction protéine-protéine présentant une forte affinité pour des phosphotyrosines spécifiques présentes sur les récepteurs membranaires ou sur des protéines adaptatrices. De plus, les domaines SH2 de SHP2 lui permettent d'être recrutée auprès de complexes de signalisation contenant certains motifs phosphotyrosines. Comme nous le verrons plus loin, ces domaines SH2 ont également un rôle important dans la régulation de l'activité de la phosphatase. Sur la queue C-terminal siègent des sites de phosphorylation portés par des tyrosines et des sérines. Ces résidus souvent sont souvent décrits comme des sites de régulation de l'activité de l'enzyme, mais leur rôle n'est pas encore bien compris. Sont aussi retrouvés en C-terminal, des motifs riches en proline constituant des sites d'ancrage de protéines portant des domaines SH3, comme Grb2 (Adachi et al., 1996; Neel et al., 2003b; Rosario and Birchmeier, 2003) (Figure 18 (B)).

Les premières images de cristallographie de SHP2 ont montré l'organisation tridimensionnelle des différents domaines de l'enzyme. Les deux domaines SH2 entourent le domaine PTP. Le domaine PTP a une structure en 9 hélices α et en 14 feuillets β , qui présente une forte ressemblance avec le domaine PTP de PTP1B (Feng and Pawson, 1994; Neel, 1993). Le site catalytique est constitué par le regroupement de 3 boucles de l'enzyme, les boucles pTYR, PTP et WPD. La boucle PTP contient le motif du site actif où la cystéine 459 (cys459) permet la catalyse enzymatique. La boucle pTYR contient principalement le résidu tyrosine 279 (tyr279) qui définit la profondeur de la poche catalytique et contribue ainsi à la sélection des substrats phosphorylés sur des tyrosines. En effet, cette profondeur ne permet pas aux résidus phosphorylés sur sérine et thréonine d'être reconnus car ils sont trop courts pour atteindre la cystéine (cys459) critique pour la catalyse enzymatique, située au fond de la poche. La boucle WPD est composée principalement par les acides aminés tryptophane (trp), proline (pro) et aspartate (asp) et permet la libération du substrat suite à la catalyse enzymatique (Figure 18 (C)). Notons ici, Notons ici que la cystéine C459 de la poche du site actif de l'enzyme est un élément clé de la catalyse des résidus phosphotyrosines. Aussi, des mutations ponctuelles ont été générées *in vitro*, en changeant la cystéine par une sérine (mutant C459S) ou par une glycine, mutant (C459G), afin d'obtenir une phosphatase catalytiquement inactive. Ces mutants ont servi dans l'étude de la fonction biologique de SHP2 pour décrypter les mécanismes moléculaires dans lesquels la phosphatase est impliquée, que nous citerons dans la deuxième partie de ce chapitre.

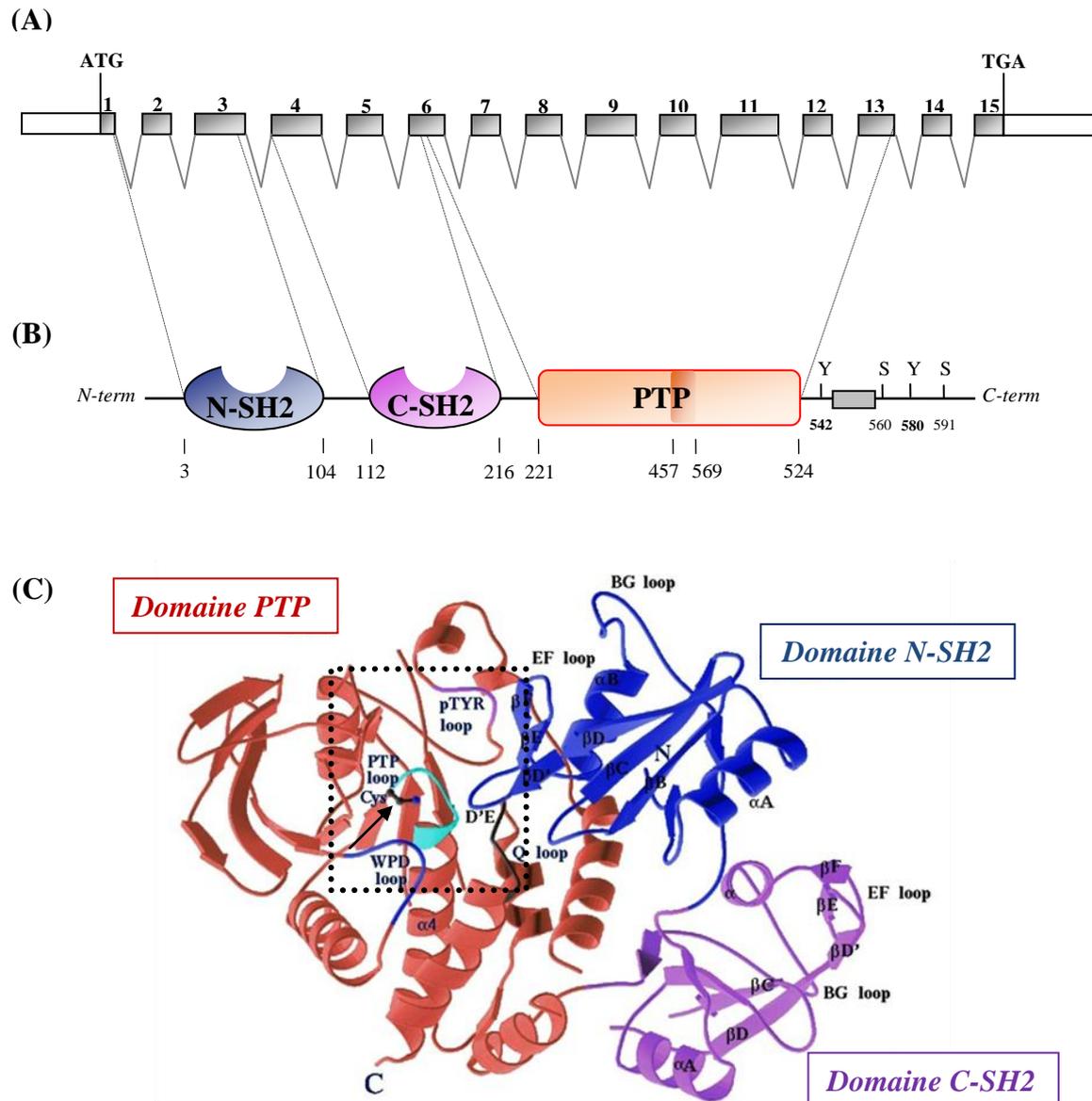


Figure 18 : Représentation schématique de SHP2 : organisation de son ADN codant (A), de sa structure (B) et de sa conformation protéique (C).

Les exons de *PTPN11* sont représentés par des rectangles noirs et numérotés (A). La correspondance avec les domaines N-SH2, C-SH2 et PTP est en rouge, bleu et violet, respectivement (B). Les différentes boucles (« loop ») impliquées dans la catalyse sont représentées. Le site actif est délimité par un rectangle noir en pointillé sur le schéma. La cystéine catalytique (cys459) est indiquée par la flèche noire (C).

2. Activation de SHP2

L'activation de SHP2 est caractérisée par un changement de conformation dynamique et réversible. Elle est souvent considérée comme un véritable « switch » moléculaire en réponse aux signaux extracellulaires.

A l'état basal, le domaine N-SH2 interagit avec le domaine PTP en s'insérant dans la poche du site actif mais les mécanismes responsables de cette régulation intramoléculaire ne sont pas encore bien connus. Néanmoins, l'interaction entre ces deux domaines empêche le substrat d'interagir avec le site actif de l'enzyme. Cette interaction intramoléculaire donne à SHP2 une conformation dite auto-inhibée ou dite « fermée ». Lors de divers stimuli, les protéines impliquées dans l'activation de SHP2 sont phosphorylées sur tyrosines et ces phosphotyrosines interagissent avec les domaines SH2 de SHP2. Cette liaison induit un changement de sa conformation d'une conformation « fermée » à une conformation active dite « ouverte », levant ainsi son auto-inhibition et permettant l'accès des substrats au site catalytique (Barford and Neel, 1998; Hof et al., 1998) (Figure 19).

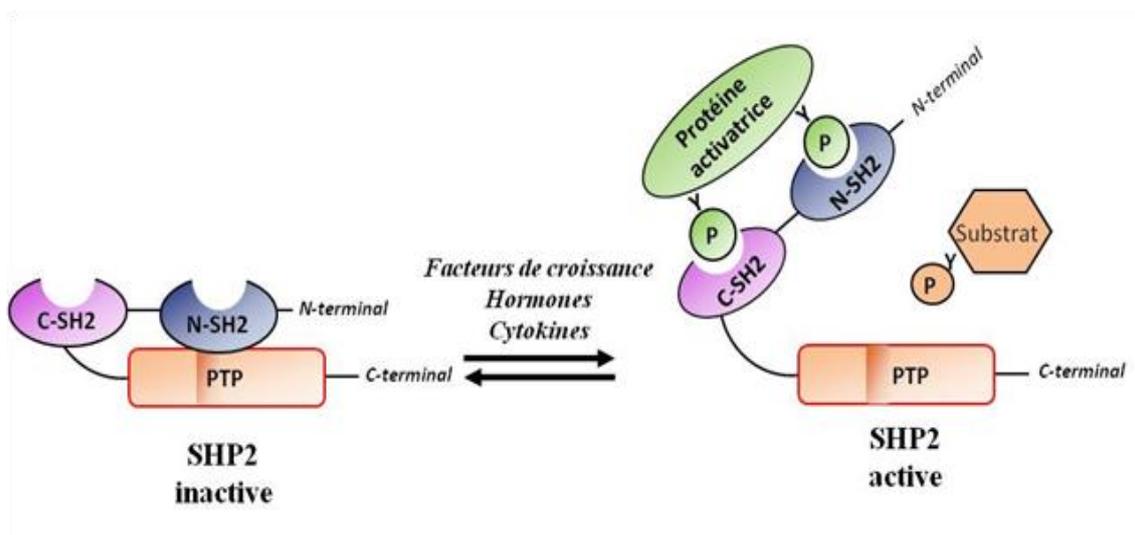


Figure 19 : Représentation schématique de l'activation de SHP2

Les domaines N-SH2 sont importants dans l'activation de SHP2. En effet, le dosage de l'activité de SHP2 par l'utilisation de peptides reconstitués portant une ou deux phosphotyrosines *in vitro*, a été montré que SHP2 est plus active lorsque les deux domaines SH2 sont liés aux phosphotyrosines (Keilhack et al., 2005b). Cette interaction peut moduler la relocalisation de la phosphatase, donc son recrutement, et participer ainsi à sa spécificité pour

ses substrats (Hadari et al., 1998; Maroun et al., 2000; Rosario et al., 2007; Schaeper et al., 2000).

D'autres mécanismes d'activation de SHP2 ont été proposés. Certains ont montré l'importance des tyrosines 542 et 580 sur la queue C-terminal de l'enzyme. Ainsi, l'utilisation de techniques de ligation de protéines *in vitro* qui consistent à remplacer ces tyrosines par des mimétiques de phosphotyrosines non hydrolysables, a mis en évidence une augmentation de l'activité catalytique de deux à trois fois par rapport à son activation basale pour chaque tyrosine (Lu et al., 2001). Ceci suggère que la phosphorylation sur tyr 542 et tyr 580 favorise l'activité de la phosphatase. *In vivo*, il est possible que ces effets ne soient pas retrouvés car cette phosphorylation peut être transitoire et parce que SHP2 peut s'auto-déphosphoryler rapidement après son activation.

3. Régulation de SHP2

Une régulation négative de l'activation de SHP2 peut s'opérer sur les différents aspects de son activation, notamment par déphosphorylation de ses sites de recrutement (Neel et al., 2003b). De plus, l'activité de SHP2 peut être régulée par des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Intermediates, ROIs) qui sont produites lors de stress oxydatifs cellulaires. Une étude a montré une régulation négative et transitoire de l'activité de SHP2 par les ROIs dans des cellules de rats en réponse au PDGF (Meng et al., 2002).

Enfin, des études réalisées à partir de cellules phéochromocytomes de rat (PC12) et stimulées par l'Epidermal Growth Factor (EGF), ont conduit à la découverte de phosphorylations sur sérine(s) mais aussi sur thréonine(s) portées par SHP2. Ces résidus pourraient être phosphorylés, suite à une stimulation par l'EGF, par les MAPK, constituant une boucle de contrôle négatif de SHP2 par cette voie de signalisation (Peraldi et al., 1994).

C. Fonction de SHP2 dans la régulation de différentes voies de signalisation

1. Rôles de SHP2 dans la voie Ras/MAPK

Un très grand nombre d'études génétiques et biochimiques attribuent à SHP2 un rôle positif dans l'activation de la voie Ras/MAPK induite par de multiples agonistes agissant via des RTKs, des récepteurs aux cytokines, des RCPG et bien d'autres, et ce dans une large variété de types cellulaires. Bien que le rôle positif de SHP2 dans l'activation de la voie Ras/MAPK soit bien établi de nos jours, les mécanismes moléculaires permettant cette activation sont nombreux et parfois contradictoires.

a) *SHP2, un adaptateur protéique pour l'activation de Ras/MAPK ?*

Il a été proposé que les tyr542 et tyr580 présentes dans le domaine C-terminal de SHP2 puissent constituer des sites de recrutement pour le module Grb2/Sos1. En effet, la tyrosine 542, phosphorylée notamment sous stimulation par le PDGF, est contenue dans une séquence consensus de liaison pour Grb2, suggérant que ce site permettrait le recrutement du module Grb2/Sos1, et donc l'initiation de la voie Ras/MAPK (Bennett et al., 1994; Li et al., 1994). Vogel *et al.*, quant à eux, ont proposé comme site majeur de recrutement du module Grb2/Sos1, la tyr580 qui peut être phosphorylée en réponse à l'EGF ou au PDGF. (Vogel and Ullrich, 1996).

Bien que les phosphorylations de ces tyrosines de SHP2 soient décrites en réponse à de nombreux agonistes et puissent favoriser le recrutement de Grb2, Araki *et al.* ont montré que la phosphatase pouvait être phosphorylée en réponse à certains agonistes (FGF, PDGF) mais pas en réponse à d'autres, comme l'EGF. Ces données suggèrent qu'au moins sous EGF, SHP2 favorise l'activation de Ras/MAPK indépendamment de son rôle d'adaptateur (Araki et al., 2003). De plus, ces mêmes auteurs en utilisant des mutants non phosphorylables de SHP2 ont montré que ces sites étaient importants dans l'activation des MAPK induite par le PDGF et le Fibroblast Growth Factor (FGF) mais que cet effet était indépendant de la capacité à lier Grb2 (Araki et al., 2003). Ceci pourrait s'expliquer par un effet d'auto-inhibition de SHP2, par interaction des phosphotyrosines 542 et 580 avec ses domaines N-SH2 et C-SH2 comme nous l'avons évoqué plus haut.

Enfin, en aval des récepteurs aux cytokines (e.g. gp130), SHP2 pourrait être phosphorylée par les protéines Janus Kinases (JAK) et recruter le module Grb2/Sos1 initiant ainsi la voie Ras/MAPK. Il a été montré que cette activation conduirait à la différenciation des cellules souches embryonnaires (ES) murines par l'inhibition des facteurs de prolifération *Tbx3* et *Nanog* par les MAPK (Hamazaki et al., 2006; Niwa et al., 2009).

b) *Activation de Ras/MAPK par l'activité phosphatase de SHP2 ?*

La diminution de l'activation de la voie Ras/MAPK lors de la surexpression de formes catalytiquement inactives de SHP2 dans divers types cellulaires suggère qu'il existe des substrats de SHP2 impliqués dans l'activation de cette voie.

Un des premiers substrats de SHP2 identifié et impliqué dans l'activation de la voie Ras/MAPK est une glycoprotéine transmembranaire, Shp Substrate-1 (SHPS-1), membre de

la famille des Signal Regulatory Protein (SIRP). En présence de stimuli, le domaine intracellulaire des SHPS-1 est phosphorylé, notamment sur tyrosines, servant de points d'ancrage pour SHP2. Une fois recrutée par SHPS-1, SHP2 peut à son tour agir sur SHPS-1 (Fujioka et al., 1996). Le rôle fonctionnel des SIRP dans la régulation de Ras/MAPK reste encore très controversé. Cependant, des études attribueraient un rôle négatif de SHPS-1 dans la croissance et la prolifération cellulaires en réduisant l'activation des MAPK en réponse à l'EGF ou l'insuline (Inagaki et al., 2000; Kharitononkov et al., 1997), alors que d'autres ont proposé un rôle positif de SHPS-1 dans l'activation des MAPK en réponse à l'IGF-I (Lieskovska et al., 2006). De plus, il a été proposé que SHPS-1 agisse comme un adaptateur et activateur de SHP2 favorisant ainsi le recrutement de SHP2 à proximité des autres acteurs de la voie Ras/MAPK. L'interaction SHPS-1/SHP2 permettrait de lever l'auto-inhibition de SHP2 et d'activer ainsi la phosphatase. Une fois active, SHP2 pourrait déphosphoryler SHPS-1 pour s'en dissocier et agir sur d'autres cibles, comme les kinases Src.

c) SHP2 et régulation des protéines Sprouty dans l'activation de Ras/MAPK

Des premières études ont montré que SHP2 serait capable d'agir directement sur Spry en la déphosphorylant, ce qui favoriserait la dissociation du complexe Grb2/Spry en réponse au FGF (Hanafusa et al., 2002). Ainsi libéré du complexe, Grb2 pourrait venir s'associer avec la protéine adaptatrice FRS2 maintenant l'activation des MAPK (Hanafusa et al., 2004). De plus, Tefft *et al.*, retrouve également ce modèle à partir d'explants de poumons de souris dans lesquels SHP2 favorise l'activation de la voie Ras/MAPK par la déphosphorylation de Spry (Tefft et al., 2005; Tefft et al., 2002). Ces observations sont aussi retrouvées chez les invertébrés. En effet, l'utilisation d'une forme substrat trappeur de Csw (orthologue de SHP2, chez la drosophile) montre que Spry se lie à Csw dans des cellules de drosophile cultivées et que cette liaison est nécessaire au développement de l'œil (Jarvis et al., 2006). Récemment, ce modèle d'activation a été retrouvé dans des cellules souches embryonnaires de souris, dans lesquelles SHP2 activerait la voie Ras/MAPK en déphosphorylant l'isoforme Spry1. La régulation de Spry1 par SHP2 serait ainsi essentielle dans la différenciation de ces cellules (Jung et al., 2011).

Ces différentes études permettent de proposer Spry comme une cible de SHP2, permettant l'activation de la voie Ras/MAPK.

d) Activation de Ras/MAPK par l'exclusion de RasGAP ?

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre II, la voie Ras/MAPK est régulée négativement par les protéines GAP, notamment la p120RasGAP. Une des hypothèses expliquant l'effet activateur de SHP2 sur cette voie serait une inhibition de ce régulateur négatif de Ras.

Des premières études réalisées chez la drosophile ont mis en évidence que Csw déphosphorylerait préférentiellement les sites de liaison de l'orthologue de RasGAP sur *Torso*, orthologue du PDGFR. Ces observations permettent de faire un lien entre SHP2 et l'activation des MAPK via RasGAP (Cleghon et al., 1998). Plus tard, ce mécanisme a été également proposé dans différents types de cellules de mammifères. En effet, il a été montré que SHP2 déphosphorylerait l'EGFR sur un site de liaison à RasGAP. Cette déphosphorylation empêcherait le recrutement de l'inhibiteur avec pour conséquence une activation accrue de la voie Ras/MAPK (Agazie and Hayman, 2003). Cependant, la démonstration d'une interaction directe entre RasGAP et l'EGFR n'a pas été réalisée car elles sont difficiles à mettre en œuvre.

Un autre modèle faisant un lien entre SHP2 et RasGAP a été proposé dans notre laboratoire. Il a été montré que SHP2 déphosphorylerait les sites de recrutement de la p120RasGAP portés par un des substrats majeurs de SHP2, la protéine adaptatrice Gab1, en réponse à l'EGF. Cette déphosphorylation limiterait la relocalisation de RasGAP à la membrane, l'excluant ainsi du complexe de signalisation, et la maintiendrait éloignée de Ras, permettant ainsi une pleine activation de la voie Ras/MAPK (Montagner et al., 2005b). De plus, ce modèle a été retrouvé lors d'une étude réalisée *in vivo*. Dans cette étude, les auteurs ont retrouvé une proportion accrue de RasGAP dans la fraction membranaire d'hépatocytes murin délétés pour SHP2, lesquels présentent un défaut d'activation de la voie Ras/MAPK (Bard-Chapeau et al., 2006).

Ces différentes études mettent en avant un rôle de régulateur positif de SHP2 dans l'activation de la voie Ras/MAPK en empêchant l'action de RasGAP, inhibiteur naturel de Ras.

e) Nouveau partenaire de SHP2 dans l'activation de Ras/MAPK : les protéines

Src

Il a été montré que SHP2 pouvait activer la voie Ras/MAPK par l'intermédiaire des protéines de la famille des Src kinases ou Src Family Kinases, SFK. Parmi elles, on retrouve les kinases ubiquitaires Src, Fyn et Yes, impliquées dans l'adhésion cellulaire et dont les dérégulations sont responsables de nombreuses tumeurs chez l'homme.

Des études ont suggéré que SHP2 agirait en amont des SFK ou sur leurs régulateurs pour favoriser l'activation des MAPK. Les SFK sont maintenues dans un état inactif par phosphorylation de leur tyrosine 527 par les kinases C-terminal Src kinase (Csk) et par leur homologue Csk Homologous kinase (CHK). Ces régulateurs négatifs des SFK sont activés par l'interaction de leur domaine SH2 à des protéines adaptatrices activées sur phosphotyrosines, telles que la paxilline et le complexe Cbp/PAG. SHP2 serait capable de déphosphoryler Cbp/PAG, diminuant le recrutement de Csk et favorisant ainsi l'activation des SFK (Zhang et al., 2004c). Une autre étude récente a retrouvé un rôle de SHP2 dans l'activation des Src, en montrant que SHP2 déphosphoryle directement la kinase Lyn sur sa tyrosine inhibitrice (tyr507) dans des cellules myéloïdes en aval des récepteurs au Granulocyte-Colony stimulating factor, G-CFS (Futami et al., 2011).

Bien que le rôle de SHP2 en aval de Src semble émergé, les mécanismes reliant Src et la voie Ras/MAPK sont contradictoires. Certains ont proposé une interaction de Src avec les protéines adaptatrices telles que Gab1, lesquelles sont impliqués dans l'activation de la voie Ras/MAPK. Ces adaptateurs phosphorylés, pouvant lier Grb2, mèneraient ainsi au recrutement du module Grb2/Sos1 (Bromann et al., 2004). Par ailleurs, Bivona *et al.*, ont montré que l'activation de la Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), un substrat de Src, permettrait la translocation d'une GEF, similaire à Sos1, nommée RasGRP1, vers l'appareil de Golgi où elle serait capable d'activer Ras, phase initiale de l'activation des MAPK (Bivona et al., 2003). De plus, Zhang *et al.*, ont observé que la PLC γ 1 et l'activation de Ras dans l'appareil de Golgi étaient perturbées dans des fibroblastes délétés pour SHP2. Ceci suggère que l'effet positif de SHP2 sur la voie MAPK serait facilité par la capacité de SHP2 à activer Src, laquelle en retour stimule l'activation de Ras dans le Golgi au travers de PLC γ 1 et de RasGRP1 (Zhang et al., 2004c).

2. Rôles de SHP2 dans l'activation de PI3K

D'autres voies de signalisation sont modulées par SHP2 comme la voie PhosphoInositide-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt) qui régule notamment les processus de survie cellulaire. Selon le récepteur, SHP2 module différemment l'activation de la voie PI3K/Akt. Sous EGF, il a été montré que SHP2 déphosphoryle les sites de liaison de la sous-unité régulatrice p85 de PI3K sur l'adaptateur Gab1 dans des fibroblastes de souris immortalisés où *ptpn11* a été invalidé. Cette déphosphorylation empêche PI3K de se lier à Gab1, inhibant ainsi la voie PI3K/Akt (Zhang et al., 2002b). A l'inverse d'autres ont proposé un rôle positif de SHP2 dans l'activation de cette voie. Ainsi, en réponse à l'insuline, Ugi *et al.* ont observé que l'activation de PI3K/Akt était atténuée dans des cellules exprimant un mutant inactif de SHP2 (Ugi et al., 1996).

Le rôle de régulateur négatif et/ou positif de SHP2 dans l'activation de PI3K/Akt reste une des énigmes des plus intéressantes dans la compréhension du mécanisme d'action de la phosphatase dans la signalisation cellulaire. Une des hypothèses qui pourrait expliquer cette différence de réponse serait des interactions entre les voies PI3K/Akt et Ras/MAPK, comme cela a déjà été proposé (Wang et al., 2009).

3. Rôles de SHP2 dans l'activation du module JAK/STAT

La voie JAnus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT), est activée principalement en aval des récepteurs à cytokines et hormones. Ces récepteurs, dépourvus d'activité tyrosine kinase intrinsèque, agissent en activant les kinases JAK qui leur sont associées. Une fois activée, JAK phosphoryle le récepteur sur des résidus spécifiques, permettant le recrutement et l'activation par phosphorylation et dimérisation des facteurs de transcription STAT. STAT dimérisé quitte le récepteur et transloque jusqu'au noyau afin d'activer ses gènes cibles (Xu and Qu, 2008). La signalisation des récepteurs aux cytokines ou hormones est contrôlée notamment par les suppresseurs de signalisation des cytokines (Suppressors Of Cytokine Signaling, SOCS), protéines non-transmembranaires à domaines SH2 impliquées dans la régulation négative de la voie JAK/STAT.

Les rôles de SHP2 dans la régulation de la voie JAK/STAT ne sont pas encore bien définis et souvent contradictoires car les études sur les mécanismes moléculaires sont encore très discutées.

a) Régulation négative de JAK/STAT via SHP2 ?

Plusieurs études montrent un rôle négatif de SHP2 dans l'activation de la voie JAK/STAT, notamment en réponse aux interférons (INF). Il a été montré que dans des fibroblastes murins où *ptpn11* a été délété, les isoformes STAT1 et STAT2 sont hyperphosphorylées sous l'action de INF- γ et INF- α , ce qui entraînerait la mort de ces cellules. Ceci suggère que SHP2 jouerait un rôle négatif dans l'activation de STAT1 et STAT2 mais positif pour la survie de ces cellules (You et al., 1999). De plus, une autre étude a rapporté qu'en réponse à INF- α , la phosphorylation sur la tyr701, qui permet la dimérisation de STAT, serait favorisée et maintenue dans des fibroblastes murins délétés en SHP2 (Wu et al., 2002). D'autres auteurs ont retrouvé ce modèle moléculaire à partir d'études biochimiques, montrant que STAT1 serait déphosphorylée par SHP2, notamment sur sa tyrosine 701. Ces différentes données suggèrent que SHP2 régulerait négativement la voie JAK/STAT induite par INF, en déphosphorylant STAT1 (Shuai and Liu, 2003).

D'autres isoformes de STAT peuvent être déphosphorylées par SHP2. En effet, des études biochimiques utilisant des dosages d'activité tyrosine phosphatase, ont montré que SHP2 déphosphorylerait l'isoforme STAT5a (Chen et al., 2004; Chen et al., 2003; Yu et al., 2000). Certains auteurs ont montré qu'un mutant substrat trappeur de SHP2 (C459S), s'associait avec les phosphotyrosines de STAT5 suggérant que STAT5 soit un substrat de SHP2 (Chen et al., 2003; Yu et al., 2000). De plus, la surexpression de SHP2 dans des cellules Ba/F3 et dans des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, induirait une déphosphorylation plus rapide de STAT5 en réponse à l'IL-3, alors que dans les cellules déficientes en SHP2, cette déphosphorylation serait retardée (Chen et al., 2004; Chen et al., 2003). Il a également été démontré que SHP2 pouvait réguler négativement l'activation de STAT3 en déphosphorylant la tyrosine 759 du récepteur gp130, impliquée dans son activation (Ohtani et al., 2000).

D'autres études ont renforcé l'idée d'une régulation négative de SHP2 sur les protéines STAT. Ainsi, des cellules ES murines délétées pour SHP2 ont montré un défaut de différenciation et un auto-renouvellement plus efficace en présence du LIF, dû à une augmentation de l'activité de STAT3 (Chan et al., 2003; Qu and Feng, 1998). Ce modèle de régulation négative de STAT3 par SHP2 est retrouvé dans des expériences *in vivo* faites à partir de souris pour lesquelles *ptpn11* a été délété dans les cellules neuronales (Ke et al., 2007; Zhang et al., 2004b).

Le rôle négatif de SHP2 a également été retrouvé dans la voie JAK/STAT induite par GH. Une des premières évidences du rôle de SHP2 dans la réponse à GH a été montrée dans des fibroblastes (NIH-3T3F442A) de souris exprimant de manière endogène le GHR. Dans cette étude leurs auteurs ont montré que SHP2 s'associe avec le domaine intracellulaire du GHR sur des tyrosines spécifiques en réponse à GH. De plus, SHP2 serait à son tour phosphorylée et activée en présence ou en l'absence des adaptateurs IRS-1 et IRS-2. Elle inhiberait ainsi la voie JAK2/STAT5 en réponse à GH (Kim et al., 1998). Ces observations ont été retrouvées lors d'expériences pour lesquelles les sites de liaison de SHP2 sur le GHR ont été mutés empêchant ainsi son recrutement et augmentant l'activation de la voie JAK2/STAT5 (Stofega et al., 2000).

b) Régulation positive de JAK/STAT via SHP2 ?

A l'inverse des études décrites ci-dessus, de nombreuses données sont plutôt en faveur d'un effet positif de SHP2 dans l'activation de la voie JAK/STAT. Une des évidences les plus marquées a été décrite à partir de cellules de la glande mammaire de souris délétées pour SHP2. De manière surprenante, les auteurs ont montré une suppression de l'activité de STAT5 dans ces cellules (Ke et al., 2006b). Ces observations suggèrent que SHP2 jouerait un rôle positif dans l'activation de JAK2 induite par la prolactine. Par ailleurs, des auteurs ont montré que dans des cellules souches embryonnaires (ES) hématopoïétiques de souris délétées pour *ptpn11*, l'activation de JAK2 serait abolie et par conséquent, la phosphorylation de STAT5, substrat de JAK2, serait absente dans ces cellules (Yu et al., 2003). En outre, l'expression d'un mutant catalytiquement inactif de SHP2 a révélé une inhibition de la phosphorylation sur STAT5 résultant d'un défaut de déphosphorylation de JAK2 sur sa tyrosine inhibitrice (Berchtold et al., 1998). D'un point de vue mécanistique, des études in vitro ont montré que SHP2 serait capable de déphosphoryler la tyrosine 1007 de JAK2, impliquée dans son association avec SOCS1, bloquant ainsi la formation du complexe JAK2/SOCS1 et de surcroît la dégradation de JAK2 (Tomic et al., 1999). (Ali et al., 2003). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence une interaction entre SHP2 et le complexe JAK2/PRLR nécessaire à l'activation de STAT5. De plus, il a été montré que SHP2 partagerait les mêmes sites de liaison pour gp130 que SOCS3, entrant donc en compétition avec cette dernière (De Souza et al., 2002; Nicholson et al., 2000).

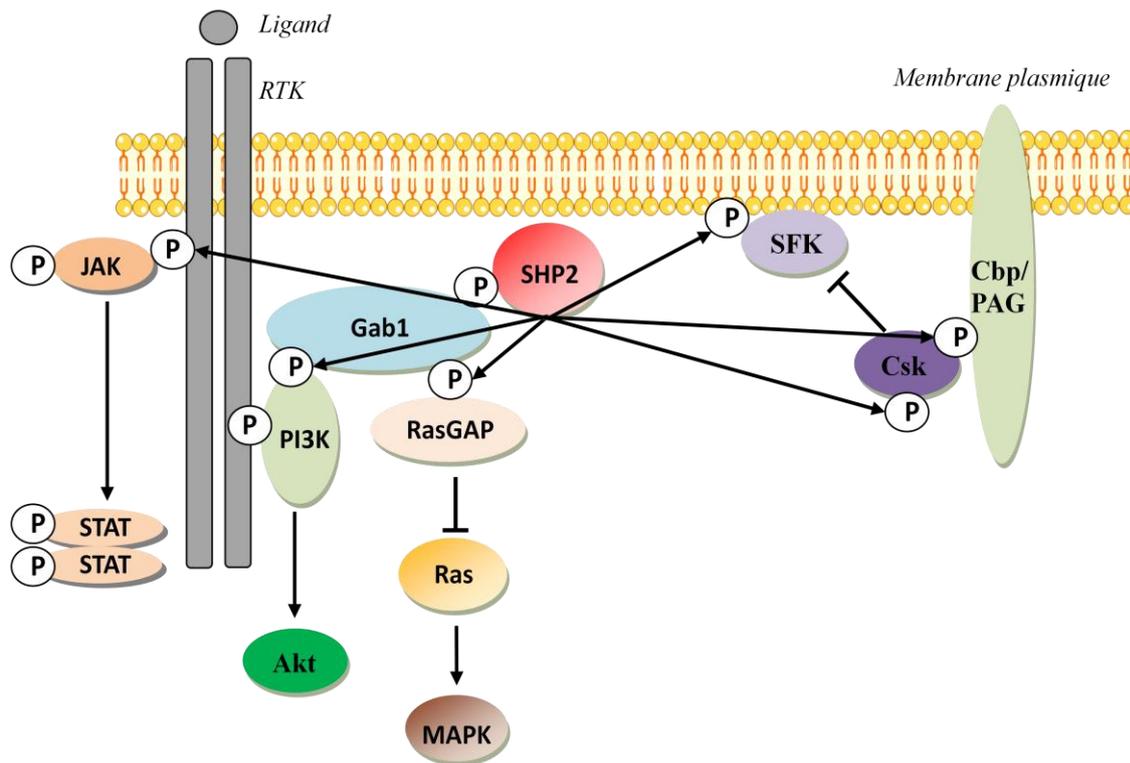


Figure 20 : Multiples rôles de SHP2 dans la régulation de différentes voies de signalisation.

D. Fonctions biologiques de SHP2 sur le développement : les modèles animaux

Les études réalisées *in cellulo* caractérisent un nombre conséquent de mécanismes où SHP2 joue des rôles importants, souvent différents selon le type et le contexte cellulaires, comme nous venons de le voir. Les rôles physiologiques de SHP2 proposés à partir de ces modèles sont encore controversés et ne permettent pas de conclure sur la réelle implication de SHP2 sur le développement. Ainsi, l'utilisation de modèles intégrés s'est avérée être nécessaire pour la caractérisation des rôles physiologiques de la phosphatase. Les modèles d'invertébrés (*Drosophila melanogaster*, *C. elegans*), et de vertébrés non humains (*Danio rerio*, *Mus musculus*, *Xenopus*) dans lesquels la fonction de SHP2 a été altérée, ont permis de réaliser des avancées majeures pour comprendre les fonctions biologiques de SHP2 rejoignant, pour certaines, les études faites *in cellulo*.

1. SHP2 et ses fonctions embryologiques chez les invertébrés

Différentes études ont été menées sur des souches mutantes de drosophile dans lesquelles le gène codant pour Csw a été muté. Elles ont montré que Csw est requis pour la transduction du signal en aval du récepteur Torso, intervenant dans l'axe antéro-postérieur de l'embryon de drosophile (Perkins et al., 1996; Perkins et al., 1992). Les effets des mutations gain de fonction de Torso, sont supprimés par les mutations perte de fonction, inhibitrices, de Csw, montrant que Csw agit en aval de Torso (Johnson Hamlet and Perkins, 2001). Il a été également montré que Csw agit de concert avec l'isoforme D-Raf, partenaire de la voie Ras/MAPK pour contrôler l'expression de gènes impliqués dans la formation des structures terminales de l'embryon de drosophile (Johnson Hamlet and Perkins, 2001). De plus, le développement normal des cellules photoréceptrices R7 nécessite l'intervention de Csw en aval du récepteur Sevenless (RTK). En effet, en l'absence de Sevenless fonctionnel, la surexpression de Csw est suffisante pour restaurer le développement de ces cellules photoréceptrices. D'un point de vue mécanistique, Csw agirait soit en aval de Ras1 soit de concert avec Ras1 et Raf pendant la détermination du devenir des photorécepteurs (Johnson Hamlet and Perkins, 2001).

La perte de fonction de *ptp-2*, homologue de SHP2 chez *C. elegans*, par délétion du domaine PTP résulte en des défauts de l'oogenèse. En surexprimant des formes hyperactivatrices d'effecteurs de la voie Ras/MAPK comme *let-60* (orthologue de Ras), l'oogenèse serait restaurée (Gutch et al., 1998). Comme les études faites sur des cellules murines ou humaines, ces observations indiquent que *ptp-2* agirait en amont ou en parallèle de *let-60*. Ainsi chez les invertébrés *D. melanogaster* et *C. elegans*, SHP2 est un activateur essentiel de la voie Ras/MAPK qui participe à un développement normal de ces deux espèces.

2. Impact de l'invalidation totale de SHP2 chez les vertébrés

Différentes études ont mis en évidence un rôle majeur de SHP2 au cours du développement des vertébrés, lors de l'embryogénèse mais aussi lors du développement post-embryonnaire.

L'invalidation de SHP2 dès les premiers stades du développement embryonnaire cause des défauts de la gastrulation conduisant à une létalité précoce de l'embryon (Saxton et al., 1997). Ces observations permettent d'attribuer à cette protéine, un rôle fondamental dans cette période prénatale (Tang et al., 1995; Yang et al., 2006). Chez le poisson zèbre, l'injection de

morpholinos inhibant l'expression de SHP2 au cours de l'embryogénèse, engendre des défauts sévères sur le développement de l'embryon. Cette inhibition causerait des défauts des mouvements cellulaires pendant la gastrulation lors de la convergence et de l'extension de l'embryon (Jopling et al., 2007b).

L'inactivation de SHP2 dans des embryons de xénope par l'injection de variants d'ARNm codant pour la forme inactive de SHP2, participerait à la formation de formes tronquées de l'embryon. Dans cette étude, la voie Ras/MAPK est hypoactivée en réponse au FGF β (Nutt et al., 2001).

Chez la souris *Mus musculus*, l'inactivation de SHP2 par épissage de l'exon 2 ou de l'exon 3 (perte du domaine N-SH2 de la phosphatase), a des conséquences fatales sur la survie des ces embryons. Ils meurent dès les premiers stades du développement, lors de la gastrulation, n'atteignant pas la phase implantatoire (Saxton et al., 1997). Des anomalies ont été observées comme une mortalité des cellules au niveau de la masse interne du blastocyste, une apoptose rapide des cellules du trophoblaste et des cellules souches (Yang et al., 2006). Il apparaît que dans les cellules trophoblastiques délétées de SHP2, la protéine adaptatrice FRS2 est constitutivement phosphorylée en réponse au FGF4, causant un défaut dans l'activation de la voie Src/Ras/Erk. Il a été proposé que l'absence d'activation de Erk causée par la perte de SHP2, empêche le contrôle négatif du facteur pro-apoptotique, Bim, résultant en une apoptose massive des cellules (Yang et al., 2006).

De plus, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre SHP2 ou encore d'inhibiteurs de SHP2 de petits poids moléculaires, a révélé que les cellules souches dans les trois feuilletts embryonnaires ne se différencient plus. Ceci suggère que SHP2 permettrait ainsi le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires murines (Wu et al., 2009).

3. Impact de l'inactivation tissu-spécifique de SHP2 chez les vertébrés

Comme mentionné plus haut, l'inactivation totale de SHP2 causant une létalité précoce des embryons de différents modèles animaux, est incompatible avec l'étude de ses fonctions biologiques au-delà des premiers stades du développement embryonnaire. Pour contrecarrer cette létalité précoce, différents groupes ont généré des modèles murins, pour lesquels le gène *ptpn11* portent des sites loxP. Ces souris sont ensuite croisées avec des souris transgéniques exprimant de façon tissu-spécifique l'enzyme recombinase Cre. Les souris issues de tels croisements n'expriment plus SHP2 dans le tissu ciblé, et permettent ainsi de

caractériser la fonction biologique de SHP2 dans ce tissu. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, les études de ces souris ont confirmé un rôle essentiel de SHP2 dans le bon fonctionnement de la transduction du signal dans de multiples tissus. Par ailleurs, récemment des auteurs ont mis au point une invalidation totale de *ptpn11* de manière inductible dans un modèle murin adulte (Bauler et al., 2011). Ainsi, cette nouvelle stratégie a permis d'apporter de nouvelles informations sur le rôle de la phosphatase à grande échelle.

a) *SHP2 et ses fonctions embryonnaires*

Les cellules souches de la crête neurale constituent une population transitoire multipotente, participant au développement de multiples organes tels que le cœur, le muscle squelettique cranio-facial, le cartilage et l'os, le système nerveux central, les cellules de la peau, de la glande adrénale, des neurones et des cellules gliales. Ainsi, le modèle murin Wnt1-Cre-SHP2 permettant d'invalider le gène codant pour SHP2 dans ces cellules, a été utilisé afin d'apporter des éléments de réponse sur les rôles physiologiques de SHP2 dans le développement de l'embryon (Grossmann et al., 2009).

Dans ce modèle animal, l'invalidation de SHP2 conduit à une diminution du nombre de précurseurs des cellules de Schwann. De plus, lors de la maturation de quelques cellules de Schwann, la myélinisation est altérée. Ainsi, SHP2 intervient dans le lignage neuronal, favorisant la formation des neurones (Grossmann et al., 2009; Nakamura et al., 2009a; Nakamura et al., 2009c). Ce phénotype est similaire à celui fait à partir d'un modèle de souris déficientes en Neuréguline ou Nrg1, ligand produit par les neurones favorisant la migration, la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs (Brinkmann et al., 2008). La différenciation des progéniteurs en cellules de Schwann et la mise en place de la myélinisation de ces cellules matures nécessitent l'intervention de SHP2. En effet SHP2 participe à l'activation de la voie de signalisation Nrg1/ErB qui contrôle ce processus (Grossmann et al., 2009).

De plus, la tête, la mâchoire, les oreilles et le museau de ces souris sont de tailles réduites et les yeux sont mal positionnés par rapport aux souris contrôles. Les proportions de la face et du crâne sont aberrantes avec une absence de la mandibule, des os frontaux et nasaux (Nakamura et al., 2009a). De façon intéressante, Newbern *et al.* ont montré que le choix du devenir de ces cellules de la crête neurale vers leur tissu de destination était dirigé par l'activation de la voie Ras/Erk1/2 et que l'absence d'activation de cette voie, conduisait aux mêmes anomalies (Newbern et al., 2008).

b) *SHP2 et ses fonctions cardiaques*

Au niveau de la fonction cardiaque, l'étude à partir de souris Wnt-1-Cre-SHP2, a révélé que la migration des précurseurs cardiaques jusqu'à la sortie proximale du tractus cardiaque au stade E12.5 du développement du cœur est perturbée. Les cellules de ce tissu présentent un défaut d'activation de la voie Ras/Erk1/2 en l'absence de SHP2. Ce défaut de signalisation causerait des anomalies cardiaques retrouvées principalement lors de la division des grandes artères pulmonaire et aortique (Nakamura et al., 2009a). D'un point de vue fonctionnel, l'absence de SHP2 dans le muscle cardiaque (modèle murin α -MHC-Cre-SHP2) conduit à une cardiomyopathie dilatée causée par des défauts de l'activation de la voie RAS/Erk et une hyperactivation des petites GTPases RhoA (Kontaridis et al., 2008; Princen et al., 2009). Les cardiomyocytes déficients en SHP2 ne répondent pas de la même façon au signal extracellulaire que des cardiomyocytes issus de souris saines. En effet, les profils de signalisation en réponse au LIF sont perturbés : les voies PI3K/AKT, RAS/ERK5 et JAK2/STAT3 sont dérégulées dans le cœur. De plus, la perte de SHP2 dans des myoblastes en culture cause des défauts dans la formation des myotubes, une diminution de la taille et du nombre de myofibrilles, sont associés à un défaut de la voie NFAT (Fornaro et al., 2006). Récemment, Marin et al., ont montré que SHP2 contrôle la taille des cardiomyocytes en contrôlant négativement la voie FAK/Src et la signalisation via mTOR un effecteur de PI3K (Marin et al., 2008). De plus, des sténoses aortiques ont été observées dans des souris déficientes en EGFR et en SHP2 (Chen et al., 2000).

SHP2 a donc un rôle cardioprotecteur en contrôlant la morphologie des cellules cardiaques et la masse musculaire du cœur.

c) *SHP2 et ses fonctions neuronales*

Le modèle de souris Nestin-Cre-SHP2 a mis en évidence un double rôle de SHP2 d'une part dans l'activation de la corticogenèse (mise en place du cortex cérébral) et de la neurogenèse (maturation de neurones fonctionnels) et d'autre part dans l'inhibition de la gliogenèse (Gauthier et al., 2007; Hagihara et al., 2009; Ke et al., 2007). Le cervelet de ces souris est réduit et moins folié que ceux des souris sauvages. Les neurones GABAergiques ou cellules de Purkinje, sont mal positionnés avec une présence ectopique des neurones en grains externes, associée à des perturbations dans la mobilité de neurones en grains, induites par le facteur Stromal Derived Factor-1 α , SDF-1 α par l'activation du RCPG CXCR4 (Hagihara et

al., 2009). Ainsi, lors de la différenciation neuronale, SHP2 semble avoir un double rôle, positif ou négatif, au sein du tissu neuronal.

d) Ses fonctions hématopoïétiques et immunitaires

L'hématopoïèse est maintenue par un faible nombre de cellules souches hématopoïétiques multipotentes ayant la capacité de s'auto-renouveler au-delà de la période embryonnaire. Ces cellules sont à l'origine de progéniteurs de différentes lignées hématopoïétiques conduisant aux cellules matures du sang. La signalisation via des cytokines et facteurs de croissance est importante dans la production, la différenciation et la migration de ces cellules souches et progéniteurs (Orkin and Zon, 2008; Zhang and Lodish, 2008). Chan et al., ont décrit le rôle de SHP2 dans la survie de ces deux types de cellules dans des souris adultes. L'utilisation du modèle murin Mx1-Cre-SHP2 a mis en évidence une diminution drastique et rapide du nombre de cellules souches hématopoïétiques, des progéniteurs lymphoïdes et érythroïdes chez ces souris. De plus, la surexpression d'un mutant hyperactivateur de la voie Ras/MAPK, K-RAS-G12D, contrecarre au moins en partie l'effet de la perte de SHP2 dans ces cellules. Ainsi, SHP2 est une protéine essentielle dans la survie des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques à l'âge adulte contrôlée par la voie Ras/MAPK. SHP2 interviendrait également dans le contrôle du pool des progéniteurs myéloïdes retrouvés dans le foie en période prénatale (Chan et al., 2011)

Le modèle murin Lck-cre-SHP2, a permis de mettre en évidence un rôle dans le développement normal des thymocytes au niveau du thymus de ces souris. En effet, les auteurs observent dans ce modèle, qu'une perte de SHP2 conduit à l'inactivation de la voie Ras/MAPK supprimant l'expansion clonale des lymphocytes T CD4+. SHP2 contrôlerait la différenciation et la prolifération des cellules T par le pre-TCR par la régulation de la voie Ras/MAPK fonctionnelle (Alberola-Ila et al., 1995; Swat et al., 1996).

e) Ses fonctions métaboliques

L'inactivation de SHP2 dans les cellules neuronales (CRE3/SHP2) ou plus spécifiquement dans les neurones post-mitotiques du prosencéphale (CaMKII-Cre-SHP2) conduit à une obésité précoce. En effet, dans le cerveau adulte, SHP2 participe au contrôle du métabolisme et de l'équilibre de la balance énergétique. Il a été montré que ces souris sont diabétiques avec des taux circulants de glucose, de triglycérides, de leptine et d'insuline anormalement élevés. Les auteurs ont suggéré que ces animaux présentaient une résistance à la leptine. Ils ont montré que la signalisation induite par cette hormone était altérée dans

l'hypothalamus de ces souris mutantes, avec une diminution de l'activation de ERK2 et une activation modérée de STAT3 (Krajewska et al., 2008; Zhang et al., 2004b). Ce phénotype est similaire à celui observé dans des souris où le récepteur à la leptine n'est plus capable de recruter STAT3 ou encore dans des souris Nestin-Cre invalidées pour le gène codant pour STAT3 (Bates et al., 2003; Gao et al., 2004).

L'invalidation de SHP2 dans le pancréas des souris Pdx1-Cre-SHP2 a mis en évidence une production d'insuline anormalement faible par le pancréas de ces souris et une intolérance au glucose (Zhang et al., 2009). Les voies de signalisation induites par le glucose dans le pancréas, PI3K/Akt et Ras/Erk1/2, sont altérées. Ces observations suggèrent que SHP2 joue un rôle positif dans la synthèse d'insuline des cellules pancréatiques. De plus, en présence de SHP2, l'activation d'Akt et de Erk1/2 permet d'inhiber FoxO1, un régulateur négatif de l'expression des gènes de l'insuline, et de favoriser Pdx1 et d'autres facteurs de transcription nécessaires à l'expression de ces gènes, respectivement. Il est à noter que ce modèle ne présente pas non plus de perturbation de son homéostasie lipidique. Cependant, Uehara *et al.*, ont montré que la perte d'expression de SHP2 dans des cellules 3T3-L1 bloque leur différenciation adipocytaire (Uehara et al., 2007). Par contre, au niveau du tissu adipeux, l'utilisation de modèle Adipoq-Cre-SHP2, ne montre pas d'évidence d'un rôle de SHP2 dans l'homéostasie du glucose (Bettaieb et al., 2011). De plus, dans un modèle murin, Alb-Cre-SHP2, où SHP2 est délété dans le foie, Matsuo *et al.* attribuent un rôle de régulateur positif à SHP2 dans la sensibilité à l'insuline, en augmentant l'activation de la voie PI3K/AKT (Matsuo et al., 2010). Très récemment, un rôle de SHP2 dans le développement et la fonction du rein a également été mis en évidence (Willecke et al., 2011).

f) SHP2 et ses fonction hépatiques

A la suite de blessure du foie, les hépatocytes sont capables de se régénérer en activant des programmes génétiques spécifiques pour déclencher leur prolifération. Feng *et al.* en générant le modèle murin Alb-Cre-SHP2 ont montré la participation de SHP2 dans l'activation de ces programmes génétiques. En effet, lors de la régénération du foie, SHP2 est recrutée et activée en aval de Gab1. Sa délétion dans le foie a pour conséquences une diminution de l'activation des cibles de prolifération cellulaire telles que la cycline A, E et B1 associée à une diminution de l'activation de la voie Ras/ERK (Bard-Chapeau et al., 2005; Bard-Chapeau et al., 2006). Récemment, cette même équipe a montré un rôle pour SHP2 de

suppresseur de tumeur dans la carcinogenèse hépatocellulaire en contrôlant négativement la voie JAK2/STAT3 dans le foie (Bard-Chapeau et al., 2011).

g) Rôle de SHP2 dans l'homéostasie osseuse

Récemment, l'invalidation de SHP2 induite au stade adulte dans différents tissus a été mis au point chez la souris. Outre des défauts d'hématopoïèse et une létalité augmentée, ces souris présentent des anomalies squelettiques sévères, associées à des altérations du cartilage et à l'absence marquée d'ostéoclastes dans les os. Ces défauts sont vraisemblablement en lien avec une dérégulation de la voie PI3K (Bauler et al., 2011).

Modèles murins	Tissus cibles	Phénotypes	Rôles tissulaires de SHP2
Wnt1-Cre-SHP2	Cellules souches de la crête neurale	Diminution du nombre de précurseurs des cellules de Schwann Myélinisation altérée des cellules de Schwann Tailles de la tête, mâchoire, oreilles et museau réduites Position anormale des yeux Proportions aberrantes de la face et du crâne Absence des os de la mandibule, frontaux et nasaux Migration des précurseurs cardiaques perturbée Division anormale des grandes artères pulmonaire et cardiaque Cardiopathie dilatée	Rôle cardioprotecteur : Contrôle de la masse musculaire du cœur et de la morphologie des cellules cardiaques
α-MHC-Cre-SHP2 Mck-Cre-SHP2	Muscles cardiaque et squelettique	Cardiopathie dilatée	Rôle cardioprotecteur
Nestin-Cre-SHP2	Neurones	Cérébellum peu folié Positionnement anormal des neurones GABAergiques Présence ectopique des neurones en grains externes Mobilité des neurones en grains altérée	Activation de la corticogenèse et de la neurogenèse, inhibition de la gliogenèse
Lck-Cre-SHP2	Thymus	Suppression de l'expansion clonale des lymphocytes T CD4+	Contrôle de la différenciation et de la prolifération des lymphocytes T.
CaMKII-Cre-SHP2	Neurones (cortex cérébral) et hypothalamus	Obésité précoce Souris diabétiques Taux élevés de glucose triglycérides, leptine et insuline Résistance à la leptine	Contrôle de la prise de poids, régulation des taux du glucose, TG, leptine et insuline
Pdx-1-Cre-SHP2	Pancréas	Anomalie de la production d'insuline Intolérance au glucose	Contrôle la production d'insuline, rôle positif dans la réponse au glucose
Alb-Cre-SHP2	Foie	Augmentation de la sensibilité à l'insuline	Participation à la régénération du foie par prolifération des hépatocytes Régulateur négatif de la signalisation à l'insuline dans le foie
Mx1-Cre-SHP2	Cellules souches hématopoïétiques	Diminution drastique du nombre de cellules souches hématopoïétiques (progéniteurs lymphoïdes et érythroïdes)	Survie des cellules hématopoïétiques Contrôle du nombre de progéniteurs myéloïdes
Adipoq-Cre-SHP2	Tissus adipeux	Aucune anomalie n'a été détectée	Aucun rôle attribué
MMTV-Cre-SHP2	Glandes mammaires	Retard et anomalies dans la morphogenèse et le remodelage pendant la gestation et l'allaitement Développement incomplet des structures lobulo-alvéolaires Diminution du nombre de cellules luminales pendant la l'allaitement.	Rôle positif dans la mammopoïese et la lactogenèse
Hoxb7-Cre-SHP2	Rein	Mortalité dans les 24h post-natal. Reins rudimentaires : absence de cortex et de médulla, diminution du nombre de tubules et glomérules	Rôle positif dans la néphrogenèse Prolifération des cellules « Tip » des bourgeons urétéraux

Tableau 6 : Principaux modèles murins d'invalidation de SHP2 tissu spécifique.

Les mutations germinales de *PTPN11* sont toutes de type faux sens et sont majoritairement représentées dans le SN et le SL (Tartaglia et al., 2001b) (Musante et al., 2003; Tartaglia et al., 2003; Zenker et al., 2004). Des mutations activatrices sporadiques de SHP2 sont également retrouvées dans différents cancers, un aspect qui ne sera pas développé dans ce manuscrit mais pour lequel le lecteur est invité à se référer à différentes revues récentes (Chan et al., 2008; Grossmann et al., 2010).

Des études biochimiques et fonctionnelles ont permis d'identifier la distribution et les conséquences biologiques des mutations SN et SL. Ainsi, l'identification précise de ces mutations a montré qu'elles ne semblent pas être distribuées au hasard dans le gène et que toutes perturbent la fonction de SHP2 par des mécanismes distincts (Keilhack et al., 2005b; Martinelli et al., 2008; Tartaglia et al., 2001b).

II. Rôles physiopathologiques des mutations de SHP2 dans le SN et le SL

A. Conséquences des mutations SN et SL sur la structure et la fonction de SHP2

1. Structure et fonction des mutants SN de SHP2

Plus de 40 mutations associées au SN ont été répertoriées sur le gène de *PTPN11*, et sont localisés sur environ 30 résidus différents. Les résidus les plus fréquemment mutés sont des résidus essentiels responsables directement ou indirectement de l'interaction entre les domaines N-SH2 et PTP. Ce déséquilibre causerait des anomalies de la fonction de la phosphatase (Figure 21)

a) Perturbation directe de l'interaction intramoléculaire de SHP2

Les mutations les plus fréquentes sont localisées dans le domaine N-SH2 de SHP2. Il a été montré que ces mutations perturbent l'interaction intramoléculaire de la phosphatase en empêchant le domaine N-SH2 d'interagir avec le domaine PTP. Ainsi, SHP2 ne peut pas retourner dans un état inactif. Ce défaut d'interaction conduit à une déstabilisation de son activité enzymatique, résultant en une activité constitutive de la phosphatase (Darian et al., 2011). Bien que les mutations du domaine N-SH2 modifient l'interaction intramoléculaire de SHP2, elles ne modifient pas celle des domaines SH2 avec des phosphotyrosines de protéines (récepteur ou adaptateur) lors du recrutement de la phosphatase. Aussi, une étude a montré que l'expression de formes hyperactives de SHP2 mutées sur leur domaine N-SH2 (D61A et E76A) dans des bactéries, ne perturbent pas la liaison du domaine N-SH2 avec ses

phosphotyrosines cibles (O'Reilly et al., 2000). Des dosages de l'activité de mutants SN réalisés *in vitro* montrent une activité augmentée comparée à l'activité de sa forme sauvage. Par exemple, à l'état basal, les mutants D61G ou N308D (mutation représentant 40% des patients SN) de SHP2, ont une activité 10 fois et 3 fois plus élevée que la forme sauvage, respectivement. Après stimulation réalisée à l'aide de phosphotyrosines synthétiques l'activité, des mutants D61G et N308D devient 6 fois et 2 fois plus forte que la forme sauvage active, respectivement (Keilhack et al., 2005b).

Il est à noter que l'hyperactivité du mutant D61G est suggestive d'une capacité à promouvoir des LMMJ. En effet, certaines mutations sporadiques du domaine N-SH2 de SHP2 sont aussi à l'origine de l'apparition de LMMJ, des désordres myéloprolifératifs générant une expansion clonale et massive des cellules myéloïdes. Ces mutations faux sens, sont retrouvées dans environ 37% des LMMJ décrites. Dans cette pathologie, les résidus de SHP2 les plus fréquemment affectés sont les résidus D61 et E76, que l'on retrouve également mutés dans le SN, comme nous venons de le voir. Cependant, le changement d'acide aminé est différent dans les LMMJ. De manière intéressante, les mutants D61Y et E76K retrouvés dans les LMMJ ont des activités plus élevées que les mutants SN D61G et E76D. Cette différence d'activité de SHP2 pourrait expliquer les différences de sévérité entre les tumeurs observées chez les patients SN et celles retrouvées chez les patients atteints de LMMJ, notamment pour les mutations du résidu D61. A ce jour la mutation E76D ne causerait pas de LMMJ (Bastida et al., 2011; Keilhack et al., 2005b).

b) Perturbation de la flexibilité du domaine N-SH2

D'autres mutations ont été décrites, situées à distance de cette surface d'interaction, notamment au niveau des résidus Asp106 et Glu110. Ces résidus permettent la connexion entre les domaines N- et C-SH2 nécessaire à la flexibilité du domaine N-SH2. Cette flexibilité est indispensable pour la réalisation du switch moléculaire précédemment décrit. Il a été montré que des mutations de ces résidus perturbent cette flexibilité et conduisent à un défaut d'interaction du domaine N-SH2 avec le domaine PTP (Kosaki et al., 2002).

c) Augmentation de l'affinité avec les phosphotyrosines

D'autres mutations peuvent être responsables de l'hyperactivation de SHP2 en dehors des zones d'interaction intramoléculaire. En effet, il a été montré que des mutations des résidus Thr42 du domaine N-SH2 et Glu139 du domaine C-SH2, résidus intervenant dans la liaison des domaines SH2 aux phosphotyrosines de ses partenaires protéiques, sont

responsables d'une augmentation de l'affinité de liaison de SHP2 avec ces tyrosines phosphorylées, privilégiant ainsi une conformation ouverte de la phosphatase (Huyer and Ramachandran, 1998; Lee et al., 1994).

Ainsi, quelle que soit la localisation de la mutation SN sur SHP2, l'enzyme est bloquée dans une conformation « ouverte » résultant en un accès constitutif des substrats et une activité constitutive de l'enzyme. SHP2 SN est ainsi hyperactive à la fois à l'état basal et à l'état stimulé, mais avec une activité variable selon le type de la mutation qu'elle porte. Comme nous le verrons un peu plus loin, ce gain de fonction, causé par les mutations SN de SHP2, a de profonds effets sur la signalisation cellulaire résultant en des anomalies du développement, qui pourraient expliquer celles retrouvées dans le SN (Figure 21).

2. Structure et fonction des mutants SL de SHP2

Contrairement au SN, les mutations de *PTPN11* retrouvées dans le SL sont toutes localisées dans le domaine catalytique de SHP2. Bien que des mutations SN soient localisées aussi dans le domaine PTP, les mutations SL ne concernent pas les mêmes résidus. En effet, elles affectent les résidus localisés à proximité ou dans le site actif de la phosphatase, dans des régions très conservées de la superfamille des PTP. Ces résidus sont cruciaux pour l'activité catalytique de l'enzyme et sont principalement présents dans les boucles PTP (résidu T468), et p-Tyr (résidu Y279). Des études biochimiques ont montré que les mutants SL confèrent à SHP2 une forte diminution de sa capacité à déphosphoryler un substrat phosphotyrosine (mutant T468M et Y279C) voire une inhibition totale (mutants C459G et Q510P) *in vitro*. Ces résultats suggèrent donc que les mutations SL sont à l'origine d'une perte de fonction de la protéine (Hanna et al., 2006a; Stewart et al., 2010) (Figure 21).

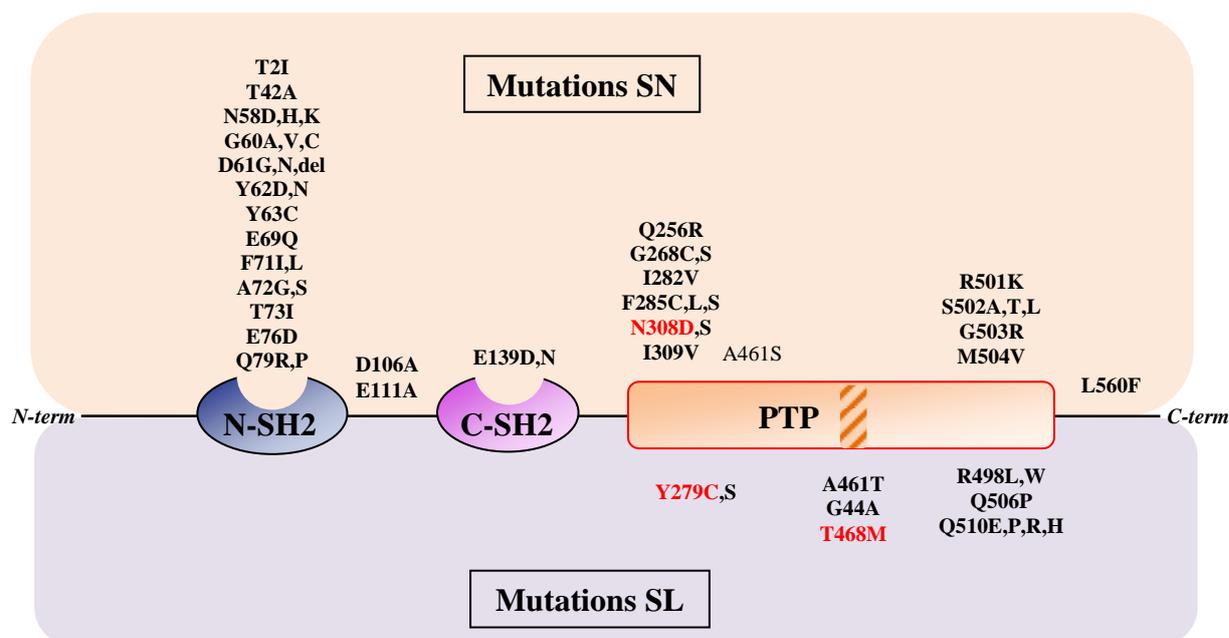


Figure 21 : Distribution des résidus mutés de SHP2 dans les syndromes de Noonan et L.E.O.P.A.R.D. Les substitutions les plus fréquentes sont indiquées en rouge. Del indique une délétion de l'acide aminé.

B. Conséquences fonctionnelles des mutations Noonan de SHP2 dans la signalisation et le développement

Les mutations de SHP2 causent le plus souvent des dérégulations de la voie Ras/MAPK. En effet, les premières études réalisées à partir de cellules COS-7 exprimant un mutant SN de SHP2 (N308D) ont mis en évidence une activation prolongée de la voie Ras/Erk1/2 en réponse à l'EGF, augmentant la prolifération cellulaire. Ce maintien d'activation serait médié par une association prolongée entre Gab1 et le mutant de SHP2, mais les mécanismes précis de cette activation ne sont pas encore bien compris (Fragale et al., 2004b; Tartaglia et al., 2003). *In vivo*, l'expression du mutant hyperactif Q79R dans les tissus endocardiques, provoque une augmentation de l'activation de la voie Ras/Erk1/2 dans ce tissu, ce qui conduit à des défauts du développement du système cardiaque (non compaction du ventricule et défaut du septum ventriculaire). De plus, ces anomalies ne sont plus observées lorsque ces souris sont croisées avec des mutant délétés de Erk, afin d'atténuer l'hyperactivation de la voie Ras/Erk1/2 (Krenz et al., 2008b; Nakamura et al., 2007a). Dans ces modèles animaux, l'activation des autres voies de signalisation (p38, JNK et Erk5 MAPKs, PI3K/Akt, JAK/STAT ou RhoA) reste inchangée.

La dérégulation de l'activité de la voie Ras/MAPK due aux mutations de *PTPN11* est probablement l'une des principales causes des dysfonctionnements du développement chez ces patients SN. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre II, d'autres gènes causant

un SN sont également impliqués dans la voie Ras/MAPK et conduisent aussi à une hyperactivation de cette voie.

L'élucidation de la pathogenèse du SN, en particulier en ce qui concerne les anomalies de développement, a été permise en grande partie par des modèles animaux.

1. Le modèle drosophile

Des premières études ont été réalisées à partir de drosophiles transgéniques exprimant la mutation correspondant à la forme N308D de SHP2 soit sur un allèle soit sur les deux. La mutation présente sur les deux allèles *Csw* (*ptpn11* chez la drosophile) est responsable d'une létalité précoce au stade embryonnaire alors que l'expression d'un seul allèle muté est viable et entraîne une formation ectopique des veines des ailes, phénotype ressemblant à celles observées avec les mutations gain de fonction de l'EGFR (Baker and Rubin, 1992; Oishi et al., 2006). Il est à noter que l'activation de Ras est nécessaire mais pas suffisante pour l'expression de ces phénotypes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette mutation aurait des conséquences à différents niveaux de la voie Ras/MAPK mais aussi des autres voies de signalisation comme JAK/STAT, Notch ou encore Decapentaplegic (l'orthologue de bone morphogenetic protein, BMP) (Oishi et al., 2006) .

2. Le modèle poisson zèbre

Des premières études sur l'embryon de poisson zèbre ont été réalisées pour étudier l'impact des mutations SN dans les premiers stades du développement de l'embryon. Dans cette étude les auteurs ont montré qu'après injection d'ARNm codant des formes SN de SHP2 dans ces embryons, des anomalies cranio-faciales se mettent en place, le cartilage n'est retrouvé qu'en position postérieure des anomalies de la gastrulation sont aussi observées. Cependant, les anomalies de la gastrulation ne montrent pas, de manière évidente, qu'elles seraient la cause de ces différentes anomalies (Jopling et al., 2007b).

3. Les modèles murins

Le premier modèle murin SN, pour lequel la mutation gain de fonction D61G a été insérée par recombinaison homologue du gène *ptpn11* dans des cellules souches embryonnaires, a été décrit par Araki *et al.*, (Araki et al., 2004b). Ainsi, les souris obtenues portent la mutation soit sur un allèle, souris hétérozygotes *ptpn11*^{D61G/+} soit sur les deux, souris homozygotes *ptpn11*^{D61G/D61G}.

Les souris *ptpn11*^{D61G/D61G} ont un arrêt du développement précoce au stade embryonnaire E13.5. Les auteurs ont décrits les embryons comme œdémateux et hémorragiques avec une nécrose hépatique diffuse. De plus, ils ont observé des malformations cardiaques sévères avec des défauts du septum ventriculaire et des anomalies d'éjection au niveau du ventricule droit. Ils ont observé un élargissement de la valve atrio-ventriculaire primordiale, des voies d'éjection, et un myocarde plus épais par rapport aux souris saines.

Les souris *ptpn11*^{D61G/+} sont viables et présentent des malformations cardiaques comme des hyperplasies des valves, des défauts du septum (CIA, CIV, CAV) et des anomalies de la voie d'éjection, le myocarde est globalement normal. Les auteurs ont mis en évidence que la pénétrance de ces anomalies est variable et que la moitié des embryons *ptpn11*^{D61G/+} meurent à cause de malformations cardiaques sévères. Les autres embryons présentent des hyperplasies valvulaires modérées au cours du développement embryonnaire avec parfois une résolution spontanée. Les auteurs ont également montré, par une analyse des tissus endocardiques de ces embryons de souris, une prolifération augmentée et une apoptose diminuée. Les souris *ptpn11*^{D61G/+} ont des tailles plus petites que les souris sauvages dès la 3^{ème} semaine de vie, et cette différence est conservée jusqu'à la taille adulte finale sans que les taux sérique d'IGF-I ne soient changés. Cependant, dans cette étude, les mesures d'IGF-I ont été faites sur des souris adultes. De plus d'autres anomalies ont été observées comme un syndrome myéloprolifératif modéré.

Au niveau moléculaire, les souris *ptpn11*^{D61G/+} présentent une hyperactivation de la voie Ras/Erk1/2 au niveau des zones où un développement anormal s'installe. C'est le cas au niveau de la face, des bourgeons et des tissus endocardiques. Grâce à ce premier modèle de souris SN, les auteurs ont pu reproduire la plupart des signes phénotypiques retrouvés chez les patients. Ils ont également observé une dérégulation de la voie Ras/MAPK qui pourraient expliquer les diverses anomalies du développement que sont la dysmorphie faciale, la petite taille et les anomalies cardiaques principalement (Araki et al., 2004b).

L'hyperactivation de cette voie a également été retrouvée dans d'autres modèles murins transgéniques où des mutations SN ont été exprimées dans différents tissus. Ainsi, l'expression de la mutation Q79R dans des cellules de la crête neurale d'un modèle murin, conduit à une hyperactivation de la voie Ras/MAPK à l'origine d'anomalies cranio-faciales conduisant à des défauts des os de la face et du squelette. Ces diverses anomalies reproduisent la dysmorphie faciale observée chez les patients SN. De façon intéressante, ces anomalies ne

se développent pas lorsque ces souris sont croisées avec des souris déficientes en Erk1/2, rétablissant un niveau normal d'activité de la voie Ras/Erk1/2 (Nakamura et al., 2007a). De plus, l'expression du mutant Q79R dans les cardiomyocytes à différents stades du développement (*in utero* et en post-natal) conduit à des anomalies différentes. *In utero*, les cœurs de ces embryons présentent des malformations cardiaques comme des défauts du septum ventriculaire ou des anomalies de la voie d'éjection, comparables à celles observées chez les souris *ptpn11*^{D61G/+}, alors que l'expression postnatale de la mutation n'entraîne aucune modification visible (Nakamura et al., 2007a; Nakamura et al., 2009c). De plus, la surexpression du mutant Q79R dans des tissus endocardiques en développement entraîne une mortalité embryonnaire à E14.5 avec des embryons présentant un élargissement des tissus endocardiques au niveau du canal atrio-ventriculaire et des voies d'éjection, ce qui pourrait expliquer le développement anormal des valves (Krenz et al., 2008b).

D'autres approches ont été développées récemment, par l'expression inductible de la mutation SN. Il a été montré que les malformations cardiaques seraient secondaires à l'expression des mutants de SHP2 dans les tissus endocardiques (et non les tissus myocardiques ou de la crête neurale) alors que les anomalies faciales seraient causées par l'expression de ces mutants dans les cellules de la crête neurale. De plus, l'importance des malformations est modifiée par le fond génétique (Araki et al., 2009b).

C. Conséquences fonctionnelles des mutations L.E.O.P.A.R.D. de SHP2 dans la signalisation et le développement

Contrairement aux mutations SN de SHP2, il existe peu de données à ce jour sur les conséquences fonctionnelles des mutations SL au niveau cellulaire, tissulaire ou du développement. Néanmoins, quelques modèles d'invertébrés et très récemment un premier modèle de souris ont été générés reproduisant certains signes phénotypiques retrouvés chez les patients SL. Ces « outils » ont permis d'apporter de nouvelles informations sur les causes de l'apparition des anomalies développées par les patients SL.

Contrairement à tous les mutants SN testés ayant des mutations gain de fonction de SHP2 et agissant principalement voire exclusivement pour favoriser l'activation de la voie Ras/MAPK, les mutants SL à l'inverse, sont catalytiquement inactifs et agiraient comme des dominants négatifs, sur l'activation de Erk (Kontaridis et al., 2006). Cependant, l'effet dominant négatif des SL sur la voie Ras/MAPK est encore très controversé selon le modèle utilisé.

1. Les modèles animaux

a) Le poisson zèbre

Comme pour les mutations SN, dans le modèle de poisson zèbre, des injections d'ARNm portant des mutations SL (A462T et G465A) ont été faites et montrent des anomalies crâniennes, faciales et cardiaques similaires au phénotype des patients, avec notamment des défauts de la gastrulation. D'un point de vue fonctionnel, les auteurs montrent un effet dominant négatif des mutants SL sur la voie Ras/MAPK (Jopling et al., 2007b). Cependant, il a été montré que dans des souches de drosophile exprimant la mutation hétérozygote Y279C, une hyperactivation de la voie Ras/MAPK serait responsable d'une formation ectopique des veines des ailes. Contrairement aux études précédentes, ces données suggèrent que le mutant SL, Y279C, chez la drosophile aurait un effet dominant positif sur la voie Ras/MAPK (Oishi et al., 2009).

b) Le modèle murin

Un premier modèle de souris SL portant la mutation Y279C (*ptpn11*^{Y279C/+}) a été généré récemment reproduisant la plupart des signes de la maladie. En effet dans cette étude les auteurs ont montré que la taille du cœur des souris *ptpn11*^{Y279C/+} est normale à la naissance, mais que leur cœur devient progressivement plus large que celui des souris sauvages, avec un épaissement de la paroi ventriculaire gauche et du septum. Les cœurs de ces souris sont significativement différents (poids et taille augmentés) des souris sauvages à l'âge adulte avec une augmentation des marqueurs de l'hypertrophie cardiaque. De plus, des cellules inflammatoires s'accumulent dans les espaces interstitiels. Toutes ces observations suggèrent la mise en place d'une hypertrophie cardiaque chez les souris *ptpn11*^{Y279C/+} (Marin et al., 2011). De la même façon, une étude utilisant des cellules pluripotentes induites (IPSC) dérivées de cellules de patient SL, a montré que suite à la différenciation de ces cellules en cardiomyocytes, ces derniers ont une taille plus grande et une réorganisation des sarcomères, suggérant un remodelage cardiaque par rapport aux cellules contrôles (Carvajal-Vergara et al., 2010). Outre les anomalies cardiaques, une létalité massive des souris *ptpn11*^{Y279C/+} vers la 52^{ème} semaine de vie est observée. La raison précise de cette mortalité n'est pas connue mais pourraient être causée par l'aggravation des cardiopathies. Les souris *ptpn11*^{Y279C/+} ont également des os fémoraux et tibiaux plus courts que les souris sauvages, et un retard de la croissance s'installe dès la deuxième semaine de vie. De plus, des anomalies faciales ont été observées.

D'un point de vue fonctionnel, les auteurs ont recherché des anomalies au niveau des voies de signalisation normalement régulées par SHP2. Précédemment, ce même groupe et d'autres décrivaient un effet dominant négatif des mutations SL sur la voie Ras/MAPK *in vitro* (Kontaridis et al., 2006; Tartaglia et al., 2006a). *In vivo*, les auteurs ont montré à partir de cardiomyocytes isolés des souris SL, une augmentation de l'association entre SHP2 SL et l'adaptateur IRS-1 à l'état basal ou en réponse à l'IGF-I comparée aux cardiomyocytes des souris contrôles, et une diminution de la voie Ras/Erk1/2 en réponse à l'insuline à partir de lysats de cœurs isolés chez les souris SL. De plus, cette diminution d'activation de Erk1/2 est retrouvée en aval d'autres agonistes (IGF-I, EGF et angiotensine II) dans des cardiomyocytes isolés (Marin et al., 2011). Bien qu'une hyperactivation de la voie Ras/MAPK chez le SN muté sur Raf1 serait à l'origine d'une hypertrophie cardiaque (Wu et al., 2011), les mutants de SHP2 SL, notamment la mutation Y279C, contribuerait plutôt à une diminution de cette voie conduisant au même phénotype. Ces observations pourraient être expliquées par l'effet activateur des mutations SL sur la voie PI3K/Akt comme nous le verrons dans le paragraphe ci-dessous (voir annexe 2) (Edouard et al., 2010; Marin et al., 2011).

2. Le SL : une « PI3Kpathie » ?

Outre les effets, parfois controversés, des mutations de type SL sur l'activation de la voie Ras/MAPK, plusieurs études ont montré que ces mutants induisaient une hyperactivation de la voie PI3K/Akt.

Ainsi, une première étude menée au laboratoire a montré que des mutants SL de SHP2, surexprimés dans des cellules, seraient incapables de déphosphoryler les sites de liaison de PI3K sur Gab1, résultant en une augmentation de l'association de PI3K avec l'adaptateur Gab1, et une augmentation de l'activation de la voie PI3K/Akt sous stimulation par l'EGF (Hanna et al., 2006a). De plus, nous savons pu montrer une hyperactivation des cibles de PI3K, Akt et GSK3 β , dans des fibroblastes de patients SL portant les mutations codant les formes T468M et Y279C de SHP2. De façon intéressante, cet effet est corrélé à une augmentation des marqueurs de l'hypertrophie dans les fibroblastes de patients, qui peut être bloquée par un inhibiteur de PI3K. De plus, l'injection d'adénovirus codant pour des formes SL dans des embryons de poulet, conduit à une augmentation de la taille de leur cœur comparée aux embryons sauvages, un phénotype également bloqué par des inhibiteurs de PI3K. Ces données suggèrent que l'hyperactivation de la voie PI3K/AKT/GSK3 β pourrait conduire à l'HCM caractéristique du SL (voir annexe 1) (Edouard et al., 2010). En accord

avec cette hypothèse, des cardiomyocytes isolés des cœurs de ces souris *ptpn11*^{Y279C/+} présentent une hyperactivation d'Akt et de sa cible en aval, mTOR. De façon importante, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la voie PI3K/Akt/mTOR, la rapamycine, conduit à une amélioration de la taille de la cavité du ventricule gauche et à une diminution des marqueurs hypertrophiques, suggérant que ce traitement contrecarre l'HCM observée dans ces souris (Edouard et al., 2010; Marin et al., 2011).

III. Conclusion

La protéine SHP2 s'avère être un régulateur crucial de multiples voies de signalisation, notamment de la voie Ras/MAPK, dont la fine coordination est nécessaire au développement et à l'homéostasie des organismes. Ceci est notamment illustré par les phénotypes multiples résultant de la perte de fonction de SHP2, mais surtout par le fait que des mutations perturbant le niveau d'activation de SHP2 puissent donner lieu aux syndromes polymalformatifs SN et SL. Des premières études ont révélé que la dérégulation de la voie Ras/MAPK par ces mutations pouvait être responsable de certains des symptômes associés à ces pathologies, comme dans le cas des autres NCFC. Toutefois, la dérégulation d'autres voies de signalisation normalement régulées par SHP2 pourrait également être mise en jeu. De plus, l'ontologie d'autres traits phénotypiques majeurs du SN, comme le retard statural, reste méconnue à ce jour. Comprendre les mécanismes responsables du retard de croissance dans le SN a fait l'objet de ce travail de thèse, présenté dans la partie « Résultats expérimentaux » de ce manuscrit.

-Résultats expérimentaux-

Résultats expérimentaux

« Etude des mécanismes responsables du retard statural dans le syndrome de Noonan : Analyse du rôle physiologique de SHP2 dans la signalisation du récepteur à l'hormone de croissance (R-GH) et des conséquences physiopathologiques des mutations de SHP2 dans le développement d'une résistance à GH ».

I. Introduction

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique relativement fréquente appartenant à la famille des « RASopathies », qui se caractérise par une dysmorphie faciale, des cardiopathies et un retard statural (Tartaglia et al., 2011). L'origine de ce retard de croissance, bien que concernant 80% des patients, reste largement incompris. Les données hormonales recueillies jusqu'alors suggèrent que les patients atteints de SN présentent une résistance partielle à l'hormone de croissance (Growth Hormone, GH) ce qui a justifié la mise en place d'un traitement par GH recombinante humaine dont l'efficacité reste à ce jour débattue (Binder, 2009). Il apparaît donc essentiel de mieux comprendre l'origine du retard statural dans le SN et les mécanismes sous-jacents à son développement, en vue de développer des stratégies thérapeutiques mieux ciblées.

Dans la moitié des cas, le SN est dû à des mutations du gène codant pour la tyrosine phosphatase SHP2, une protéine ubiquitaire qui régule différentes voies de signalisation mobilisées en aval de nombreux récepteurs à activité tyrosines kinases intrinsèque ou associé (récepteurs aux facteurs de croissance, hormones, cytokines...). La fonction de SHP2 la mieux documentée à ce jour est son rôle positif dans l'activation de la voie Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), mais elle intervient également dans la régulation des Posphoinositides 3 Kinases, des kinases Src ou du module JAK/STAT. En conséquence de ces multiples rôles, il est largement établi que SHP2 joue un rôle essentiel dans le développement, la fonction et le maintien de l'homéostasie de multiples tissus et organes (Neel et al., 2003b).

Différentes études biochimiques ont révélé que les mutations de SHP2 responsables du SN sont de nature gain-de fonction, activatrice, notamment par libération des contraintes auto-inhibitrices qui maintiennent SHP2 dans une forme inactive en l'absence de stimulation. Il a

été montré que l'expression de ces mutants dans divers modèles induisait une hyperactivation de la voie Ras/MAPK. Toutefois, à l'initiation de ce travail, le lien entre les conséquences des mutations SN de SHP2 sur ces fonctions et le développement des différents traits phénotypiques de la maladie n'étaient pas connus.

Mon laboratoire de thèse ayant acquis une certaine expertise dans l'étude des fonctions de SHP2 et dans l'analyse fonctionnelle de ses mutations, mon projet de thèse s'est centré sur la compréhension de l'origine du retard statural dans le SN. Or, comme évoqué plus haut, les données cliniques rapportaient des taux sériques de GH normaux voire élevés associés à des taux bas d'Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I), le médiateur biologique de GH pour ses effets trophiques. Ce profil hormonal étant évocateur d'une résistance à GH et le récepteur à GH (GH-R) n'étant pas muté chez les patients SN, ces observations suggéraient l'existence d'une résistance post-récepteur à GH. Bien qu'il ait été montré que SHP2 était mobilisé en aval du GH-R, son rôle physiologique précis dans la signalisation en aval du GH-R et dans la réponse à GH restait mal compris. Nous avons donc développé différents outils moléculaires, cellulaires et animaux pour d'une part comprendre le rôle de SHP2 dans la réponse à GH, et d'autre part explorer les conséquences physiopathologiques des mutations SN de SHP2 sur cette réponse biologique. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article qui suit, récemment soumis dans PNAS.

II. Résultats

Noonan syndrome causing-SHP2 mutants inhibit IGF-I release via GH-induced ERK1/2 hyper-activation, which contributes to short stature.

Audrey De Rocca Serra-Nédélec, Thomas Edouard, Karine Tréguer, Mylène Tajan, Toshiyuki Araki, Marie Dance, Marianne Mus, Alexandra Montagner, Maithé Tauber, Jean-Pierre Salles, Philippe Valet, Benjamin G. Neel, Patrick Raynal, and Armelle Yart.

Noonan syndrome causing-SHP2 mutants inhibit IGF-I release via GH-induced ERK1/2 hyper-activation, which contributes to short stature.

Audrey De Rocca Serra-Nédélec ^{a,b}, Thomas Edouard ^c, Karine Tréguer ^a, Mylène Tajan ^a, Toshiyuki Araki ^d, Marie Dance ^e, Marianne Mus ^f, Alexandra Montagner ^g, Maithé Tauber ^c, Jean-Pierre Salles ^f, Philippe Valet ^a, Benjamin G. Neel ^d, Patrick Raynal ^b, and Armelle Yart ^{a,1}.

^a INSERM UMR 1048, Université Paul Sabatier, 1 avenue Jean Poulhès- F-31432 Toulouse, France.

^b EA4568 M2CHRNRS, Université Paul Sabatier, Hôpital Purpan, F-31059 Toulouse, France

^c Department of Endocrinology, Children's Hospital, F-31000, Toulouse, France.

^d Campbell Family Cancer Research Institute, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

^e Université Paul Sabatier, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote and CNRS, F-31000 Toulouse, France.

^f INSERM UMR 1043, Université Paul Sabatier, Hôpital Purpan, F-31059 Toulouse, France.

^g INRA ToxAlim, Integrative Toxicology & Metabolism, F-31027, Toulouse, France.

¹ Corresponding author: Mailing address: INSERM UMR 1048, 1 avenue Jean Poulhès- F-31432 Toulouse, France. Phone +33-561-325-632. Fax +33-561-325-622. E-mail: armelle.yart@inserm.fr.

Keywords: Noonan syndrome, SHP2, growth hormone resistance, RAS/ERK1/2 pathway, Insulin-Like Growth Factor-I.

ABSTRACT

Noonan syndrome (NS), a genetic disease caused in half of cases by activating mutations of the tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11), is characterized by congenital cardiopathies, facial dysmorphic features, and short stature. How mutated SHP2 induces growth retardation remains poorly understood. We report here that early growth delay is associated with low levels of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) in a mouse model of NS expressing the D61G mutant of Ptpn11. Conversely, inhibition of SHP2 expression in growth hormone (GH)-responsive cell lines results in increased IGF-I release upon GH stimulation. SHP2-deficient cells display decreased ERK1/2 phosphorylation and RAS activation in response to GH, whereas expression of NS-associated SHP2 mutants results in ERK1/2 hyperactivation in vitro and in vivo. RAS/ERK1/2 inhibition in SHP2-deficient cells correlates with impaired dephosphorylation of the adaptor GAB1 on its RASGAP binding sites. We demonstrate that ERK1/2 inhibition results in an increase of IGF-I levels in vitro and in vivo, which is associated with significant growth improvement in NS mice. In conclusion, NS-causing SHP2 mutants inhibit GH-induced IGF-I release through RAS/ERK hyperactivation, a mechanism that could contribute to growth retardation. This suggests that, in addition to its previously shown beneficial effect on NS-linked cardiopathies and cranio-facial defects, RAS/ERK modulation could also alleviate the short stature phenotype in NS caused by PTPN11 mutations.

INTRODUCTION

Noonan syndrome (NS, MIM 163950) is a one of the most common autosomal dominant developmental disorder characterized by heart defects, facial dysmorphia, and short stature (Romano et al., 2010). These distinctive traits are shared, with variable penetrance, with related diseases, notably Costello syndrome, Cardio-Facio-Cutaneous syndrome, LEOPARD syndrome and Neurofibromatosis type I, which are referred to as RASopathies (Tartaglia et al.; Tidyman and Rauen, 2009).

Over the past several years, intensive efforts have been made to identify the causative mutations for these genetic syndromes. Interestingly, in the case of NS, half of the patients carry a mutation of the *PTPN11* gene, encoding the tyrosine phosphatase SHP2 (Edouard et al., 2007b; Tartaglia et al., 2001a). SHP2 is a ubiquitous protein recruited downstream of many tyrosine kinase-dependent receptors that, once activated, dephosphorylates phosphorylated tyrosines (Neel et al., 2003a). The best defined function of SHP2 is its positive role in the activation of the RAS/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Extracellular-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) pathway (for review, (Dance et al., 2008a)). In addition, SHP2 reportedly regulates other key signaling pathways, including the Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) pathway, the Src Family Kinase (SFK), the Target Of Rapamycin (TOR) kinase or the Janus kinase 2/ Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (JAK2/STAT5) module. SHP2 thus plays a fundamental role in organism development and homeostasis, as exemplified by the severe phenotypes of total or tissue specific knock-outs of the *Ptpn11* gene (Jopling et al., 2007a; Ke et al., 2006a; Kontaridis et al., 2008; Matsuo et al., 2010; Saxton et al., 2000; Zhang et al., 2004a).

Given the pleiotropic roles of SHP2, elucidating how its mutations can alter its function(s) is key to better understanding NS pathogenesis. Biochemical studies have revealed that NS-causing *PTPN11* mutations result in hyperactivation of SHP2 catalytic activity, by disrupting the inhibitory interaction between its catalytic and SH2 domains (Keilhack et al., 2005a; Tartaglia et al., 2006b). Moreover, functional studies have shown that expression of NS-causing mutants can induce ERK1/2 hyperactivation *in vitro* and *in vivo* (Araki et al., 2004a; Fragale et al., 2004a; Keilhack et al., 2005a). More interestingly, recent studies using mouse models for different NS-causing *Ptpn11* mutations have shown that pharmacological or genetic inhibition of ERK can alleviate NS-associated cardiopathies and cranio-facial

defects (Araki et al., 2009a; Krenz et al., 2008a; Nakamura et al., 2007b; Nakamura et al., 2009b).

In contrast to the above-cited clinical features, the origin of growth retardation in NS is poorly understood, although short stature is one of the main clinical symptoms of NS and is reported in more than 70% of affected patients (Romano et al., 2010). One proposal is that growth defects are due to partial growth hormone (GH) resistance at the post-receptor level (Binder et al., 2005a; Limal et al., 2006a). Indeed, some patients with NS, notably *PTPN11*-mutated cases, display normal-to-elevated GH blood levels associated with a low level of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), the biological mediator of GH acting on different target tissues, including the growth plate. However, whether signaling pathways downstream of the GH receptor (GH-R) that regulate IGF-I production are impaired in NS has not been established.

By using a mouse model of NS expressing the D61G mutant of SHP2 (*Ptpn11*^{D61G/+}) and different cellular approaches, we explored whether and how NS-causing SHP2 mutations alter GH response. We observed that growth retardation in young NS mice correlates with low IGF-I levels and that NS mutants induce ERK1/2 hyperactivation upon GH stimulation in vitro and in vivo. Moreover, we provide evidences that SHP2 negatively regulates GH-induced IGF-I release through a RAS/ERK-dependent mechanism. Consistently, pharmacological ERK1/2 inhibition at least partially rescued IGF-I deficiency in NS mice, resulting in a significant improvement of growth.

RESULTS

Growth retardation in NS mice is associated with reduced IGF-I blood levels.

Male *Ptpn11*^{D61G/+} mice display decreased body length and weight by 3 weeks of age, which continues for at least 16 weeks after birth (Araki et al., 2004a). To further document this phenotype, we measured the anal-nasal lengths of male and female *Ptpn11*^{D61G/+} (NS) mice and compared them with their *Ptpn11*^{+/+} (WT) littermates. As shown in Fig. 1A and B, growth parameters in NS and WT mice were similar at birth and a 1 and 2 weeks of age. Interestingly, a significant reduction of body length and weight was then observed at 3 weeks of age for *Ptpn11*^{D61G/+} mice. This growth retardation profile remained stable until 6 weeks of

age. Thus, these results showed that male and female *Ptpn11*^{D61G/+} mice displayed early postnatal growth retardation.

Since linear growth is primarily controlled by the GH/IGF-I axis, we monitored IGF-I blood levels in growing *Ptpn11*^{D61G/+} and *Ptpn11*^{+/+} mice. As shown in Fig. 1C, IGF-I levels transiently raised during the first weeks of age of WT animals, with a peak at 4 weeks of age, in accordance with previous report (Hwang et al., 2008). Interestingly, while IGF-I level was similar in 1 and 2-weeks old WT and NS animals, it was significantly reduced in NS mice when compared with their WT littermates at 3, 4, and 5 weeks of age (32%, 45%, and 37% reduction, respectively). IGF-I levels then normalized in 6 week-old mice, confirming previous results that did not show any significant difference in IGF-I levels at that age (Araki et al., 2004a) (Fig. 1C). Therefore, this suggested that the transient raise in IGF-I levels was impaired in NS mice and that growth retardation in *Ptpn11*^{D61G/+} mice was associated with IGF-I deficiency during the early post-weaning growth period.

Moreover, among other hormones that regulate postnatal growth, the level of IGF-Binding Protein 3 (IGF-BP3), but not those of insulin nor cortisol, was significantly reduced in 3 weeks old NS mice when compared to their WT littermates (Table 1). Since IGF-I and IGF-BP3 are major GH target genes, this suggests that GH response is impaired in NS animals.

SHP2 negatively regulates GH-induced IGF-I production.

We next investigated whether SHP2 controls GH-induced IGF-I production. We took advantage of the well-characterized, GH-responsive, 3T3-F442A cell line in which we interfered with SHP2 function. First, we derived a stable cell line that inducibly represses SHP2 protein expression (3T3-F442A Δ SHP2^{ind}), using a doxycycline sensitive- lentiviral vector expressing an shRNA targeting *Ptpn11*, along with Green Fluorescent Protein (GFP) under control of a separate promoter (Fig. S1) (Wiznerowicz and Trono, 2003). Confluent, insulin-primed 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells were treated with doxycycline for 5 days or left untreated, serum-deprived overnight, and stimulated with 400 ng/ml GH. Then, IGF-I production was measured by ELISA. Under these conditions, doxycycline readily repressed SHP2 expression (Fig. 2A, top panel). Moreover, GH-induced IGF-I secretion was significantly increased in SHP2-deficient cells (+ dox) when compared with control (- dox) cells (Fig. 2A, bottom panel). We also compared 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells (+shRNA) with 3T3-F442A cells transduced with a lentiviral vector conditionally expressing GFP (3T3-F442A GFP^{ind}, -shRNA). In response to doxycycline, both of these cell lines expressed GFP

to a similar extent (Fig. S1C), but only the 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells repressed SHP2 expression (Fig S1D and 2B, top panel). Notably, we again observed increased IGF-I production in SHP2-deficient cells (Fig. 2B, bottom panel). Together, these results suggested that SHP2 negatively regulated GH-induced IGF-I production in 3T3-F442A cells.

SHP2 promotes GH-evoked ERK1/2, but not JAK2/STAT5 or PI3K/AKT activation.

We next investigated how SHP2 participates in GH-induced IGF-I by monitoring the activation of the main signaling pathways mobilized downstream of the GH-R, namely the JAK2/STAT5, the PI3K/AKT and the RAS/MAPK pathways, in untreated and doxycycline-treated 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells. As a prerequisite, we verified that SHP2 downregulation did not affect the expression of the main components of these pathways used as readouts (Fig S1D). Neither GH-induced STAT5 nor Akt phosphorylation was significantly modified in the absence of SHP2 (Fig. 3A, upper panels). By contrast, phosphorylation of the MAPK ERK1/2 was inhibited by >50% in SHP2-deficient cells (Fig. 3A, middle panel and Fig 3B), suggesting that SHP2 plays a positive role in GH-induced ERK1/2 activation.

To ensure that these effects were not limited to 3T3-F442A cells, we carried out similar experiments in HEK293 cells stably expressing GH-R (HEK-GHR) and transduced with lentiviruses encoding either the shRNA targeting *Ptpn11* mRNA (HEK-GHR-sh) or GFP (HEK-GHR-GFP) as a control. SHP2 expression was strongly reduced in HEK-GHR-sh cells (Fig. S2 and 3C, penultimate panel). Again, GH-induced STAT5 and Akt phosphorylation were insensitive to SHP2 downregulation (upper and second panels), whereas GH-stimulated ERK1/2 phosphorylation was strongly repressed (Fig. 3C, middle panel and Fig 3D).

To confirm this result using another approach, we took advantage of a catalytically inactive mutant of SHP2 (C459G) that displays a dominant negative activity on SHP2 function (Edouard et al., 2010; Hanna et al., 2006b). As shown in Fig. 3E, expression of the C459G mutant of SHP2 to a similar extent as the WT protein did not alter the phosphorylation of STAT5 or Akt (upper panels), but repressed ERK1/2 phosphorylation by ~ 60% (Fig. 3E, middle panel, and Fig. 3F). These data further confirm that SHP2 positively regulates GH-evoked ERK activation, and also suggests that this function requires its catalytic activity.

SHP2 participates in GH-induced RAS/ERK1/2 activation by dephosphorylating RASGAP binding sites on GAB1.

We next investigated how SHP2 promotes ERK activation in response to GH. First, we compared GH-evoked RAS activation in untreated and doxycycline-treated 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells using a pull-down assay for activated RAS (GST-RBD). As shown in Fig. 4A, GH stimulation of control cells induced RAS activation, whereas RAS loading was reduced by ~50% (Fig. 4B) in SHP2-deficient cells. These data indicate that SHP2 acts upstream of RAS in GH-R signaling.

It has been proposed that SHP2 can promote RAS activation by dephosphorylating specific residues involved in the recruitment of the RAS inhibitor RASGAP, notably on the docking protein GAB1 (Montagner et al., 2005a). As GAB1 is phosphorylated in response to GH-R activation (Kim et al., 2002), we assayed the ability of GAB1 to interact with a GST fusion protein containing the SH2 domains of RASGAP in control and SHP2-deficient cells. As shown in Fig. 4C, GAB1 was barely detected in RASGAP pull-downs performed from GH-stimulated control cell lysates (-dox), but was readily precipitated from SHP2-deficient cell lysates (+dox). These data suggest that, upon GH stimulation, SHP2 may dephosphorylate the RASGAP binding sites on GAB1, thereby favoring RAS activation. To verify this, we compared the phosphorylation of one of the RASGAP binding sites on GAB1, the tyrosine 307 (Y307) (Montagner et al., 2005a), in cells expressing SHP2-WT or its C459G derivative. As shown in Fig. 4D, the GAB1 Y307 phosphorylation was more important in cells expressing the C459G mutant of SHP2, further suggesting that SHP2 dephosphorylates this residue under GH stimulation. To assess this model, we then took advantage of a mutant of GAB1 defective for RASGAP binding (GAB1 Y307F/Y317F) (Montagner et al., 2005a) and tested whether its expression could rescue ERK phosphorylation in SHP2-deficient cells co-expressing a His-tagged ERK1. Interestingly, in HEK-GHR-shRNA expressing the Gab1 Y307F/Y317F mutant, ERK1 phosphorylation was increased to a level similar to that of control cells, suggesting that ERK1/2 inhibition in SHP2 deficient cells was due to sustained RASGAP recruitment (Fig. 4E and F).

To further evaluate this hypothesis, we tested whether RASGAP inhibition could rescue ERK1/2 activation in SHP2-deficient cells. As shown in Fig. 4G and 4H, siRNA-mediated RASGAP depletion in SHP2-deficient cells increased ERK1/2 phosphorylation, to an extent similar to that observed in control cells. These data are consistent with the

conclusion that RASGAP dysregulation is responsible for ERK1/2 inhibition in SHP2-deficient cells.

NS mutants enhance GH-induced ERK1/2 activation.

We next assessed the impact of NS mutations in GH signaling, by studying the effects of two mutants: the D61del variant, a strong mutant which is closely related to the D61G allele borne by the NS mouse used in this study, and the N308D mutant, a weak allele which is frequently found in NS patients. As shown in Fig. 5A and 5B, transient over-expression of either mutant in HEK-GHR caused enhanced phosphorylation of a co-expressed His-tagged ERK1 when compared with control cells. Likewise, over-expression of the N308D or the D61del mutant in 3T3-F442A cells via adenoviral infection resulted in increased GH-induced ERK1/2 phosphorylation (Fig. 5C and 5D). Then, as NS is due to heterozygous mutations of *PTPN11*, we expressed shRNA-resistant forms of the D61del or N308D mutants in 3T3-F442A cells and simultaneously decreased endogenous SHP2 expression using the lentiviral SHP2 shRNA, thereby mimicking heterozygous conditions (i.e., 50% WT SHP2/50% mutated SHP2) (Fig S3). Interestingly, in doxycycline-treated cells, GH-induced ERK1/2 phosphorylation was significantly enhanced when compared with controls (Fig. 5E and 5F). Hence, expression of two different NS-associated mutants of SHP2, even in a so-called “functional heterozygosity condition”, was sufficient to sustain ERK1/2 activation under GH stimulation. Noticeably, in the various experiments, there was no significant difference between the effect of both mutants, despite variable tendencies depending on the type of experiment or cell lines.

We then aimed at evaluating whether GH-evoked ERK1/2 phosphorylation was also increased in NS mice. To this aim, NS animals and their WT littermates were injected for 10 min with GH or vehicle as a control, then euthanized and their tissues were taken. Phosphorylation of STAT5, AKT and ERK1/2 were measured in the liver, the main GH target organ for IGF-I production. As shown in Fig 5G and H, P-STAT5 and P-AKT were induced by GH to the same extent in the liver of both genotypes. In sharp contrast, ERK1/2 phosphorylation was strongly increased in the liver of NS animals when compared to their WT littermates. From this set of results, we concluded that NS-driving SHP2 mutants upregulate GH-induced MAPK activation in vitro and in vivo.

ERK inhibition at least partially restores IGF-I levels and growth in NS mice.

We next sought a possible connection between the positive function of SHP2 in GH-induced ERK1/2 activation and its negative role in IGF-I production. We asked whether treating 3T3-F442A cells with U0126, a selective inhibitor of MEK1/2, affected GH-induced IGF-I release. Treatment with 50-500 nM U0126 induced partial ERK1/2 inhibition, similar to that seen in SHP2-deficient cells (compare Fig. 6A and Fig. 3A). Interestingly, U0126 at these doses also enhanced GH-induced IGF-I production to an extent similar to that caused by SHP2-deficiency (Fig. 6B). Thus partial ERK1/2 inhibition could stimulate IGF-I release upon GH treatment, suggesting that SHP2 may negatively regulate GH-induced IGF-I production through activation of the RAS/ERK pathway.

Therefore, we hypothesized that the decreased IGF-I levels in NS mice might result from ERK1/2 hyperactivation. To test this hypothesis, we treated cohorts of young *Ptpn11*^{D61G/+} and their WT littermates with U0126. Nursing females were treated with U0126 or vehicle control during the first 3 weeks of life of their litters, and IGF-I levels were quantified at the end of the treatment period. Nursing females and their litters looked healthy throughout the protocol. Importantly, U0126 treatment significantly increased IGF-I blood levels in *Ptpn11*^{D61G/+} mice, although the difference between WT, vehicle-treated animals and NS, U0126-treated animals remained significant (Fig. 6C). This suggested that ERK1/2 inhibition could enhance IGF-I production in NS mice. Interestingly, even after 3 weeks of treatment, U0126-treated NS mice displayed a significant increase in body length compared with untreated NS mice (7,1±0,15 cm vs 6,7±0,12 cm; *, p<0,05) (Fig. 6D), while body weight was not altered (10,9±0,8 g vs 9,6±0,5 g, n. s.) (Fig. 6E). However, U0126-treated NS animals did not catch up the size of WT animals yet. Altogether, these results suggest that ERK1/2 inhibition can, at least partially, rescue growth retardation in NS mice, most likely by restoring appropriate IGF-I levels.

DISCUSSION

In this study, we sought a molecular mechanism that could explain how NS-causing SHP2 mutants induce growth retardation, a major feature of NS. First, we demonstrated that short stature in young *Ptpn11*^{D61G/+} mice was acquired shortly after birth and was associated with low IGF-I levels during the early post-weaning growth phase. These findings suggested

that IGF-I induction was impaired in growing NS animals, which could contribute to growth retardation in NS. Interestingly, NS patients, notably those carrying a *PTPN11* mutation, also display low IGF-I levels (Binder et al., 2005a; Limal et al., 2006a), although this does not exclude that other non-endocrine processes, notably at the bone or brain levels, could be altered in NS. Supporting this, it has been reported that induced SHP2- deficient mice develop important skeletal abnormalities and that SHP2 knock-out in proopiomelanocortin (POMC) neurons result in larger mice (Banno et al., 2010; Bauler et al.).

It must be noted that IGF-I levels are only reduced by 40% in NS mice, whereas studies of several models of *Igf-I* gene disruption have shown that even a 75% reduction of IGF-I levels does not cause growth retardation (Sjogren et al., 1999). This apparent discrepancy could maybe be explained by the dysregulation of IGF-I cofactors in NS, resulting in a more decreased IGF-I bioactivity/bioavailability. In support of this hypothesis, we observed that IGF-BP3 levels were also reduced in NS animals and it has been shown that NS patients display low-levels of Acid Labile Subunit (ALS), another key regulator of the stability of IGF-I/IGF-I-binding proteins complexes (Limal et al., 2006a). Interestingly, double knock-out mice with total *Als* and liver-specific *Igf-I* inactivation are 20% shorter than control animals (Yakar et al., 2002). Further studies will be necessary to elucidate the contribution of those different processes in NS-associated short stature.

Our finding of decreased IGF-I levels in NS mice suggested that GH signaling was impaired in these mice. Indeed, SHP2 down-regulation in 3T3-F442A cells caused sustained GH-induced IGF-I release. Thus, our combined results suggest that SHP2 may negatively regulate the hepatic production of IGF-I under GH control. This regulation might be restricted to the growing period, as NS mice show a normalization of IGF-I levels after 6 weeks. Supporting this view, it was recently shown that liver-specific deletion of SHP2 did not result in an increase of hepatic *Igf-I* mRNA level in older mice (Matsuo et al., 2010).

Next, we investigated how SHP2 regulates GH-induced IGF-I production. Several studies have shown that SHP2 can negatively regulate the JAK2/STAT5 pathway, the main regulator of IGF-I transcription (Xu and Qu, 2008). However, we did not observe any effect of SHP2 modulation on GH-evoked STAT5 phosphorylation. Moreover, it has been reported that GH-induced IGF-I transcription can be positively regulated by PI3K (Shoba et al., 2001). Although SHP2 can inhibit PI3K upon some stimuli (Zhang et al., 2002a), GH-evoked PI3K/Akt activation was insensitive to SHP2 modulation. However, we can not exclude that

our experimental design do not allow monitoring an increase in STAT5 or AKT phosphorylations upon SHP2 inhibition or that a more complete SHP2 inhibition could be required to reveal it. By contrast, we found that SHP2 participates in GH-induced RAS/ERK activation, possibly by dephosphorylating the RASGAP-binding sites borne by GAB1. Furthermore, NS-driving SHP2 mutants hyper-activate this signaling pathway in response to GH *in vitro* and *in vivo*, suggesting that dysregulation of GH-induced ERK1/2 activation could contribute to growth retardation in this syndrome.

We next assessed whether the SHP2-mediated IGF-I inhibition was dependent on ERK1/2 activation. Using a pharmacological approach, we could demonstrate that partial ERK1/2 inhibition induced an increase in GH-stimulated IGF-I production. This suggests that, upon GH stimulation, ERK1/2 negatively regulates IGF-I release, through mechanisms that remain to be established. From our results, we hypothesized that ERK1/2 inhibition in NS mice could restore IGF-I levels, thereby improving the growth retardation phenotype. Importantly, we found that pharmacological inhibition of MEK1/2 significantly increased IGF-I levels in NS mice, suggesting that normalization of NS mutant-induced ERK1/2 hyperactivation can improve their IGF-I deficiency. Moreover, we observed that U0126 treatment increased linear growth of *Ptpn11*^{D61G/+} mice. Taking into account that this treatment results in increased IGF-I level, we can thus propose that the effect of ERK1/2 inhibition on NS-linked growth phenotype can be due, at least in part, to the restoration of IGF-I deficiency. Of note, since we observed only a partial effect of U0126 treatment on IGF-I level, further studies will be necessary to determine whether the pharmaco-kinetics of the U0126 treatment should be improved or whether IGF-I deficiency in NS is only partially due to ERK1/2 hyperactivation.

Finally, our results provide the first direct evidence that growth retardation in *PTPN11*-mutated NS may be due to partial GH resistance related to a post-receptor signaling defect (Binder et al., 2005a; Limal et al., 2006a) (Fig. 7), which may have important therapeutic consequences. So far, only recombinant human GH (rhGH) treatment has been proposed to increase stature in NS, but its efficiency is still debated. Indeed, rhGH therapy can lead to moderate height gain but does not normalize adult stature in all patients, although heterogeneous protocols and outcome criteria have made the surveys of the efficacy of this regime difficult to compare (Noordam et al., 2008a; Raaijmakers et al., 2008; Romano et al., 2009). Our data suggesting that NS-associated *PTPN11* mutations cause partial GH resistance, could explain the moderate efficacy of rhGH treatment, and emphasizes the need

for alternative therapies. In view of the beneficial effects of rhIGF-I treatment in patients with severe IGF-I deficiency, there may be a rationale for rhIGF-I therapy in *PTPN11*-mutated NS patients (Chernausek et al., 2007), although long-term follow-up would be required given the neoplasias-promoting effect of IGF-I (Samani et al., 2007). Second, our results suggest that ERK1/2 inhibition could be a logical treatment to improve growth velocity in patients with NS, possibly by restoring IGF-I levels. Interestingly, several reports in animal models have demonstrated that treatment with MEK inhibitors can rescue growth defect in 3 different NS models (*Ptpn11*^{Q79R/+}, *Raf1*^{L613V/+} and *Sos1*^{E846K/E846K}) and in other RASopathies, and can also alleviate other clinical traits, notably cardiopathies and cranial malformations (Araki et al., 2009a; Chen et al.; Krenz et al., 2008a; Nakamura et al., 2007b; Nakamura et al., 2009b; Wu et al., 2011). This, combined with our own study, provides further insights into the fact that RAS/ERK inhibition could be a potent strategy to treat RASopathies, including NS. Although promising, additional studies will be required to precisely assess the potency and safety of such treatment. Indeed, various adverse effects of MEK inhibitors have been reported and a most recent study also revealed that such a treatment can promote overweight of NS patients (Chappell et al.; Wu et al., 2011).

MATERIAL AND METHODS

SiRNA and plasmid transient transfection. For siRNA transfections, 40% confluent 3T3-F442A cells were incubated overnight with a transfection mix containing 1 ml of Opti-MEM, 5 µl of RNAiMAX (Invitrogen) and 20 nM of the indicated siRNA. For plasmid transfection, subconfluent HEK-GHR cells grown in 100-mm plates were incubated overnight with a mixture containing 6 µl of FuGene6 reagent (Roche) and 2 µg of total DNA, according to the manufacturer's instructions.

Adenoviral infection. Generation of recombinant adenoviruses has been described (Edouard et al., 2010). For transduction of 3T3-F442A cells, adenoviruses were mixed with 0.5 µg/ml poly-L-lysine for 90 min in DMEM supplemented with antibiotics and 2% HEPES 1M. Cells were incubated with this mixture for 2 hours.

In vivo experiments. The *Ptpn11*^{D61G/+} mouse strain was maintained by crossing *Ptpn11*^{D61G/+} males with B6X129Sv wild type females (Charles River Laboratories). Genotyping was performed as previously described (Araki et al., 2004a). Blood samples were collected from the retro orbital sinus of isoflurane-anesthetized animals. To assess GH-evoked signaling *in vivo*, animals were injected intraperitoneally (i.p.) with GH (8 µg/g body weight) or PBS for 10 min, then euthanized and liver was taken. Liver samples were homogenized using a Precellys 24 automated biological sample lyser, then protein amounts were normalized by the

Bradford method (Bio-Rad) and homogenates were processed for western blot analysis. For U0126 treatment, U0126 (5 mg/kg/day) or vehicle (PBS, 40% DMSO) was i.p. injected to the nursing females daily during 20 days. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license.

IGF-I measurements. For GH-induced IGF-I production in 3T3-F442A cells, confluent cells were grown for 7 days in DMEM supplemented with 10% FBS and 50 nM insulin, and treated or not with 0.05 µg/ml doxycycline for the last 5 days. Cells were then serum-starved overnight, treated or not with U0126, stimulated or not with 400 ng/ml GH for 24 hrs. Conditioned media were collected and processed for IGF-I ELISAs. To measure IGF-I levels in blood, samples were allowed to clot overnight at 4°C, and then they were centrifuged and plasma was harvested and processed for IGF-I ELISAs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Agence Nationale de la Recherche, NSEuroNet, Association pour la Recherche sur le Cancer, Institut National du Cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer grants (AN, TE, KT, MT, PR, AY), DHOS/INSERM and Pfizer 07.8RN.062 fundings (MM, JPS, MTT), a National Institutes of Health grant RO1CA49152 (BGN) and a CIHR grant 106526 (TA). We acknowledge the Ontario Ministry of Health and Long Term care and the Princess Margaret Hospital Foundation for partial support. We are grateful to C. Fourreau, O. Farrugia, H. Lulka, C. Nevoit, M. Toulouse and Y. Barreira for help with animal handling, D. Daviaud, N. Malet and C. Roland for valuable technical help and C. Vigouroux for advices on adenoviral infection. We acknowledge J. Ragab, C. Racad, E. Gouze, F. Conte, J-P. Combiér, S. Caula, and R. Chaaya for helpful discussions and J-S. Saulnier-Blache for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Romano, A. A., *et al.* (2010) Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines *Pediatrics* **126**, 746-759.
2. Tartaglia, M., Gelb, B. D., & Zenker, M. (2011) Noonan syndrome and clinically related disorders *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **25**, 161-179.
3. Tidyman, W. E. & Rauen, K. A. (2009) The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation *Curr Opin Genet Dev* **19**, 230-236.
4. Tartaglia, M., *et al.* (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome *Nat. Genet.* **29**, 465-468.
5. Edouard, T., *et al.* (2007) How do Shp2 mutations that oppositely influence its biochemical activity result in syndromes with overlapping symptoms? *Cell. Mol. Life. Sci.* **64**, 1585-1590.
6. Neel, B. G., Gu, H., & Pao, L. (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284-293.
7. Dance, M., *et al.* (2008) The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway *Cell. Signal.* **20**, 453-459.
8. Matsuo, K., *et al.* (2010) Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2 *J Biol Chem* **285**, 39750-39758.

9. Saxton, T. M., *et al.* (2000) The SH2 tyrosine phosphatase shp2 is required for mammalian limb development *Nat. Genet.* **24**, 420-423.
10. Zhang, E. E., Chapeau, E., Hagihara, K., & Feng, G. S. (2004) Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16064-16069.
11. Ke, Y., *et al.* (2006) Conditional deletion of Shp2 in the mammary gland leads to impaired lobulo-alveolar outgrowth and attenuated Stat5 activation *J. Biol. Chem.* **281**, 34374-34380.
12. Kontaridis, M. I., *et al.* (2008) Deletion of Ptpn11 (Shp2) in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy via effects on the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase and RhoA signaling pathways *Circulation* **117**, 1423-1435.
13. Jopling, C., van Geemen, D., & den Hertog, J. (2007) Shp2 knockdown and Noonan/LEOPARD mutant Shp2-induced gastrulation defects *PLoS Genet.* **3**, e225.
14. Keilhack, H., *et al.* (2005) Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes *J. Biol. Chem.* **280**, 30984-30993.
15. Tartaglia, M., *et al.* (2006) Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 279-290.
16. Fragale, A., Tartaglia, M., Wu, J., & Gelb, B. D. (2004) Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation *Hum. Mutat.* **23**, 267-277.
17. Araki, T., *et al.* (2004) Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation *Nat. Med.* **10**, 849-857.
18. Nakamura, T., *et al.* (2007) Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome *J. Clin. Invest.* **117**, 2123-2132.
19. Araki, T., *et al.* (2009) Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4736-4741.
20. Krenz, M., *et al.* (2008) Role of ERK1/2 signaling in congenital valve malformations in Noonan syndrome *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18930-18935.
21. Nakamura, T., Gulick, J., Pratt, R., & Robbins, J. (2009) Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
22. Binder, G., Neuer, K., Ranke, M. B., & Wittekindt, N. E. (2005) PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 5377-5381.
23. Limal, J. M., *et al.* (2006) Noonan syndrome: relationships between genotype, growth, and growth factors *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 300-306.
24. Hwang, D. L., Lee, P. D., & Cohen, P. (2008) Quantitative ontogeny of murine insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein-3 and the IGF-related acid-labile subunit *Growth Horm IGF Res* **18**, 65-74.
25. Wiznerowicz, M. & Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference *J Virol* **77**, 8957-8961.
26. Hanna, N., *et al.* (2006) Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: consequences for PI3K binding on Gab1 *FEBS Lett.* **580**, 2477-2482.
27. Edouard, T., *et al.* (2010) Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3beta signaling *Mol Cell Biol* **30**, 2498-2507.
28. Montagner, A., *et al.* (2005) A novel role for Gab1 and SHP2 in EGF-induced Ras activation *J. Biol. Chem.* **280**, 5350-5360.
29. Kim, S. O., *et al.* (2002) A role for Grb2-associated binder-1 in growth hormone signaling *Endocrinology* **143**, 4856-4867.
30. Bauler, T. J., *et al.* Development of severe skeletal defects in induced SHP-2-deficient adult mice: a model of skeletal malformation in humans with SHP-2 mutations *Disease models & mechanisms* **4**, 228-239.
31. Banno, R., *et al.* (2010) PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice *The Journal of clinical investigation* **120**, 720-734.
32. Sjogren, K., *et al.* (1999) Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7088-7092.
33. Yakar, S., *et al.* (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density *The Journal of clinical investigation* **110**, 771-781.
34. Xu, D. & Qu, C. K. (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway *Front Biosci* **13**, 4925-4932.

35. Shoba, L. N., Newman, M., Liu, W., & Lowe, W. L., Jr. (2001) LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes *Endocrinology* **142**, 3980-3986.
36. Zhang, S. Q., *et al.* (2002) Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2 *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4062-4072.
37. Noordam, C., *et al.* (2008) Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11 *Eur. J. Endocrinol.* **159**, 203-208.
38. Raaijmakers, R., *et al.* (2008) Response to growth hormone treatment and final height in Noonan syndrome in a large cohort of patients in the KIGS database *J Pediatr Endocrinol Metab* **21**, 267-273.
39. Romano, A. A., *et al.* (2009) Growth response, near-adult height, and patterns of growth and puberty in patients with noonan syndrome treated with growth hormone *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 2338-2344.
40. Chernausek, S. D., *et al.* (2007) Long-term treatment with recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I in children with severe IGF-I deficiency due to growth hormone insensitivity *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 902-910.
41. Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D., & Brodt, P. (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights *Endocrine reviews* **28**, 20-47.
42. Wu, X., *et al.* (2011) MEK-ERK pathway modulation ameliorates disease phenotypes in a mouse model of Noonan syndrome associated with the Raf1(L613V) mutation *The Journal of clinical investigation* **121**, 1009-1025.
43. Chen, P. C., *et al.* Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated Sos1 mutation *The Journal of clinical investigation* **120**, 4353-4365.
44. Chappell, W. H., *et al.* (2011) Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health *Oncotarget* **2**, 135-164.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Growth retardation in NS mice correlates with lower IGF-I level.

A, B- *Ptpn11*^{D61G/+} (NS) and *Ptpn11*^{+/+} (WT) mice were measured (**A**) and weighted (**B**) at indicated ages. Data represent mean +/- SEM. Statistical significance was assessed by the ANOVA plus Bonferroni post-test (n. s. non significant; **, p<0,01; *** p<0,001). **C-** Blood IGF-I level of *Ptpn11*^{D61G/+} (NS) and *Ptpn11*^{+/+} (WT) mice was determined by ELISA at indicated ages. Individual values and mean +/- SEM are represented (n. s. non significant, **, p<0,01, *** , p<0,001, ANOVA plus Bonferroni post-test).

Figure 2: SHP2 negatively regulates GH-induced IGF-I expression. **A-** Confluent, insulin-primed, 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells were treated (+dox) or not (-dox) with doxycyclin. Top panel: aliquots of cells were processed for western blot analysis as indicated. Bottom panel: Cells were serum-deprived and stimulated with GH for 24h, then IGF-I concentration was measured in the medium by ELISA. **B-** Same experiment as in A except that 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells (+shRNA) and 3T3-F442A expressing only GFP (-shRNA), both doxycyclin-treated, were used. Data represent mean +/- SEM of 3 independent experiments (***, p<0,001, 2-tailed Student's t test).

Figure 3: SHP2 promotes GH-evoked ERK1/2 activation, but does not influence JAK2/STAT5 and PI3K/Akt signalings. **A, B-** 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells were treated (+dox) or not (-dox) with doxycyclin, serum-starved, then stimulated with GH during the indicated times, lysed and processed for western blot analysis using the indicated antibodies.

C, D-HEK-GHR-GFP or HEK-GHR-shRNA were processed as in A. **E, F**-3T3-F442A cells were infected with adenoviruses encoding GFP, SHP2-WT or SHP2-C459G, then processed as in A. Note that exogenous SHP2-WT and SHP2-C459G have a higher molecular weight than endogenous SHP2 due to His tag. **B, D, F**- P-ERK1/2 western blots obtained from at least 3 independent experiments described in A, C, and E were semi-quantified using the Image J software. Histograms represent mean +/- SEM (*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001, paired Student's t test).

Figure 4: SHP2 participates in GH-induced RAS activation through inhibition of RASGAP recruitment. **A, B.** 3T3-F442A sh-SHP2^{ind} cells were processed as in Fig. 3A. Activated RAS was isolated from cleared lysates using a GST-RBD fusion protein. An anti-RAS western blot was performed on the GST-RBD pulldown and on the lysates as a loading control. **C**- Cells were treated as in A, except that a GST-RASGAP fusion protein was used and an anti-GAB1 western blot was performed. Results are representative from 3 independent experiments. **D**- 3T3-F442A cells were infected with adenoviruses encoding SHP2-WT or SHP2-C459G, stimulated for the indicated times, lysed and processed for western blot analysis using the indicated antibodies (P-GAB1: phospho Y307). Results are representative from 3 independent experiments. **E, F**- HEK-GHR-shRNA and HEK-GHR+shRNA cells were transfected with ERK1-His and empty vector (EV) as a control or a Myc-tagged GAB1 Y307F/Y317F mutant (GAB1-YYFF). Cells were serum starved, then stimulated with GH for 10 min, and His-tagged Erk1 was precipitated from cleared lysates using Probond resin (Invitrogen) and processed for P-ERK1/2 western blot (upper panel). Aliquots from cleared lysates were processed for anti-myc and anti-his western blot analyses (lower panels). **G, H**- 3T3-F442A sh-SHP2^{ind} were treated (+dox) or not (-dox) with doxycyclin, transfected with control or anti-RASGAP siRNA, serum starved, then GH-stimulated and processed for Western blot analysis as indicated. Anti-RAS (**B**) and anti-P-ERK1/2 (**F, H**) immunoblots from at least 3 independent experiments performed in A, E and G were semi-quantified using the ImageJ software. Only significant differences are indicated (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, paired Student's t-test).

Figure 5: NS-causing SHP2 mutants upregulate GH-induced ERK1/2 activation. **A, B**- HEK-GHR cells were cotransfected with a plasmid encoding His-tagged ERK1 and constructs encoding His tagged SHP2 WT, D61del or N308D variants, or the empty vector (-) as a control, then processed as in Fig. 4E. **C, D**- 3T3-F442A cells were infected with adenoviruses encoding GFP, SHP2-N308D or SHP2-D61del, serum starved, then GH-stimulated and processed for western blot analysis as indicated. **E, F**- Untreated (-dox) or 0,005 µg/ml doxycyclin-treated (+dox) 3T3-F442A ΔSHP2/N308D and 3T3-F442A ΔSHP2/D61del were GH-stimulated, lysed and processed for western blot analysis as indicated. **B, D, F**- P-ERK1/2 immunoblots from 3 independent experiments described in A, C, and E were semi-quantified using the ImageJ software. Only significant differences versus control are indicated (**, p<0,01; ***, p<0,005, paired Student's t-test). **G, H**- Fasted *Ptpn11*^{D61G/+} (NS) and *Ptpn11*^{+/+} (WT) mice were i. p. injected with 8 µg/g GH (+) or PBS (-) for 10 min, then euthanized and liver was taken. Liver extracts were prepared and equal amounts of proteins were processed for western blot analysis. **H**- P-STAT5, P-AKT and P-

ERK1/2 immunoblots from the experiment described in G were semi-quantified using the ImageJ software. Only significant differences versus control are indicated (**, $p < 0,01$, paired Student's t-test).

Figure 6: Inhibition of the ERK1/2 pathway partially restores IGF-I level *in vitro* and *in vivo* and improves growth of NS mice. **A-** 3T3-F442A cells were serum-starved overnight, then treated with the indicated dose of U0126, stimulated with GH for 10 min, then lysed and processed for western blot analysis as indicated. **B-** Confluent 3T3-F442A were processed as in Fig. 2A, treated with the indicated doses of U0126, stimulated with GH for 24h, then IGF-I concentration was measured by ELISA. Histograms represent the mean \pm SEM from 4 different experiments (**, $p < 0,01$, paired Student's t-test). **C, D, E-** 5 days after delivery, nursing females were i.p. injected daily with U0126 or vehicle for 20 days, then blood IGF-I level of the pups was determined by ELISA (C), as well as their body length (D) and weight (E). Four litters were used, with equivalent animal numbers and body weight at birth (Number of animals: *Ptpn11*^{+/+}/PBS: 5; *Ptpn11*^{+/+}/U0126: 5; *Ptpn11*^{D61G/+}/PBS: 9; *Ptpn11*^{D61G/+}/U0126: 8). Data represent mean \pm SEM (n. s. non significant, *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,005$, Student's t-test).

Table 1: Sera from 5-weeks old *Ptpn11*^{D61G/+} (NS) and *Ptpn11*^{+/+} (WT) mice were analysed for IGF-I, IGF-BP3, insulin and cortisol levels by ELISA. Data represent mean \pm SEM (n. s., non significant, **, $p < 0,01$, Student's t-test).

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Fig. S1. Characterization of the 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cell line. **A-** 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells were treated with the indicated doses of doxycycline for 5 days, then cells were lysed and processed for Western blot analysis using the indicated antibodies. We determined that 50 ng/ml doxycycline was sufficient to fully repress SHP2 expression after 5 days of treatment, whereas lower doses (1 ng/ml) allowed dampening of SHP2 expression to half of its normal level. **B-** 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells were incubated with 0,05 μ g/ml doxycycline for the indicated times, then processed as in A. Note that the maximum down-regulation was reached after 5 days of doxycyclin treatment. From this, we concluded that this so-called 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cell line appears as a potent model to inducibly downregulate SHP2 expression. **C-** 3T3-F442A Δ SHP2^{ind} cells treated (+dox) or not (-dox) for 5 days with with 0,05 μ g/ml doxycycline, and doxycyclin treated-3T3-F442A GFP^{ind} cells were analysed by phase contrast (upper photomicrographs) and fluorescence (lower photomicrographs) microscopy. **D-** Lysates from cells described in C were processed for western blot analysis using the indicated antibody.

Fig. S2: Characterization of the HEK-GHR \pm shRNA cell lines: **A-** HEK-GHR cells expressing (HEK-GHR+shRNA) or not (HEK-GHR-shRNA) an shRNA against SHP2 were analysed by phase contrast (upper photomicrographs) and fluorescence (lower photomicrographs) microscopy. **B-** Lysates from cells described in A were processed for western blot analysis using the indicated antibody.

Fig. S3: Characterization of 3T3-F442A Δ SHP2/N308D (N308D) and 3T3-F442A Δ SHP2/D61del (D61del) cells lines. Cells were treated with the indicated doses of doxycycline, then lysed and processed for immunoblotting using the indicated antibodies. When cells were treated with 0.05 μ g/ml doxycyclin, expression of endogenous SHP2 was almost completely switched off, indicating that the cells homogeneously expressed the lentiviral constructs. Moreover, expression of the mutants was switched on to a comparable level with the endogenous protein. More interestingly, by treating the cells with 0.005 μ g/ml doxycyclin, expression of endogenous SHP2 was reduced by half, while a similar amount of exogenous SHP2 was expressed. Thus, we assumed these experimental conditions closely mimicked the heterozygous situation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Materials. Monoclonal anti-phosphoERK1/2 and anti-tubulin antibodies, and anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibodies were from Sigma-Aldrich Co. Polyclonal anti-phosphoAKT, anti-phosphoSTAT5 and anti phospho GAB1 (Y307) antibodies were from Cell Signaling Technology, anti-SHP2, anti-GAB1 and anti-Myc were from Santa Cruz Biotechnology Inc. and anti-RASGAP was from Upstate. The monoclonal anti-His antibody was from Invitrogen and the anti-RAS antibody was from Calbiochem. Control and anti-RASGAP siRNAs were from Qiagen. U0126 was from Cell Signaling Technology. The mouse IGF-I and IGF-BP3 quantikine ELISA kits were from R&D System, the mouse Insulin EIA kit was from Mercodia and the Cortisol EIA kit was from Enzo Life Sciences. Unless otherwise indicated, cell culture reagents were from Invitrogen and chemicals were from Sigma-Aldrich Co.

Cell culture and Stimulation. Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) and mouse preadipocytes 3T3-F442A were cultured at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or 10% newborn calf serum (NBCS) respectively, and antibiotics. Cells were incubated overnight in serum-free medium, then stimulated with 400 ng/ml GH (Norditropine, NovoNordisk) during indicated times.

Expression plasmids. pLVTHM, PAX2, pMD2G-VSVG, ptTR-KRAB and pWPI vectors were a generous gift from Dr D. Trono (Lausanne, Switzerland) and were distributed by Addgene (Cambridge, USA). A cassette encoding an shRNA targeting SHP2's mRNA (targeted sequence: CGTGTTAGGAACGTCAAAGAA) was subcloned into pLVTHM (plasmid referred to as LVTHM/sh-SHP2). Plasmids encoding ERK1-His, Gab1 Y307F/Y317F-Myc, V5-SHP2-WT, -D61del, and -N308D have been already described (Edouard et al., 2010; Hanna et al., 2006b; Montagner et al., 2005a; Yart et al., 2001). V5-SHP2-D61del, and -N308D cDNA were made shRNA-resistant by generating silent mutations through site-directed mutagenesis, then subcloned into pLVTHM/sh-SHP2 in lieu of the GFP cassette. Human GH-R was subcloned into pWPI. All constructs were verified by sequencing. Details about vectors construction are available upon request.

Generation of lentiviruses and viral transduction. Recombinant lentiviruses were produced by cotransfection of 293T cells with the pMD2G-VSVG and PAX2 packaging plasmids together with the pLVTHM, the pWPI or the pTR-KRAB plasmids, as described previously (Wiznerowicz and Trono, 2003) and titered using the Quick Titer™ Lentivirus Titer kit (Cell Biolabs, Inc.). Cells were co-transduced with shRNA or SHP2 mutants-encoding lentivirus together with tTR-KRAB expressing particles (MOI 10) by incubation of the cells for 16 hrs in lentivirus-containing medium in the presence of 8 µg/ml polybrene.

Cell lysis, immunoprecipitation, affinity precipitation assays and immunoblotting. For analysis of crude cell lysates, cells were directly scrapped off in electrophoresis sample buffer. Immunoprecipitation was performed as previously described (Yart et al., 2001). For GST-RBD and GST-RASGAP affinity precipitation assays, production of GST fusion proteins containing the RAS-binding domain (RBD) of Raf-1 (GST-RBD) or the SH2 domains of RASGAP (GST-GAP3S) and affinity precipitation assays were performed as already described (Montagner et al., 2005a). Protein amount was normalized by the Bradford method (Bio-Rad). Proteins were then resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotted using a standard procedure. Blots were developed using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Inc.).

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Montagner, A., *et al.* (2005) A novel role for Gab1 and SHP2 in EGF-induced Ras activation *J. Biol. Chem.* **280**, 5350-5360.
2. Edouard, T., *et al.* (2010) Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3beta signaling *Mol Cell Biol* **30**, 2498-2507.
3. Hanna, N., *et al.* (2006) Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: consequences for PI3K binding on Gab1 *FEBS Lett.* **580**, 2477-2482.
4. Yart, A., *et al.* (2001) A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of Ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor *J. Biol. Chem.* **276**, 8856-8864.
5. Wiznerowicz, M. & Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference *J Virol* **77**, 8957-8961.

Figure 1 Nédélec et al.

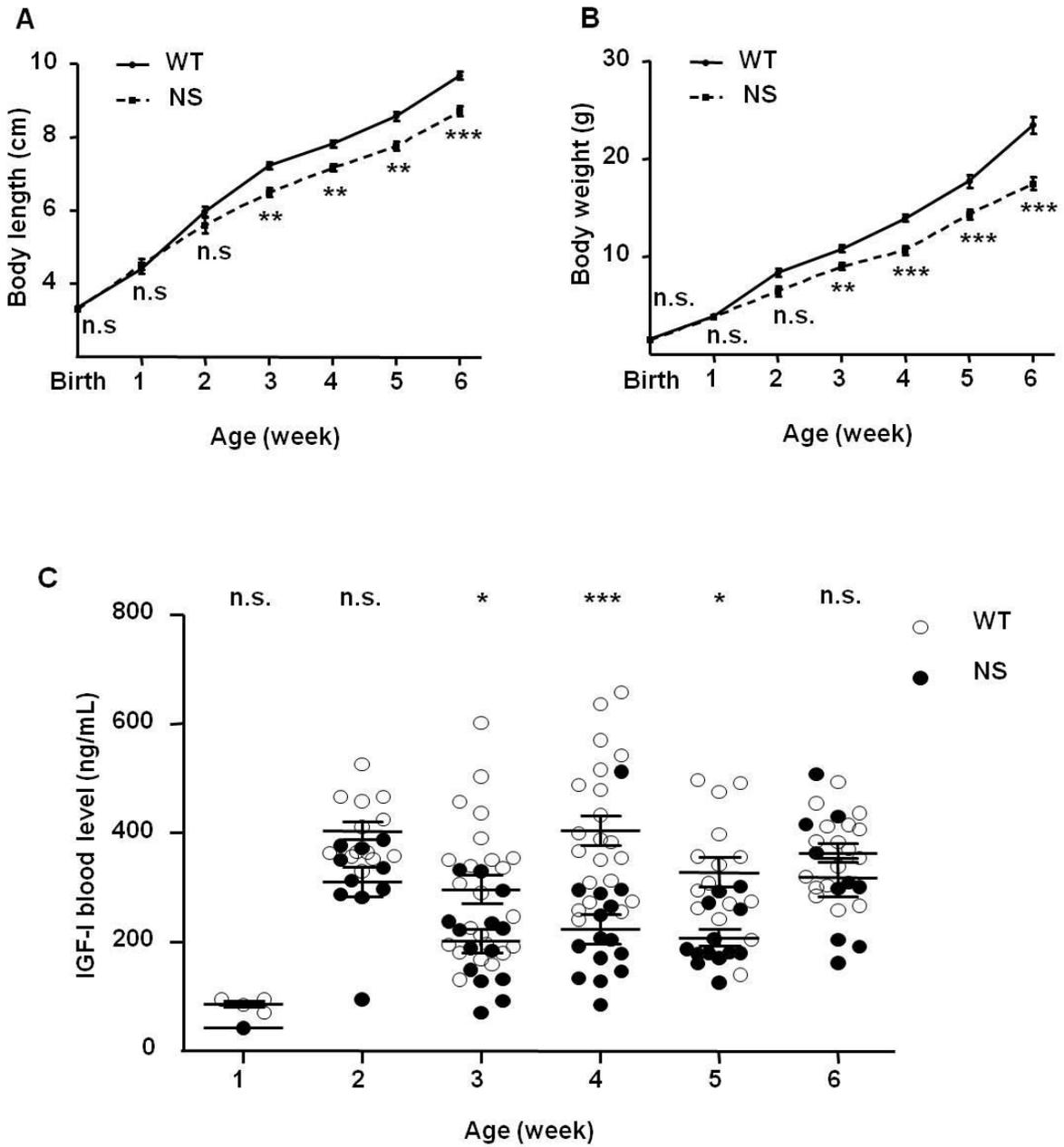


Figure 2 Nédélec et al.

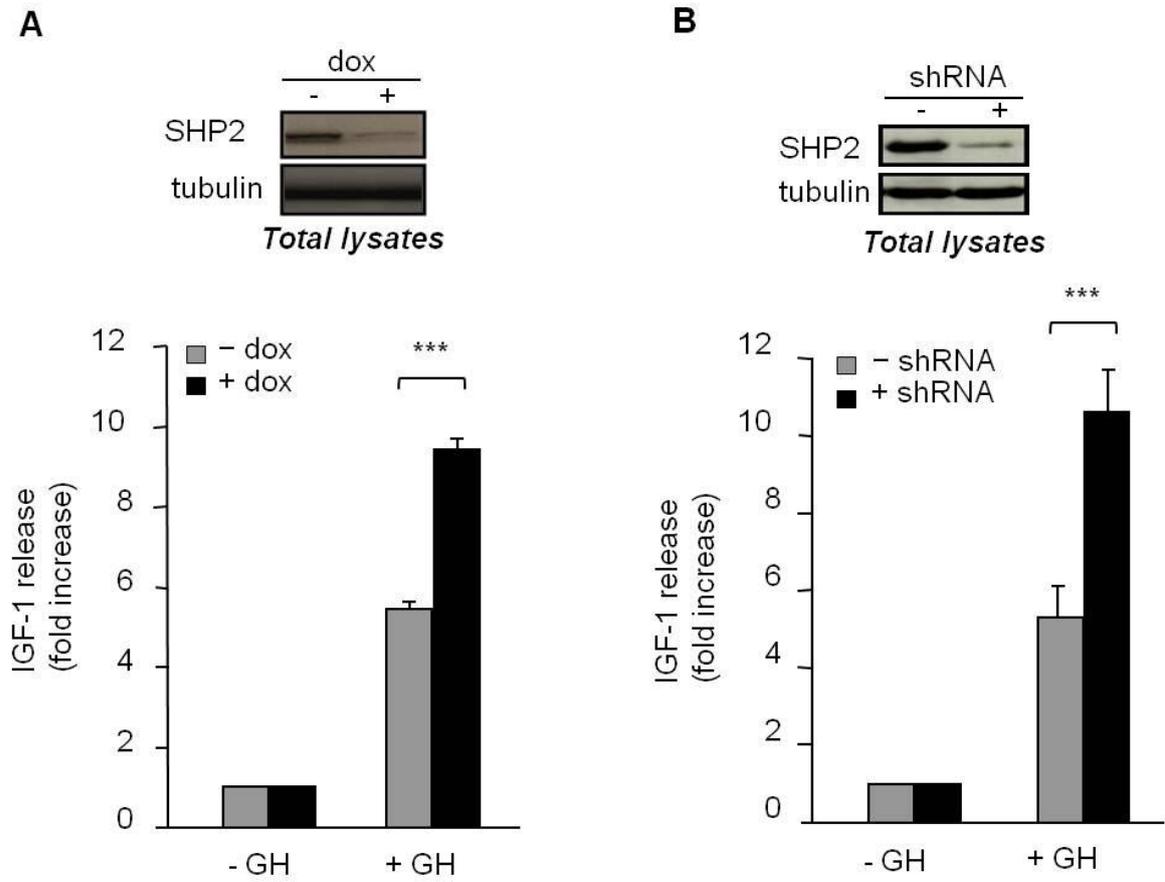


Figure 3 Nédélec et al.

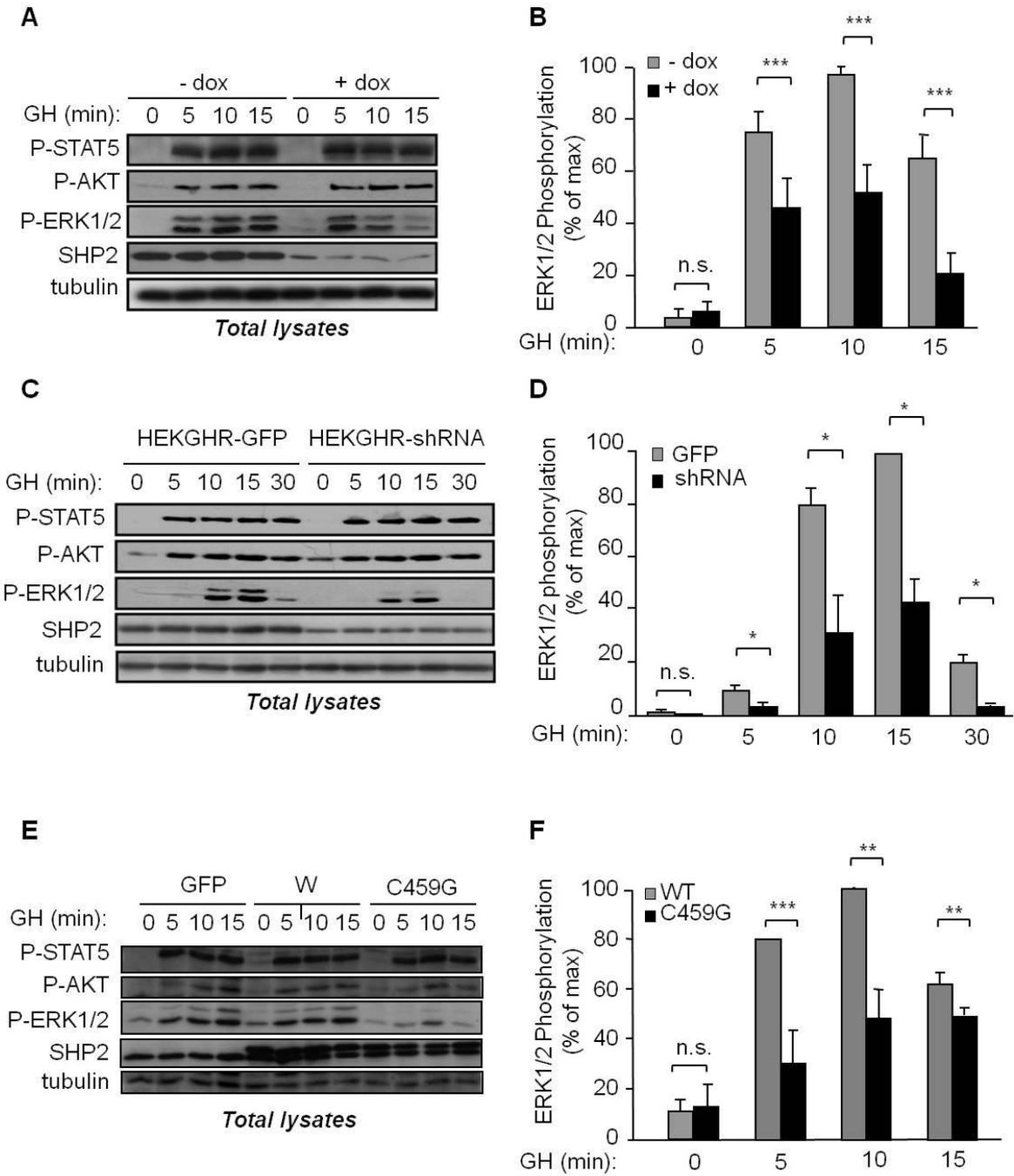


Figure 4 Nédélec et al.

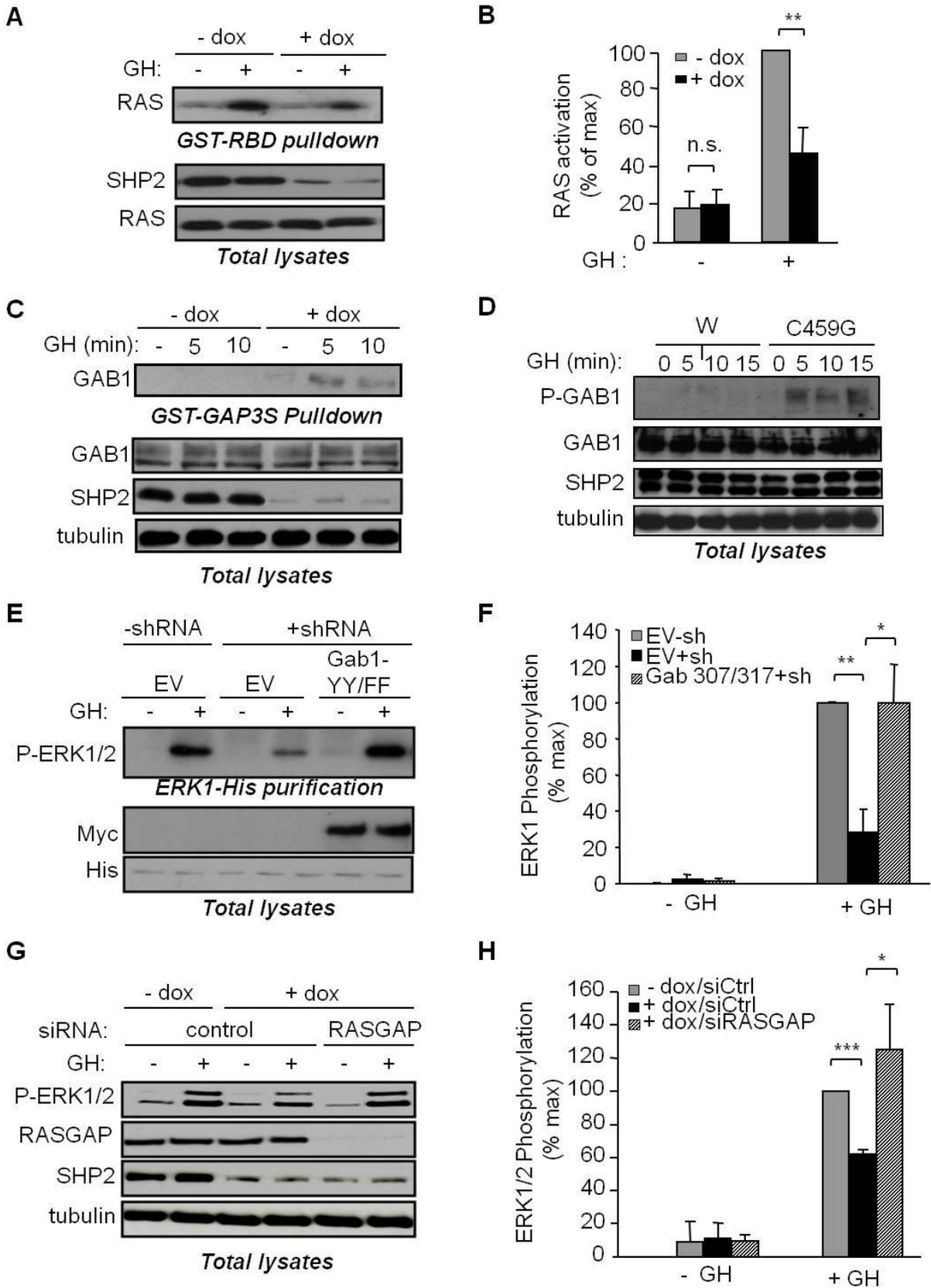


Figure 5 Nédélec et al.

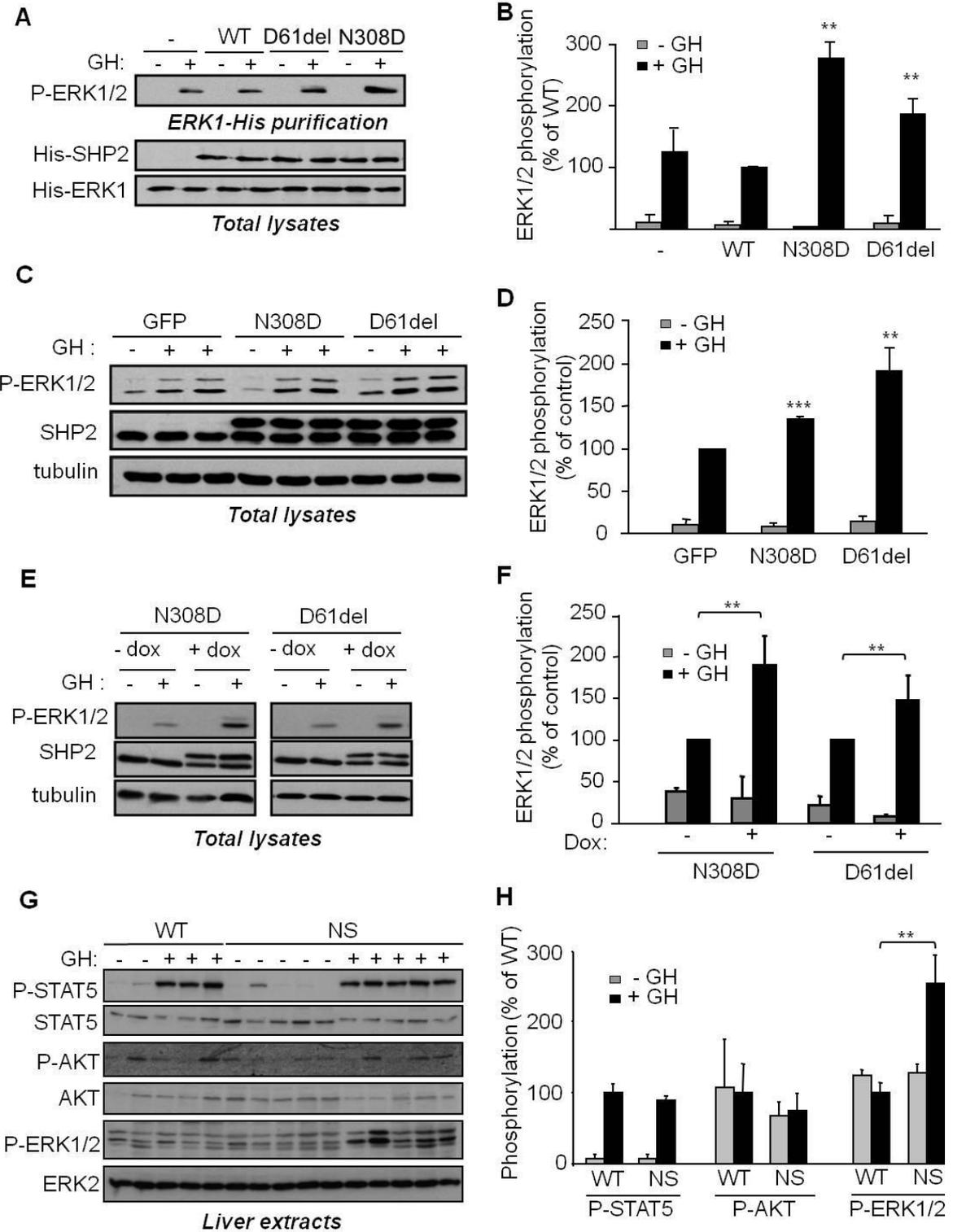


Figure 6 Nédélec et al.

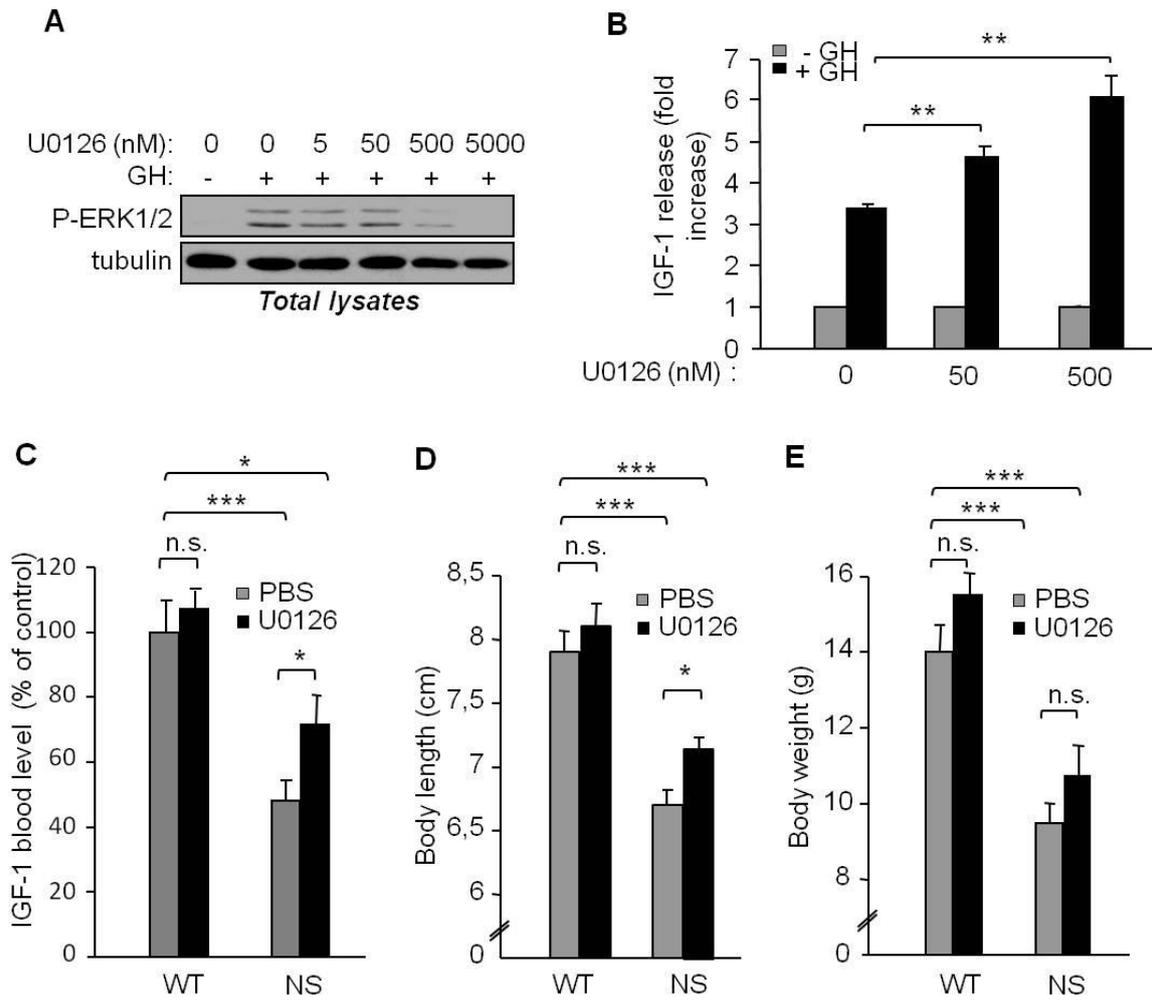


Table 1 Nédélec et al.

	WT	NS
IGF-I (ng/ml)	319,5+/-26,8	211,6+/-26,2
% of WT		66,2+/-8,2
		**
IGF-BP3 (ng/ml)	1869,8+/-108,2	1463,7+/-113,9
% of WT		78,3+/-6,1
		**
Insulin (ng/ml)	1,16+/-0,12	0,93+/-0,1
% of WT		80,6+/-8,5
		n.s.
Cortisol (ng/ml)	6,47+/-1,06	5,52+/-0,68
% of WT		85,3+/-10,5
		n.s.

Figure S1 Nédélec et al.

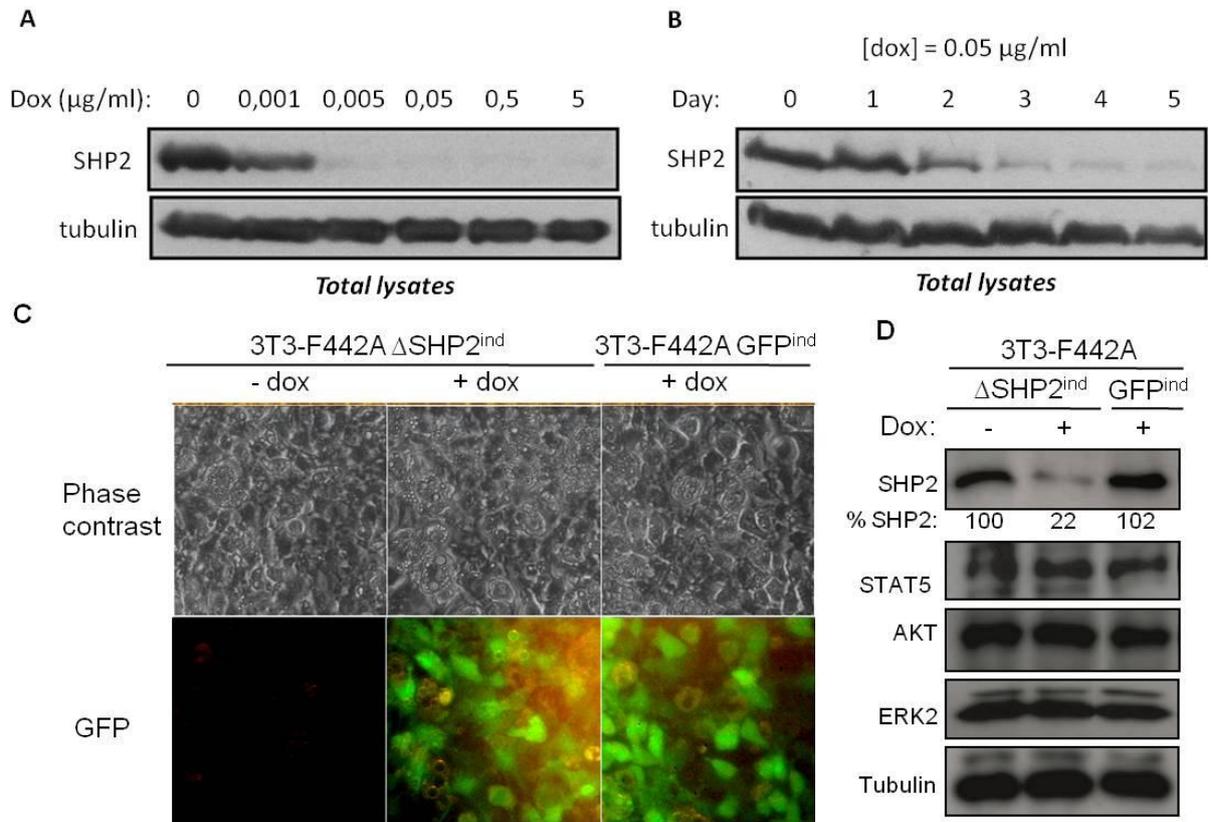


Figure S2 Nédélec *et al.*

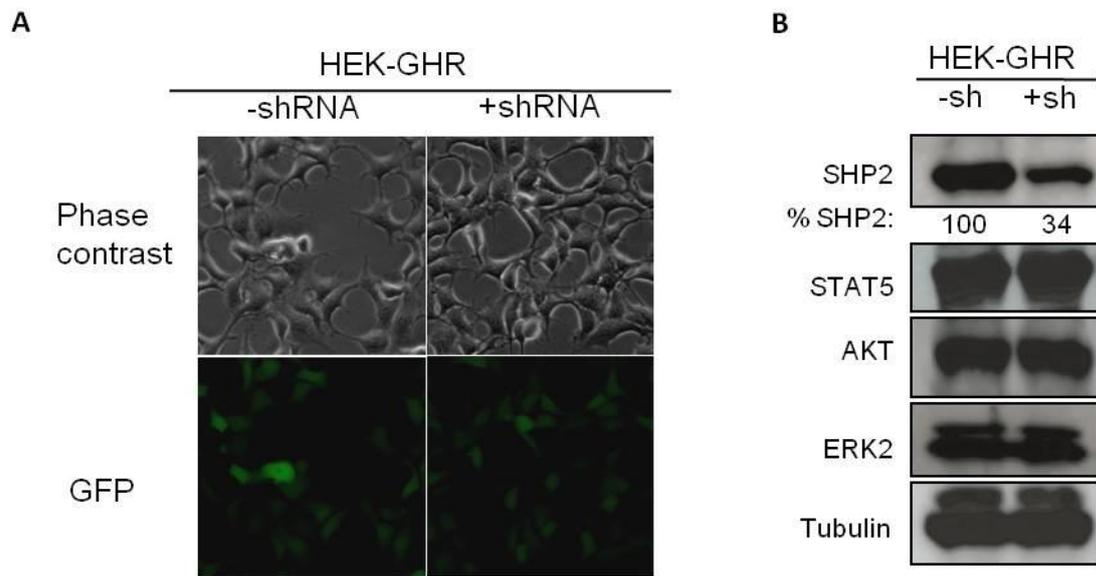
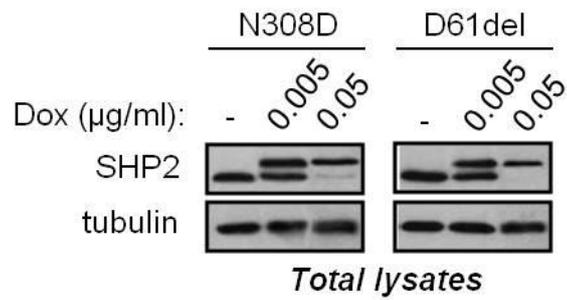


Figure S3 Nédélec *et al.*



III. Conclusion

Ainsi, ce travail visait à comprendre comment les mutations SN de SHP2 pouvaient être à l'origine du retard statural associé à cette pathologie. Nous avons pu montrer que SHP2 jouait un rôle négatif dans la production d'IGF-I induite par GH, ce qui se traduit, dans un modèle murin du SN, par des taux sériques anormalement bas de cette hormone pendant la période de croissance, en association avec l'acquisition d'un retard statural. De façon intéressante, ces résultats confirment, pour la première fois, les études cliniques suggérant un profil de résistance à GH (GH normal/IGF-I bas) chez les patients SN.

D'un point de vue mécanistique, nous avons pu montrer, par différentes approches, que SHP2 joue un rôle positif dans l'activation de la voie Ras/MAPK induite par GH, sans affecter les autres voies de signalisation activées par le R-GH, notamment la voie canonique JAK/STAT et le module PI3K/Akt. En effet, l'inhibition de SHP2 par interférence à ARN ou par surexpression d'un mutant dominant négatif bloque spécifiquement l'activation de la voie Ras/MAPK induite par GH, tandis que l'expression de mutants SN de SHP2 induit une hyperactivation de cette voie, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ceci est donc à rapprocher du fait que les autres cas de SN, de même que d'autres « RASopathies » associant un retard statural, sont dues à des mutations d'acteurs directs de la voie Ras/MAPK (SOS, RAS, RAF, MEK...) qui pour la plupart pourraient également induire une hyperactivation de la voie RAS/MAPK sous stimulation par GH, bien que cela reste à démontrer. Nous avons de plus, au moyen de différentes approches, disséqué le mode d'action de SHP2 dans l'activation de la voie Ras/MAPK, en montrant que SHP2 joue un rôle positif dans l'activation de Ras en déphosphorylant la protéine adaptatrice Gab1 sur ses sites de recrutement pour un inhibiteur naturel de Ras, RASGAP.

Nous avons ensuite pu faire le lien entre ces 2 processus dépendants de SHP2 sous induction par GH, à savoir l'activation de la voie Ras/MAPK et la production d'IGF-I. En effet, nous avons pu montrer d'une part que l'inhibition des MAPK induisait une augmentation de la production d'IGF-I induite par GH, et d'autre part que l'injection d'un tel inhibiteur dans des souris SN induisait une augmentation de leur taux sérique d'IGF-I. Ceci suggère donc que SHP2 régule négativement la production d'IGF-I par un processus dépendant de la voie Ras/MAPK, qui reste à déterminer.

Enfin, de façon importante, nous avons pu montrer, pour la première fois, que cette restauration des taux d'IGF-I chez les souris SN s'accompagne d'une amélioration de leur

croissance. Ceci pose donc l'hypothèse qu'un traitement par l'IGF-I puisse représenter une approche prometteuse pour traiter le retard de croissance dans le SN, bien que des études additionnelles soient nécessaires pour s'assurer des bénéfices d'un tel traitement. En outre, la possibilité d'utiliser des inhibiteurs de la voie Ras/MAPK, certains étant déjà testés dans des essais cliniques, pourrait être évaluée. Dans ce sens, et de façon intéressante, plusieurs études récentes ont révélé, dans des modèles murins du SN, l'hyperactivation de la voie Ras/MAPK pourrait être responsable du développement des cardiopathies et des anomalies faciales et que l'inhibition pharmacologique (ou génétique) de la voie Ras/MAPK permettait une amélioration de ces traits phénotypiques, suggérant que le ciblage de cette voie de signalisation puisse avoir un effet bénéfique sur les différents aspects de la maladie.

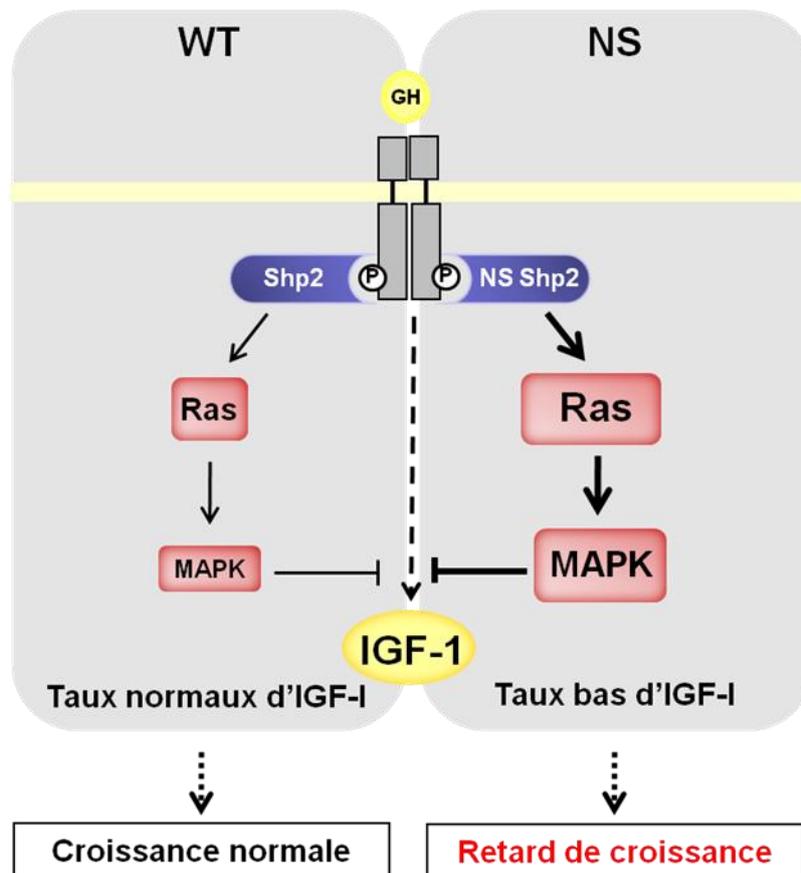


Figure 22 : Mécanisme proposé du rôle de SHP2 dans la réponse à l'hormone de croissance (GH). Conséquences physiopathologiques des mutations Noonan de SHP2 dans le retard de croissance.

-Discussion et perspectives-

Discussion et perspectives

Les travaux présentés dans la partie « Résultats expérimentaux » de ce manuscrit permettent donc de proposer un mécanisme pour expliquer l'origine du retard statural dans le SN associé à des mutations de *PTPN11*, faisant intervenir une dérégulation de l'axe GH/IGF-I en lien avec une hyperactivation de la voie Ras/MAPK. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives de recherche, tant d'un point de vue fondamental que clinique, qui peuvent s'articuler autour des questions suivantes.

I. Comment l'activation des MAPK induit-elle une inhibition de la production d'IGF-I sous stimulation par GH ?

Notre étude ayant mis en évidence que la production d'IGF-I induite par GH était modulée négativement par SHP2, et ce via l'activation de la voie Ras/MAPK, se pose la question de comprendre comment les MAPK médient cette inhibition. Dans la mesure où nous avons suivi, dans nos expériences, soit le relargage d'IGF-I par les cellules, soit le taux d'IGF-I sanguin, de nombreuses hypothèses peuvent être proposées, cette régulation pouvant être transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle.

Une régulation négative de la production d'IGF-I au niveau transcriptionnel a déjà été proposée. En effet, Sadowski *et al.* ont montré qu'un inhibiteur des MAPK induisait une augmentation de la transcription du gène codant pour l'IGF-I dans des C2C12 stimulées par GH (Sadowski *et al.*, 2001). Toutefois, l'étude de Yoshizato, utilisant des Ba/F3 traités par GH, n'a pas confirmé cette hypothèse (Yoshizato *et al.*, 2004). Dans une étude préliminaire menée dans nos modèles de cellules 3T3F442A exprimant ou pas SHP2, ainsi que dans des extraits de foie de souris SN et sauvages, nous n'avons pas mesuré de variation des taux d'ARNm d'IGF-I par PCR quantitative. Ces résultats restent toutefois incertains, les niveaux d'ARNm détectés étant très faibles et une forte variabilité ayant été observée, qui pourrait être liée à un mauvais choix des amorces utilisées. Alternativement, l'ARNm de l'IGF-I pourrait être soumis à un cycle rapide de transcription/dégradation. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la dynamique de synthèse de l'ARNm de l'IGF-I dans les différentes conditions de notre étude.

Dans l'hypothèse d'une telle répression transcriptionnelle, il faudrait envisager que les MAPK puissent réprimer, par phosphorylation directe ou indirecte, un facteur de transcription

ou un co-facteur, résultant en une inhibition de la transcription du gène *IGF-I*. Il pourrait donc être intéressant de rechercher, par immunoprécipitation de la chromatine, si certains effecteurs transcriptionnels des MAPK (Elk, Myc, KREB...) sont différenciellement associés au gène *IGF-I*. La possibilité d'une régulation épigénétique pourrait également être testée, en mesurant l'association de ce gène avec certaines histones méthylées/acétylées spécifiques d'un état d'activité transcriptionnelle. Dans ce sens, une telle régulation épigénétique contrôlée par les MAPK a déjà été proposée (Suzuki et al.).

Toutefois, les cibles privilégiées dans le contrôle de la transcription du gène *IGF-I* sous stimulation par GH restent les facteurs de transcription STAT5, constituant avec JAK2 la voie canonique de contrôle de la synthèse d'IGF-I en aval du GH-R. Bien que nous n'ayons pas observé de variation de la phosphorylation sur tyrosine de STAT5 (Tyr 694), reflet de son activation par JAK2, dans les temps courts de stimulation par GH, nous ne pouvons exclure que son activité soit modulée négativement par les MAPK dans des temps plus longs. Ceci pourrait notamment passer par un événement de phosphorylation de JAK2 par les MAPK, sur Ser 523, qui résulterait en son inhibition et consécutivement en l'inhibition des STAT5 (Ishida-Takahashi, 2006). Nous pourrions donc évaluer, à l'aide d'anticorps spécifiques de JAK2 phosphorylé sur Ser 523, dont nous nous sommes récemment dotés, si cette phosphorylation est diminuée dans les cellules déficientes en SHP2, ou si elle est augmentée dans le foie de souris SN. Si une corrélation inverse est observée entre ce niveau de phosphorylation et les taux d'IGF-I, ceci constituerait une première indication d'une possible régulation négative de la transcription d'IGF-I via l'inhibition de JAK2 par phosphorylation. L'utilisation d'un mutant non phosphorylable, qui devrait lever cette inhibition, permettrait de confirmer cette hypothèse.

Si aucune variation transcriptionnelle/post-transcriptionnelle n'est observée, l'hypothèse d'une régulation au niveau de la traduction de l'IGF-I pourra être explorée dans la mesure où il est établi que les MAPK sont des régulateurs majeurs de la traduction (Carriere et al., 2008). Encore plus bas dans la cascade, la possibilité d'un contrôle de la sécrétion d'IGF-I par les MAPK ne peut être exclue, et représenterait un mécanisme de régulation intéressant (Farhan et al.).

Ainsi, mettre en évidence comment SHP2 régule la production d'IGF-I induite par GH, via l'activation des MAPK, constituera une avancée importante, en affinant notre compréhension des mécanismes de contrôle de la synthèse d'IGF-I et donc de la croissance.

En outre, cette étude plus poussée permettra de confirmer, par d'autres méthodes, nos dosages d'IGF-I par ELISA, qui restent controversés à ce jour.

II. Le déficit en IGF-I explique-t-il à lui seul le retard de croissance associé au SN?

Notre étude a révélé que les souris SN présentent des taux plus bas d'IGF-I que les animaux contrôles, dans une fenêtre de temps allant de 3 à 6 semaines de vie, et que ce déficit s'accompagne de l'acquisition d'un retard statural et pondéral. De plus, un traitement par un inhibiteur de MAPK, qui restaure partiellement les taux d'IGF-I chez les souris SN, se traduit également par un rattrapage partiel du retard statural. Bien que ces données laissent penser que le retard de croissance chez les SN soit lié à un déficit en IGF-I, elles n'excluent pas la participation d'autres mécanismes.

En premier lieu, il ressort de notre étude que les taux bas d'IGF-I chez les souriceaux SN coïncident avec le développement du retard statural, mais ne semblent pas le précéder. Des études additionnelles sont peut-être nécessaires pour évaluer plus précisément, au jour et non à la semaine près, les variations d'IGF-I et les paramètres de croissance, et ce en appariant ces données pour chaque animal étudié. Ceci permettra de déterminer si, pour un animal donné, la chute du taux d'IGF-I précède ou pas l'initiation du retard de croissance. Si nous ne pouvons mettre en évidence de relation de cause à effet, il faudra alors rechercher si d'autres paramètres hormonaux sont altérés avant l'IGF-I (IGFBPs, ALS...).

En lien avec l'hypothèse d'une dérégulation d'autres facteurs, il est à noter que, alors que nous observons dans notre modèle une réduction d'environ 40% des taux d'IGF-I, plusieurs études sur des modèles de souris déficientes en IGF-I ont révélé qu'une réduction de 75% des taux d'IGF-I ne se traduisait par aucun retard statural (Sjogren et al., 1999). Par contre, l'inactivation additionnelle d'ALS résulte en l'acquisition d'un retard de croissance (Yakar et al., 2002), suggérant que d'autres mécanismes de contrôle de la croissance puissent être affectés dans notre modèle. Dans ce sens, nous avons observé que les taux d'IGF-BP3 étaient significativement diminués chez des souris SN de 5 semaines par rapport aux souris contrôle, ce qui pourrait résulter en une biodisponibilité moindre de l'IGF-I. Il serait donc intéressant d'approfondir cette analyse chez les animaux SN en mesurant leurs taux d'IGF-BP3, mais aussi d'ALS, et ce sur une cinétique de temps plus importante, notamment sur l'intervalle de temps où l'IGF-I n'est pas encore affecté.

Si aucune de ces perturbations endocriniennes ne permet de rendre compte de l'initiation d'un retard de croissance, d'autres éléments pourront être explorés. Il semble toutefois que nous puissions écarter des événements anténataux, de type retard de croissance intra-utérin, les tailles et poids de naissance des souris SN n'étant pas significativement différents de souris contrôles, bien que des anomalies du développement puissent indirectement influencer le gain de taille post-natal. Dans ce sens, nous ne pouvons exclure que d'autres événements non endocriniens, notamment au niveau du développement osseux, puissent être modifiés par la forme mutée de SHP2. Ainsi, une étude récente a révélé une fonction de SHP2 dans l'homéostasie du tissu osseux (Bauler et al., 2011), bien que cette étude ait été menée sur des souris adultes. Par ailleurs, l'activation des MAPK semble intervenir dans le développement osseux, notamment au niveau du chondrocyte (He et al.; Sebastian et al.). En conséquence, une hyperactivation de la voie Ras/MAPK dans le tissu osseux pourrait ralentir son développement, un effet illustré notamment dans le contexte de l'achondroplasie. Une telle hypothèse appliquée au modèle de souris SN permettrait d'expliquer, au moins en partie, que l'injection d'inhibiteur de MAPK améliore la croissance des souriceaux. Il serait donc intéressant d'évaluer si le développement osseux est altéré dans les souris SN. De plus, l'expression tissu spécifique des mutations SN de SHP2 étant maintenant possible ((Araki et al., 2009b), il serait intéressant de déterminer si l'expression d'un mutant SN spécifiquement dans le tissu osseux se traduit par un retard de croissance. Alternativement, l'expression spécifique de ce même mutant dans le foie permettrait de déterminer si la dérégulation hépatique de la réponse à GH suffit à générer le retard de croissance.

III. L'hyperactivation de MAPK sous GH est-elle à l'origine d'autres retards staturaux ?

Nos travaux ont mis en évidence un rôle des MAPK dans la production d'IGF-I et une corrélation inverse entre les niveaux d'activation de MAPK et de synthèse d'IGF-I sous GH, en lien avec un retard statural. Ces données amènent à poser l'hypothèse que ces mêmes mécanismes puissent être altérés dans d'autres RASopathies associant un retard statural, notamment les SC, CFC ou NF1. Le lien entre hyperactivation de MAPK et retard statural a récemment été suggéré par différentes publications, montrant que le retard de croissance dans différents modèles de SN (Ptpn11^{Q79R/+}, Raf1^{L613V/+}, Sos^{E846K/E846K}) pouvait être corrigé par l'inhibition génétique ou pharmacologique de la voie MAPK (Wu et al., 2011). Cependant,

les mécanismes sous-jacents n'ont pas été définis, et restent à explorer dans d'autres RASopathies.

Il serait donc intéressant d'évaluer, dans les modèles murins de RASopathies existants (SC, CFC, NF-1) (Tartaglia et al., 2011), si ces animaux présentent des taux bas d'IGF-I. Une telle étude pourrait être complétée *in vitro*, en exprimant les mutations responsables de ces syndromes et en évaluant s'ils perturbent la réponse à GH. Il est à noter toutefois que l'analyse du relargage d'IGF-I dans des 3T3F442A nécessitera de pouvoir exprimer efficacement les mutants, et ce alors que les cellules sont engagées dans un programme de différenciation, ce que nous ne sommes jusque-là pas parvenus à réaliser, malgré l'utilisation de techniques variées (transfection, infection adénovirale, infection lentivirale).

Par ailleurs, cette étude pourrait représenter un intérêt supplémentaire dans le contexte du SL, notamment pour les cas causés par des mutations inactivatrices de SHP2. En effet, les études cliniques suggèrent que le retard statural dans le SL soit plus modéré que dans le SN ou d'autres RASopathies. Du point de vue d'une possible régulation de la production d'IGF-I, 2 modèles pourraient être évalués.

-Il a été proposé, d'une part, que les mutations SL de SHP2 puissent avoir un effet dominant négatif sur l'activation de la voie Ras/MAPK (Kontaridis et al., 2006), ce qui pourrait se traduire, en aval du GH-R, par un effet positif sur la production d'IGF-I. Le retard de croissance observé chez les SL s'expliquerait alors par un autre mécanisme qu'une altération de la production d'IGF-I. Toutefois, un tel effet inhibiteur des mutants SL de SHP2 sur la voie Ras/MAPK n'a pas été retrouvé par la plupart des autres auteurs (Tartaglia et al., 2011), ni au sein de notre laboratoire. En effet, des expériences préliminaires montrent que l'expression de mutants SL de SHP2 induit également une hyperactivation de la voie Ras/MAPK sous stimulation par divers agonistes, dont la GH, sans que les mécanismes sous-jacents soient compris. Il serait donc intéressant de déterminer l'influence des mutations SL de SHP2 sur l'activation des MAPK, notamment sous GH. De plus, l'équipe s'étant récemment dotée d'un modèle murin original du SL (Ppn11^{Y279C/+}), il sera possible de doser l'IGF-I dans ces animaux et d'établir des corrélations avec leur profil de croissance.

-S'il s'avère que les mutations SL induisent bien une hyperactivation de la voie Ras/MAPK, comment expliquer alors un retard de croissance plus modéré dans ce syndrome par rapport aux autres RASopathies ? Plusieurs études, *in vitro* et *in vivo*, ont révélé que les mutations SL induisaient une hyperactivation de la voie PI3K/Akt (Edouard et al., 2010;

Hanna et al., 2006a; Marin et al., 2011). Or, de façon intéressante, il a été montré qu'un traitement par le LY294002, un inhibiteur spécifique de PI3K, bloque l'expression d'IGF-I induite par GH dans des hépatocytes de rat (Shoba et al., 2001), suggérant que PI3K puisse réguler positivement l'expression d'IGF-I induite par GH. L'hyperactivation de PI3K pourrait alors contrecarrer les effets inhibiteurs de l'hyperactivation des MAPK sur la production d'IGF-I. Là encore, l'étude de la réponse à GH dans des modèles cellulaires ou murins du SL permettra certainement de répondre à cette question.

IV. Quel traitement pour le retard de croissance associé au SN et aux autres RASopathies ?

La mise en évidence d'un déficit en IGF-I dans le SN, qui semble pouvoir être restauré par un traitement par un inhibiteur de MAPK, soulève également diverses questions quant aux possibilités de traitement du retard de croissance.

- D'une part, le traitement actuel du retard de croissance dans le SN par GHrh permettant de restaurer les taux d'IGF-I chez les patients SN, et améliorer ainsi leur croissance, on peut se demander, à la lumière de nos résultats, comment cette amélioration des taux d'IGF-I opère. En effet, alors que l'injection de GH dans des souris SN induit bien une hyperactivation de la voie Ras/MAPK, qui devrait réprimer la synthèse d'IGF-I, il est nécessaire d'envisager que des injections répétées dans la souris SN puissent résulter en une augmentation des taux d'IGF-I, comme c'est le cas chez les patients. Il serait donc intéressant d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents, en mesurant notamment les niveaux d'expression/d'activation des différents partenaires après un traitement chronique par GH.

- Par ailleurs, nos résultats permettent d'avancer l'hypothèse d'un possible traitement par IGF-I, récemment mis sur le marché, pour traiter le retard de croissance dans le SN, et peut-être dans d'autres RASopathies. Aussi, il serait intéressant d'évaluer si des injections d'IGF-I dans des souriceaux SN améliorent leur phénotype de croissance, et d'évaluer les possibles effets secondaires, notamment en lien avec le risque tumoral. Cela confirmerait en outre que l'augmentation des taux d'IGF-I chez les souriceaux SN traités par un inhibiteur de la voie Ras/MAPK peut-être responsable, au moins en partie, de l'amélioration de leur phénotype croissance.

- Enfin, notre étude permet de proposer qu'un traitement par un inhibiteur de MEK, le U-0126, puisse également avoir un effet bénéfique sur la croissance de sujets SN,

possiblement via une amélioration de leurs taux d'IGF-I. Toutefois, les paramètres de ce traitement restent à améliorer, la croissance n'étant que partiellement restaurée dans nos conditions, probablement parce que nous n'avons restauré que de 70% des taux d'IGF-I. Il apparaîtrait donc essentiel, dans le cadre d'une étude préclinique, de déterminer la durée et la dose optimale de notre traitement, mais aussi de tester d'autres inhibiteurs, plus efficaces, de MEK, comme le PD0325901. En effet, une étude récente a montré, dans le modèle $Raf^{L613V/+}$ du SN, qu'un traitement par cette molécule corrigeait très efficacement le retard de croissance de ces souris (Wu et al., 2011). Bien qu'un effet secondaire notable d'un tel traitement, à savoir une prise de poids significative, doive être surveillé, différentes études ont révélé que l'inhibition des MAPK permettait de corriger les défauts cardiaques, les anomalies faciales et les éventuelles pathologies tumorales, ce qui en fait un agent thérapeutique prometteur pour traiter les différents aspects de la maladie (Nakamura et al., 2009a; Wu et al., 2011).

-Enfin, dans le cas des SN dus à des mutations de SHP2, la possibilité d'utiliser des inhibiteurs de SHP2, récemment décrits, pourrait être évaluée (Hellmuth et al., 2008). Il serait dans ce cas intéressant de déterminer des doses d'inhibiteur visant à restaurer un niveau d'activité de SHP2 comparable à celui de sujets sains, ce qui permettrait théoriquement de normaliser les différentes anomalies associées à l'hyperactivation de SHP2 associée au SN.

Ainsi, cette étude, et les perspectives qui en découlent, permettront de mieux comprendre les bases moléculaires du retard statural dans le SN et dans les syndromes apparentés, ce qui pourrait avoir à terme, des retombées intéressantes pour développer des stratégies thérapeutiques mieux ciblées en fonction du mécanisme mis en jeu et mieux adaptées en fonction de la mutation portée par le patient.

-Références bibliographiques-

Références bibliographiques

- Adachi, M.**, Fischer, E.H., Ihle, J., Imai, K., Jirik, F., Neel, B., Pawson, T., Shen, S., Thomas, M., Ullrich, A., *et al.* (1996). Mammalian SH2-containing protein tyrosine phosphatases. *Cell* **85**, 15.
- Adachi, M.**, Sekiya, M., Miyachi, T., Matsuno, K., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1992). Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase SH-PTP3 with sequence similarity to the src-homology region 2. *FEBS Lett* **314**, 335-339.
- Agazie, Y.M.**, and Hayman, M.J. (2003). Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 7875-7886.
- Ahmad, S.**, Banville, D., Zhao, Z., Fischer, E.H., and Shen, S.H. (1993). A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2197-2201.
- Ahmadi, N.**, and Harley, E. (2010). Costello syndrome and the importance of cancer screening. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **136**, 1028-1029.
- Ahmed, M.L.**, Foot, A.B., Edge, J.A., Lamkin, V.A., Savage, M.O., and Dunger, D.B. (1991). Noonan's syndrome: abnormalities of the growth hormone/IGF-I axis and the response to treatment with human biosynthetic growth hormone. *Acta Paediatr Scand* **80**, 446-450.
- Alberola-Ila, J.**, Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G., and Perlmutter, R.M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* **373**, 620-623.
- Ali, S.**, Nouhi, Z., and Chughtai, N. (2003). SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem* **278**, 52021-52031.
- Allanson, J.E.** (1987). Noonan syndrome. *J Med Genet* **24**, 9-13.
- Allanson, J.E., Anneren, G., Aoki, Y., Armour, C.M., Bondeson, M.L., Cave, H., Gripp, K.W., Kerr, B., **Nystrom, A.M.**, Sol-Church, K., *et al.* (2011). Cardio-facio-cutaneous syndrome: does genotype predict phenotype? *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **157**, 129-135.
- Allanson, J.E.**, Bohring, A., Dorr, H.G., Dufke, A., Gillessen-Kaesbach, G., Horn, D., Konig, R., Kratz, C.P., Kutsche, K., Pauli, S., *et al.* (2010). The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype. *Am J Med Genet A* **152A**, 1960-1966.
- Altamirano, E.**, and Drut, R. (2010). Arrhythmogenic cardiomyopathy in a patient with Noonan syndrome. *Fetal Pediatr Pathol* **29**, 158-164.
- Araki, T.**, Chan, G., Newbigging, S., Morikawa, L., Bronson, R.T., and Neel, B.G. (2009a). Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4736-4741.
- Araki, T.**, Mohi, M.G., Ismat, F.A., Bronson, R.T., Williams, I.R., Kutok, J.L., Yang, W., Pao, L.I., Gilliland, D.G., Epstein, J.A., *et al.* (2004a). Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat Med* **10**, 849-857.
- Araki, T.**, Nawa, H., and Neel, B.G. (2003). Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem* **278**, 41677-41684.
- Armour, C.M.**, and Allanson, J.E. (2008). Further delineation of cardio-facio-cutaneous syndrome: clinical features of 38 individuals with proven mutations. *J Med Genet* **45**, 249-254.
- Axelrad, M.E.**, Schwartz, D.D., Katzenstein, J.M., Hopkins, E., and Gripp, K.W. (2011). Neurocognitive, adaptive, and behavioral functioning of individuals with Costello syndrome: a review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **157**, 115-122.
- Bader-Meunier, B.**, Tchernia, G., Mielot, F., Fontaine, J.L., Thomas, C., Lyonnet, S., Lavergne, J.M., and Dommergues, J.P. (1997). Occurrence of myeloproliferative disorder in patients with Noonan syndrome. *J Pediatr* **130**, 885-889.
- Baker, N.E.**, and Rubin, G.M. (1992). Ellipse mutations in the Drosophila homologue of the EGF receptor affect pattern formation, cell division, and cell death in eye imaginal discs. *Dev Biol* **150**, 381-396.

- Baldassarre, G.**, Mussa, A., Dotta, A., Banaudi, E., Forzano, S., Marinosci, A., Rossi, C., Tartaglia, M., Silengo, M., and Ferrero, G.B. (2011). Prenatal features of Noonan syndrome: prevalence and prognostic value. *Prenat Diagn* 31, 949-954.
- Banno, R.**, Zimmer, D., De Jonghe, B.C., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., and Bence, K.K. (2010). PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 720-734.
- Bard-Chapeau, E.A.**, Hevener, A.L., Long, S., Zhang, E.E., Olefsky, J.M., and Feng, G.S. (2005). Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat Med* 11, 567-571.
- Bard-Chapeau, E.A.**, Li, S., Ding, J., Zhang, S.S., Zhu, H.H., Princen, F., Fang, D.D., Han, T., Bailly-Maitre, B., Poli, V., *et al.* (2011). Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Cell* 19, 629-639.
- Bard-Chapeau, E.A.**, Yuan, J., Droin, N., Long, S., Zhang, E.E., Nguyen, T.V., and Feng, G.S. (2006). Concerted functions of Gab1 and Shp2 in liver regeneration and hepatoprotection. *Mol Cell Biol* 26, 4664-4674.
- Barford, D.**, and Neel, B.G. (1998). Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* 6, 249-254.
- Bastida, P.**, Garcia-Minaur, S., Ezquieta, B., Dapena, J.L., and Sanchez de Toledo, J. (2011). Myeloproliferative disorder in Noonan syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 33, e43-45.
- Bates, S.H.**, Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., *et al.* (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859.
- Bauler, T.J.**, Kamiya, N., Lapinski, P.E., Langewisch, E., Mishina, Y., Wilkinson, J.E., Feng, G.S., and King, P.D. Development of severe skeletal defects in induced SHP-2-deficient adult mice: a model of skeletal malformation in humans with SHP-2 mutations. *Disease models & mechanisms* 4, 228-239.
- Bennett, A.M.**, Tang, T.L., Sugimoto, S., Walsh, C.T., and Neel, B.G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7335-7339.
- Berchtold, S.**, Volarevic, S., Moriggl, R., Mercep, M., and Groner, B. (1998). Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (janus kinase 2) and induction of Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription. *Mol Endocrinol* 12, 556-567.
- Bettaieb, A.**, Matsuo, K., Matsuo, I., Nagata, N., Chahed, S., Liu, S., and Haj, F.G. (2011). Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism* 60, 1193-1201.
- Binder, G.** (2009). Response to growth hormone in short children with Noonan syndrome: correlation to genotype. *Horm Res* 72 Suppl 2, 52-56.
- Binder, G.**, Neuer, K., Ranke, M.B., and Wittekindt, N.E. (2005). PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 5377-5381.
- Bivona, T.G.**, Perez De Castro, I., Ahearn, I.M., Grana, T.M., Chiu, V.K., Lockyer, P.J., Cullen, P.J., Pellicer, A., Cox, A.D., and Philips, M.R. (2003). Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature* 424, 694-698.
- Brady, A.F.**, Jamieson, C.R., van der Burgt, I., Crosby, A., van Reen, M., Kremer, H., Mariman, E., Patton, M.A., and Jeffery, S. (1997). Further delineation of the critical region for noonan syndrome on the long arm of chromosome 12. *Eur J Hum Genet* 5, 336-337.
- Brems, H.**, Chmara, M., Sahbatou, M., Denayer, E., Taniguchi, K., Kato, R., Somers, R., Messiaen, L., De Schepper, S., Fryns, J.P., *et al.* (2007). Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet* 39, 1120-1126.
- Brinkmann, B.G.**, Agarwal, A., Sereda, M.W., Garratt, A.N., Muller, T., Wende, H., Stassart, R.M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., *et al.* (2008). Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581-595.

- Bromann, P.A.**, Korkaya, H., and Courtneidge, S.A. (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23, 7957-7968.
- Buday, L.**, and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-620.
- Buday, L.**, and Downward, J. (2008). Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* 1786, 178-187.
- Bundschu, K.**, Walter, U., and Schuh, K. (2007). Getting a first clue about SPRED functions. *Bioessays* 29, 897-907.
- Butler, M.G.**, Kumar, R., Davis, M.F., Gale, D.D., Dahir, G.A., and Meaney, F.J. (2000). Metacarpophalangeal pattern profile analysis in Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 92, 128-131.
- Carey, J.C.** (1998). Neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 75, 263-264.
- Carriere, A.**, Ray, H., Blenis, J., and Roux, P.P. (2008). The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* 13, 4258-4275.
- Carta, C.**, Pantaleoni, F., Bocchinfuso, G., Stella, L., Vasta, I., Sarkozy, A., Digilio, C., Palleschi, A., Pizzuti, A., Grammatico, P., *et al.* (2006). Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 79, 129-135.
- Carvajal-Vergara, X.**, Sevilla, A., D'Souza, S.L., Ang, Y.S., Schaniel, C., Lee, D.F., Yang, L., Kaplan, A.D., Adler, E.D., Rozov, R., *et al.* (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465, 808-812.
- Chan, E.Y.**, Stang, S.L., Bottorff, D.A., and Stone, J.C. (2002). Mutations in conserved regions 1, 2, and 3 of Raf-1 that activate transforming activity. *Mol Carcinog* 33, 189-197.
- Chan, G.**, Cheung, L.S., Yang, W., Milyavsky, M., Sanders, A.D., Gu, S., Hong, W.X., Liu, A.X., Wang, X., Barbara, M., *et al.* (2011). Essential role for Ptpn11 in survival of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 117, 4253-4261.
- Chan, G.**, Kalaitzidis, D., and Neel, B.G. (2008). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27, 179-192.
- Chan, R.J.**, Johnson, S.A., Li, Y., Yoder, M.C., and Feng, G.S. (2003). A definitive role of Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating embryonic stem cell differentiation and hematopoiesis. *Blood* 102, 2074-2080.
- Chappell, W.H.**, Steelman, L.S., Long, J.M., Kempf, R.C., Abrams, S.L., Franklin, R.A., Basecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., *et al.* (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2, 135-164.
- Chen, B.**, Bronson, R.T., Klamann, L.D., Hampton, T.G., Wang, J.F., Green, P.J., Magnuson, T., Douglas, P.S., Morgan, J.P., and Neel, B.G. (2000). Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet* 24, 296-299.
- Chen, J.**, Yu, W.M., Bunting, K.D., and Qu, C.K. (2004). A negative role of SHP-2 tyrosine phosphatase in growth factor-dependent hematopoietic cell survival. *Oncogene* 23, 3659-3669.
- Chen, P.C.**, Wakimoto, H., Conner, D., Araki, T., Yuan, T., Roberts, A., Seidman, C.E., Bronson, R., Neel, B.G., Seidman, J.G., *et al.* Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated Sos1 mutation. *The Journal of clinical investigation* 120, 4353-4365.
- Chen, Y.**, Wen, R., Yang, S., Schuman, J., Zhang, E.E., Yi, T., Feng, G.S., and Wang, D. (2003). Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J Biol Chem* 278, 16520-16527.
- Chernausek, S.D.**, Backeljauw, P.F., Frane, J., Kuntze, J., and Underwood, L.E. (2007). Long-term treatment with recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I in children with severe IGF-I deficiency due to growth hormone insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 902-910.
- Cirstea, I.C.**, Kutsche, K., Dvorsky, R., Gremer, L., Carta, C., Horn, D., Roberts, A.E., Lepri, F., Merbitz-Zahradnik, T., Konig, R., *et al.* (2010). A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet* 42, 27-29.

- Cleghon, V.**, Feldmann, P., Ghiglione, C., Copeland, T.D., Perrimon, N., Hughes, D.A., and Morrison, D.K. (1998). Opposing actions of CSW and RasGAP modulate the strength of Torso RTK signaling in the *Drosophila* terminal pathway. *Mol Cell* 2, 719-727.
- Coppin, B.D.**, and Temple, I.K. (1997). Multiple lentiginos syndrome (LEOPARD syndrome or progressive cardiomyopathic lentiginosis). *J Med Genet* 34, 582-586.
- Cordeddu, V.**, Di Schiavi, E., Pennacchio, L.A., Ma'ayan, A., Sarkozy, A., Fodale, V., Cecchetti, S., Cardinale, A., Martin, J., Schackwitz, W., *et al.* (2009). Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 41, 1022-1026.
- Costello, J.M.** (1977). A new syndrome: mental subnormality and nasal papillomata. *Aust Paediatr J* 13, 114-118.
- da Rocha Pitta Marin, L.**, Bezerra Gaspar Carvalho da Silva, F.T., Ferreira de Sa, L.C., Salem Brasil, A., Pereira, A., Mosca Furquim, I., Kim, C.A., and Romeo Bertola, D. (2011). Ocular manifestations of Noonan syndrome. *Ophthalmic Genet*.
- Dance, M.**, Montagner, A., Salles, J.P., Yart, A., and Raynal, P. (2008). The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal* 20, 453-459.
- Darian, E., Guvench, O., Yu, B., Qu, C.K., and MacKerell, A.D., Jr. (2011). Structural mechanism associated with domain opening in gain-of-function mutations in SHP2 phosphatase. *Proteins* 79, 1573-1588.
- De Souza, D.**, Fabri, L.J., Nash, A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., and Baca, M. (2002). SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. *Biochemistry* 41, 9229-9236.
- DeBaun, M.R.** (2002). Screening for cancer in children with Costello syndrome. *Am J Med Genet* 108, 88-90.
- Delrue, M.A.**, Arveiler, B., and Lacombe, D. (2002). [Costello syndrome: clinical aspects and tumor risk]. *Arch Pediatr* 9, 1059-1063.
- Dentici, M.L.**, Sarkozy, A., Pantaleoni, F., Carta, C., Lepri, F., Ferese, R., Cordeddu, V., Martinelli, S., Briuglia, S., Digilio, M.C., *et al.* (2009). Spectrum of MEK1 and MEK2 gene mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome and genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 17, 733-740.
- Derbent, M.**, Oncel, Y., Tokel, K., Varan, B., Haberal, A., Yazici, A.C., Legius, E., and Ozbek, N. (2010). Clinical and hematologic findings in Noonan syndrome patients with PTPN11 gene mutations. *Am J Med Genet A* 152A, 2768-2774.
- Digilio, M.C.**, Sarkozy, A., de Zorzi, A., Pacileo, G., Limongelli, G., Mingarelli, R., Calabro, R., Marino, B., and Dallapiccola, B. (2006). LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life. *Am J Med Genet A* 140, 740-746.
- Duncan, W.J.**, Fowler, R.S., Farkas, L.G., Ross, R.B., Wright, A.W., Bloom, K.R., Huot, D.J., Sondheimer, H.M., and Rowe, R.D. (1981). A comprehensive scoring system for evaluating Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 10, 37-50.
- Edouard, T.**, Combiér, J.P., Nedelec, A., Bel-Vialar, S., Metrich, M., Conte-Auriol, F., Lyonnet, S., Parfait, B., Tauber, M., Salles, J.P., *et al.* (2010). Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3 β signaling. *Mol Cell Biol* 30, 2498-2507.
- Edouard, T.**, Montagner, A., Dance, M., Conte, F., Yart, A., Parfait, B., Tauber, M., Salles, J.P., and Raynal, P. (2007a). How do Shp2 mutations that oppositely influence its biochemical activity result in syndromes with overlapping symptoms? *Cell Mol Life Sci* 64, 1585-1590.
- Ekvall, S.**, Hagenas, L., Allanson, J., Anneren, G., and Bondeson, M.L. (2011). Co-occurring SHOC2 and PTPN11 mutations in a patient with severe/complex Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet A* 155A, 1217-1224.
- Farhan, H.**, Wendeler, M.W., Mitrovic, S., Fava, E., Silberberg, Y., Sharan, R., Zerial, M., and Hauri, H.P. MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *J Cell Biol* 189, 997-1011.

- Feng, G.S.**, Hui, C.C., and Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259, 1607-1611.
- Feng, G.S.**, and Pawson, T. (1994). Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. *Trends Genet* 10, 54-58.
- Fornaro, M.**, Burch, P.M., Yang, W., Zhang, L., Hamilton, C.E., Kim, J.H., Neel, B.G., and Bennett, A.M. (2006). SHP-2 activates signaling of the nuclear factor of activated T cells to promote skeletal muscle growth. *J Cell Biol* 175, 87-97.
- Fragale, A.**, Tartaglia, M., Wu, J., and Gelb, B.D. (2004a). Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation. *Hum Mutat* 23, 267-277.
- Fryns, J.P.**, Vogels, A., Haegeman, J., Eggermont, E., and van den Berghe, H. (1994). Costello syndrome: a postnatal growth retardation syndrome with distinct phenotype. *Genet Couns* 5, 337-343.
- Fujioka, Y.**, Matozaki, T., Noguchi, T., Iwamatsu, A., Yamao, T., Takahashi, N., Tsuda, M., Takada, T., and Kasuga, M. (1996). A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol* 16, 6887-6899.
- Futami, M.**, Zhu, Q.S., Whichard, Z.L., Xia, L., Ke, Y., Neel, B.G., Feng, G.S., and Corey, S.J. (2011). G-CSF receptor activation of the Src kinase Lyn is mediated by Gab2 recruitment of the Shp2 phosphatase. *Blood* 118, 1077-1086.
- Gao, Q.**, Wolfgang, M.J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T.L., Shulman, G.I., and Fu, X.Y. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4661-4666.
- Garnett, M.J.**, Rana, S., Paterson, H., Barford, D., and Marais, R. (2005). Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 20, 963-969.
- Gauthier, A.S., Furstoss, O., Araki, T., Chan, R., Neel, B.G., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2007). Control of CNS cell-fate decisions by SHP-2 and its dysregulation in Noonan syndrome. *Neuron* 54, 245-262.
- Giroux, S.**, Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., *et al.* (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 9, 369-372.
- Gorlin, R.J., Anderson, R.C., and Blaw, M. (1969). Multiple lentigenes syndrome. *Am J Dis Child* 117, 652-662.
- Grebe, T.A.**, and Clericuzio, C. (2000). Neurologic and gastrointestinal dysfunction in cardio-facio-cutaneous syndrome: identification of a severe phenotype. *Am J Med Genet* 95, 135-143.
- Gripp, K.W. (2005). Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137C, 72-77.
- Gripp, K.W.**, and Lin, A.E. (2011). Costello syndrome: A Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genet Med*.
- Gripp, K.W.**, Scott, C.I., Jr., Nicholson, L., McDonald-McGinn, D.M., Ozeran, J.D., Jones, M.C., Lin, A.E., and Zackai, E.H. (2002). Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol. *Am J Med Genet* 108, 80-87.
- Grossmann, K.S.**, Rosario, M., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2010). The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer. *Adv Cancer Res* 106, 53-89.
- Grossmann, K.S.**, Wende, H., Paul, F.E., Cheret, C., Garratt, A.N., Zurborg, S., Feinberg, K., Besser, D., Schulz, H., Peles, E., *et al.* (2009). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) directs Neuregulin-1/ErbB signaling throughout Schwann cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16704-16709.
- Gutch, M.J.**, Flint, A.J., Keller, J., Tonks, N.K., and Hengartner, M.O. (1998). The *Caenorhabditis elegans* SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oogenesis and vulval development. *Genes Dev* 12, 571-585.

- Hadari, Y.R.**, Kouhara, H., Lax, I., and Schlessinger, J. (1998). Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 3966-3973.
- Hagihara, K.**, Zhang, E.E., Ke, Y.H., Liu, G., Liu, J.J., Rao, Y., and Feng, G.S. (2009). Shp2 acts downstream of SDF-1alpha/CXCR4 in guiding granule cell migration during cerebellar development. *Dev Biol* 334, 276-284.
- Hamazaki, T.**, Kehoe, S.M., Nakano, T., and Terada, N. (2006). The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 26, 7539-7549.
- Hanafusa, H.**, Torii, S., Yasunaga, T., Matsumoto, K., and Nishida, E. (2004). Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. *J Biol Chem* 279, 22992-22995.
- Hanafusa, H.**, Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-858.
- Hancock, J.F.** (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 373-384.
- Hanna, N.**, Montagner, A., Lee, W.H., Miteva, M., Vidal, M., Vidaud, M., Parfait, B., and Raynal, P. (2006a). Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: consequences for PI3K binding on Gab1. *FEBS Lett* 580, 2477-2482.
- He, Y.**, Staser, K., Rhodes, S.D., Liu, Y., Wu, X., Park, S.J., Yuan, J., Yang, X., Li, X., Jiang, L., *et al.* Erk1 positively regulates osteoclast differentiation and bone resorptive activity. *PLoS One* 6, e24780.
- Hellmuth, K., Grosskopf, S., Lum, C.T., Wurtele, M., Roder, N., von Kries, J.P., Rosario, M., Rademann, J., and Birchmeier, W. (2008). Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase Shp2 identified by high-throughput docking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7275-7280.
- Hennekam, R.C.** (2003). Costello syndrome: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 117C, 42-48.
- Hickey, E.J.**, Mehta, R., Elmi, M., Asoh, K., McCrindle, B.W., Williams, W.G., Manlhiot, C., and Benson, L. (2011). Survival implications: hypertrophic cardiomyopathy in Noonan syndrome. *Congenit Heart Dis* 6, 41-47.
- Hof, P.**, Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J., and Shoelson, S.E. (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92, 441-450.
- Houweling, A.C.**, de Mooij, Y.M., van der Burgt, I., Yntema, H.G., Lachmeijer, A.M., and Go, A.T. (2010). Prenatal detection of Noonan syndrome by mutation analysis of the PTPN11 and the KRAS genes. *Prenat Diagn* 30, 284-286.
- Hulselmans, M.**, and Benit, E. (2010). Percutaneous pulmonary valvuloplasty and atrial septal defect closure in a 69-year-old patient with Noonan's syndrome. *Acta Cardiol* 65, 89-92.
- Hunter, T.**, and Sefton, B.M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1311-1315.
- Huyer, G.**, and Ramachandran, C. (1998). The specificity of the N-terminal SH2 domain of SHP-2 is modified by a single point mutation. *Biochemistry* 37, 2741-2747.
- Hwang, D.L.**, Lee, P.D., and Cohen, P. (2008). Quantitative ontogeny of murine insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein-3 and the IGF-related acid-labile subunit. *Growth Horm IGF Res* 18, 65-74.
- Inagaki, K.**, Yamao, T., Noguchi, T., Matozaki, T., Fukunaga, K., Takada, T., Hosooka, T., Akira, S., and Kasuga, M. (2000). SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility. *EMBO J* 19, 6721-6731.
- Ishida-Takahashi** (2006). Phosphorylation of Jak2 on Ser(523) inhibits Jak2-dependent leptin receptor signaling. *mol cell biol* 26, 10.
- Jamieson, C.R.**, van der Burgt, I., Brady, A.F., van Reen, M., Elsayi, M.M., Hol, F., Jeffery, S., Patton, M.A., and Mariman, E. (1994). Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat Genet* 8, 357-360.
- Jarvis, L.A.**, Toering, S.J., Simon, M.A., Krasnow, M.A., and Smith-Bolton, R.K. (2006). Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases. *Development* 133, 1133-1142.

- Jett, K., and Friedman, J.M. (2010). Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med* 12, 1-11.
- Johnson, G.L.**, and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Johnson Hamlet, M.R.**, and Perkins, L.A. (2001). Analysis of corkscrew signaling in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during myogenesis. *Genetics* 159, 1073-1087.
- Jongmans, M.**, Siermans, E.A., Rikken, A., Nillesen, W.M., Tamminga, R., Patton, M., Maier, E.M., Tartaglia, M., Noordam, K., and van der Burgt, I. (2005). Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature. *Am J Med Genet A* 134A, 165-170.
- Jopling, C.**, van Geemen, D., and den Hertog, J. (2007). Shp2 knockdown and Noonan/LEOPARD mutant Shp2-induced gastrulation defects. *PLoS Genet* 3, e225.
- Jouhilahti, E.M., Peltonen, S., Heape, A.M., and Peltonen, J. (2011). The pathoetiology of neurofibromatosis 1. *Am J Pathol* 178, 1932-1939.
- Jung, J.E.**, Moon, S.H., Kim, D.K., Choi, C., Song, J., and Park, K.S. (2011). Sprouty1 Regulates Neural and Endothelial Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*.
- Karnoub, A.E.**, and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 517-531.
- Kavamura, M.I.**, Peres, C.A., Alchorne, M.M., and Brunoni, D. (2002). CFC index for the diagnosis of cardiofaciocutaneous syndrome. *Am J Med Genet* 112, 12-16.
- Ke, Y.**, Lesperance, J., Zhang, E.E., Bard-Chapeau, E.A., Oshima, R.G., Muller, W.J., and Feng, G.S. (2006a). Conditional deletion of Shp2 in the mammary gland leads to impaired lobulo-alveolar outgrowth and attenuated Stat5 activation. *J Biol Chem* 281, 34374-34380.
- Ke, Y.**, Zhang, E.E., Hagihara, K., Wu, D., Pang, Y., Klein, R., Curran, T., Ranscht, B., and Feng, G.S. (2007). Deletion of Shp2 in the brain leads to defective proliferation and differentiation in neural stem cells and early postnatal lethality. *Mol Cell Biol* 27, 6706-6717.
- Keilhack, H.**, David, F.S., McGregor, M., Cantley, L.C., and Neel, B.G. (2005). Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J Biol Chem* 280, 30984-30993.
- Kelnar, C.J.** (2009). Noonan syndrome: the hypothalamo-adrenal and hypothalamo-gonadal axes. *Horm Res* 72 Suppl 2, 24-30.
- Kharitonov, A.**, Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J., and Ullrich, A. (1997). A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 386, 181-186.
- Kim, J.**, Kim, M.R., Kim, H.J., Lee, K.A., and Lee, M.G. (2011). LEOPARD Syndrome with PTPN11 Gene Mutation Showing Six Cardinal Symptoms of LEOPARD. *Ann Dermatol* 23, 232-235.
- Kim, S.O.**, Jiang, J., Yi, W., Feng, G.S., and Frank, S.J. (1998). Involvement of the Src homology 2-containing tyrosine phosphatase SHP-2 in growth hormone signaling. *J Biol Chem* 273, 2344-2354.
- Kim, S.O.**, Loesch, K., Wang, X., Jiang, J., Mei, L., Cunnick, J.M., Wu, J., and Frank, S.J. (2002). A role for Grb2-associated binder-1 in growth hormone signaling. *Endocrinology* 143, 4856-4867.
- Kirk, J.M.**, Betts, P.R., Butler, G.E., Donaldson, M.D., Dunger, D.B., Johnston, D.I., Kelnar, C.J., Price, D.A., Wilton, P., and Group t, U. (2001). Short stature in Noonan syndrome: response to growth hormone therapy. *Arch Dis Child* 84, 440-443.
- Ko, J.M.**, Kim, J.M., Kim, G.H., and Yoo, H.W. (2008). PTPN11, SOS1, KRAS, and RAF1 gene analysis, and genotype-phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *J Hum Genet* 53, 999-1006.
- Kobayashi, T.**, Aoki, Y., Niihori, T., Cave, H., Verloes, A., Okamoto, N., Kawame, H., Fujiwara, I., Takada, F., Ohata, T., *et al.* (2010). Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat* 31, 284-294.
- Kontaridis, M.I.**, Swanson, K.D., David, F.S., Barford, D., and Neel, B.G. (2006). PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem* 281, 6785-6792.
- Kontaridis, M.I.**, Yang, W., Bence, K.K., Cullen, D., Wang, B., Bodyak, N., Ke, Q., Hinek, A., Kang, P.M., Liao, R., *et al.* (2008). Deletion of Ptpn11 (Shp2) in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy via

effects on the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase and RhoA signaling pathways. *Circulation* *117*, 1423-1435.

Kosaki, K., Suzuki, T., Muroya, K., Hasegawa, T., Sato, S., Matsuo, N., Kosaki, R., Nagai, T., Hasegawa, Y., and Ogata, T. (2002). PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* *87*, 3529-3533.

Kraft, M., Cirstea, I.C., Voss, A.K., Thomas, T., Goehring, I., Sheikh, B.N., Gordon, L., Scott, H., Smyth, G.K., Ahmadian, M.R., *et al.* (2011). Disruption of the histone acetyltransferase MYST4 leads to a Noonan syndrome-like phenotype and hyperactivated MAPK signaling in humans and mice. *J Clin Invest* *121*, 3479-3491.

Krajewska, M., Banares, S., Zhang, E.E., Huang, X., Scadeng, M., Jhala, U.S., Feng, G.S., and Krajewski, S. (2008). Development of diabetes in mice with neuronal deletion of Shp2 tyrosine phosphatase. *Am J Pathol* *172*, 1312-1324.

Kratz, C.P., Niemeyer, C.M., Castleberry, R.P., Cetin, M., Bergstrasser, E., Emanuel, P.D., Hasle, H., Kardos, G., Klein, C., Kojima, S., *et al.* (2005). The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease. *Blood* *106*, 2183-2185.

Kratz, C.P., Rapisuwon, S., Reed, H., Hasle, H., and Rosenberg, P.S. (2011). Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* *157*, 83-89.

Krenz, M., Gulick, J., Osinska, H.E., Colbert, M.C., Molkentin, J.D., and Robbins, J. (2008). Role of ERK1/2 signaling in congenital valve malformations in Noonan syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 18930-18935.

Laux, D., Bajolle, F., Maltret, A., and Bonnet, D. (2011). [Neonatal atrial tachycardia: Suggestive clinical sign of Costello syndrome]. *Arch Pediatr* *18*, 1087-1089.

Lee, B.H., Kim, J.M., Jin, H.Y., Kim, G.H., Choi, J.H., and Yoo, H.W. (2011). Spectrum of Mutations in Noonan Syndrome and Their Correlation with Phenotypes. *J Pediatr*.

Lee, C.H., Kominos, D., Jacques, S., Margolis, B., Schlessinger, J., Shoelson, S.E., and Kuriyan, J. (1994). Crystal structures of peptide complexes of the amino-terminal SH2 domain of the Syp tyrosine phosphatase. *Structure* *2*, 423-438.

Legius, E., Schollen, E., Matthijs, G., and Fryns, J.P. (1998). Fine mapping of Noonan/cardio-facio cutaneous syndrome in a large family. *Eur J Hum Genet* *6*, 32-37.

Lepri, F., De Luca, A., Stella, L., Rossi, C., Baldassarre, G., Pantaleoni, F., Cordeddu, V., Williams, B.J., Dentici, M.L., Caputo, V., *et al.* (2011). SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* *32*, 760-772.

Levinson, A.D., Oppermann, H., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1980). The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *J Biol Chem* *255*, 11973-11980.

Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A.G., Kim, W.J., Cooper, J.A., and Schlessinger, J. (1994). A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* *14*, 509-517.

Lieskovska, J., Ling, Y., Badley-Clarke, J., and Clemmons, D.R. (2006). The role of Src kinase in insulin-like growth factor-dependent mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* *281*, 25041-25053.

Limal, J.M., Parfait, B., Cabrol, S., Bonnet, D., Leheup, B., Lyonnet, S., Vidaud, M., and Le Bouc, Y. (2006). Noonan syndrome: relationships between genotype, growth, and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* *91*, 300-306.

Limongelli, G., Pacileo, G., Marino, B., Digilio, M.C., Sarkozy, A., Elliott, P., Versacci, P., Calabro, P., De Zorzi, A., Di Salvo, G., *et al.* (2007). Prevalence and clinical significance of cardiovascular abnormalities in patients with the LEOPARD syndrome. *Am J Cardiol* *100*, 736-741.

Limongelli, G., Sarkozy, A., Pacileo, G., Calabro, P., Digilio, M.C., Maddaloni, V., Gagliardi, G., Di Salvo, G., Iacomino, M., Marino, B., *et al.* (2008). Genotype-phenotype analysis and natural history of left ventricular hypertrophy in LEOPARD syndrome. *Am J Med Genet A* *146A*, 620-628.

- Lin, A.E.**, Alexander, M.E., Colan, S.D., Kerr, B., Rauen, K.A., Noonan, J., Baffa, J., Hopkins, E., Sol-Church, K., Limongelli, G., *et al.* (2011). Clinical, pathological, and molecular analyses of cardiovascular abnormalities in Costello syndrome: a Ras/MAPK pathway syndrome. *Am J Med Genet A* 155A, 486-507.
- Lin, A.E.**, Grossfeld, P.D., Hamilton, R.M., Smoot, L., Gripp, K.W., Proud, V., Weksberg, R., Wheeler, P., Picker, J., Irons, M., *et al.* (2002). Further delineation of cardiac abnormalities in Costello syndrome. *Am J Med Genet* 111, 115-129.
- Lu, W.**, Gong, D., Bar-Sagi, D., and Cole, P.A. (2001). Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell* 8, 759-769.
- M.C. Raux Demay, Y.L.B.** (2006). Explorations de la fonction somatotrope. *mtp pédiatrie* 9, 10.
- MacFarlane, C.E.**, Brown, D.C., Johnston, L.B., Patton, M.A., Dunger, D.B., Savage, M.O., McKenna, W.J., and Kelnar, C.J. (2001). Growth hormone therapy and growth in children with Noonan's syndrome: results of 3 years' follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1953-1956.
- Maheshwari, M.**, Belmont, J., Fernbach, S., Ho, T., Molinari, L., Yakub, I., Yu, F., Combes, A., Towbin, J., Craigen, W.J., *et al.* (2002). PTPN11 mutations in Noonan syndrome type I: detection of recurrent mutations in exons 3 and 13. *Hum Mutat* 20, 298-304.
- Margarit, S.M.**, Sondermann, H., Hall, B.E., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (2003). Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112, 685-695.
- Marin, T.M.**, Clemente, C.F., Santos, A.M., Picardi, P.K., Pascoal, V.D., Lopes-Cendes, I., Saad, M.J., and Franchini, K.G. (2008). Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res* 103, 813-824.
- Marin, T.M.**, Keith, K., Davies, B., Conner, D.A., Guha, P., Kalaitzidis, D., Wu, X., Lauriol, J., Wang, B., Bauer, M., *et al.* (2011). Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *J Clin Invest* 121, 1026-1043.
- Marino, B.**, Digilio, M.C., Toscano, A., Giannotti, A., and Dallapiccola, B. (1999). Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: An expanded cardiac spectrum with high prevalence of atrioventricular canal. *J Pediatr* 135, 703-706.
- Maroun, C.R.**, Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 20, 8513-8525.
- Martinelli, S.**, De Luca, A., Stellacci, E., Rossi, C., Checquolo, S., Lepri, F., Caputo, V., Silvano, M., Buscherini, F., Consoli, F., *et al.* (2010). Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet* 87, 250-257.
- Martinelli, S.**, Torreri, P., Tinti, M., Stella, L., Bocchinfuso, G., Flex, E., Grottesi, A., Ceccarini, M., Palleschi, A., Cesareni, G., *et al.* (2008). Diverse driving forces underlie the invariant occurrence of the T42A, E139D, I282V and T468M SHP2 amino acid substitutions causing Noonan and LEOPARD syndromes. *Hum Mol Genet* 17, 2018-2029.
- Mason, J.M.**, Morrison, D.J., Basson, M.A., and Licht, J.D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 16, 45-54.
- Massarano, A.A.**, Wood, A., Tait, R.C., Stevens, R., and Super, M. (1996). Noonan syndrome: coagulation and clinical aspects. *Acta Paediatr* 85, 1181-1185.
- Matsunaga-Udagawa, R.**, Fujita, Y., Yoshiki, S., Terai, K., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., Yugi, K., Aoki, K., and Matsuda, M. (2010). The scaffold protein Shoc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. *J Biol Chem* 285, 7818-7826.
- Matsuo, K.**, Delibegovic, M., Matsuo, I., Nagata, N., Liu, S., Bettaieb, A., Xi, Y., Araki, K., Yang, W., Kahn, B.B., *et al.* (2010). Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J Biol Chem* 285, 39750-39758.
- Mazzanti, L.**, Cacciari, E., Cicognani, A., Bergamaschi, R., Scarano, E., and Forabosco, A. (2003). Noonan-like syndrome with loose anagen hair: a new syndrome? *Am J Med Genet A* 118A, 279-286.

- Meng, T.C.**, Fukada, T., and Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* *9*, 387-399.
- Merks, J.H.**, Caron, H.N., and Hennekam, R.C. (2005). High incidence of malformation syndromes in a series of 1,073 children with cancer. *Am J Med Genet A* *134A*, 132-143.
- Montagner, A.**, Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J.P., and Raynal, P. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in EGF-induced Ras activation. *J Biol Chem* *280*, 5350-5360.
- Municchi, G.**, Pasquino, A.M., Pucarelli, I., Cianfarani, S., and Passeri, F. (1995). Growth hormone treatment in Noonan syndrome: report of four cases who reached final height. *Horm Res* *44*, 164-167.
- Musante, L.**, Kehl, H.G., Majewski, F., Meinecke, P., Schweiger, S., Gillissen-Kaesbach, G., Wieczorek, D., Hinkel, G.K., Tinschert, S., Hoeltzenbein, M., *et al.* (2003). Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* *11*, 201-206.
- Nakamura, T.**, Colbert, M., Krenz, M., Molkenstin, J.D., Hahn, H.S., Dorn, G.W., 2nd, and Robbins, J. (2007). Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *J Clin Invest* *117*, 2123-2132.
- Nakamura, T.**, Gulick, J., Colbert, M.C., and Robbins, J. (2009). Protein tyrosine phosphatase activity in the neural crest is essential for normal heart and skull development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 11270-11275.
- Nakamura, T.**, Gulick, J., Pratt, R., and Robbins, J. (2009). Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 15436-15441.
- Nanda, S.**, Rajpal, M., and Reddy, B.S. (2004). Cardio-facio-cutaneous syndrome: report of a case with a review of the literature. *Int J Dermatol* *43*, 447-450.
- Nava, C.**, Hanna, N., Michot, C., Pereira, S., Pouvreau, N., Niihori, T., Aoki, Y., Matsubara, Y., Arveiler, B., Lacombe, D., *et al.* (2007). Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype-phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* *44*, 763-771.
- Neel, B.G.** (1993). Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases. *Semin Cell Biol* *4*, 419-432.
- Neel, B.G.**, Gu, H., and Pao, L. (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* *28*, 284-293.
- Newbern, J.**, Zhong, J., Wickramasinghe, R.S., Li, X., Wu, Y., Samuels, I., Cherosky, N., Karlo, J.C., O'Loughlin, B., Wikenheiser, J., *et al.* (2008). Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 17115-17120.
- Nicholson, S.E.**, De Souza, D., Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., *et al.* (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 6493-6498.
- Niwa, H.**, Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* *460*, 118-122.
- Noonan, J.A.** (1968). Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. *Am J Dis Child* *116*, 373-380.
- Noonan, J.A.**, Raaijmakers, R., and Hall, B.D. (2003). Adult height in Noonan syndrome. *Am J Med Genet A* *123A*, 68-71.
- Noordam, C.**, Peer, P.G., Francois, I., De Schepper, J., van den Burgt, I., and Otten, B.J. (2008). Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11. *Eur J Endocrinol* *159*, 203-208.
- Noordam, C.**, van den Burgt, I., Sweep, C.G., Delemarre-van de Waal, H.A., Sengers, R.C., and Otten, B.J. (2001). Growth hormone (GH) secretion in children with Noonan syndrome: frequently abnormal without consequences for growth or response to GH treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* *54*, 53-59.

- Nutt, S.L.**, Dingwell, K.S., Holt, C.E., and Amaya, E. (2001). Xenopus Sprouty2 inhibits FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning. *Genes Dev* 15, 1152-1166.
- O'Reilly, A.M.**, Pluskey, S., Shoelson, S.E., and Neel, B.G. (2000). Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of Xenopus animal caps. *Mol Cell Biol* 20, 299-311.
- Ohtani, T.**, Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., *et al.* (2000). Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* 12, 95-105.
- Oishi, K.**, Gaengel, K., Krishnamoorthy, S., Kamiya, K., Kim, I.K., Ying, H., Weber, U., Perkins, L.A., Tartaglia, M., Mlodzik, M., *et al.* (2006). Transgenic Drosophila models of Noonan syndrome causing PTPN11 gain-of-function mutations. *Hum Mol Genet* 15, 543-553.
- Oishi, K.**, Zhang, H., Gault, W.J., Wang, C.J., Tan, C.C., Kim, I.K., Ying, H., Rahman, T., Pica, N., Tartaglia, M., *et al.* (2009). Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during Drosophila development. *Hum Mol Genet* 18, 193-201.
- Orkin, S.H.**, and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Osio, D.**, Dahlgren, J., Wikland, K.A., and Westphal, O. (2005). Improved final height with long-term growth hormone treatment in Noonan syndrome. *Acta Paediatr* 94, 1232-1237.
- Pamonsinlapatham, P.**, Hadj-Slimane, R., Lepelletier, Y., Allain, B., Toccafondi, M., Garbay, C., and Raynaud, F. (2009). p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. *Biochimie* 91, 320-328.
- Pandit, B.**, Sarkozy, A., Pennacchio, L.A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E.A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., *et al.* (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39, 1007-1012.
- Papadopoulou, A.**, Issakidis, M., Gole, E., Kosma, K., Fryssira, H., Fretzayas, A., Nicolaidou, P., and Kitsiou-Tzeli, S. (2011). Phenotypic spectrum of 80 Greek patients referred as Noonan syndrome and PTPN11 mutation analysis: the value of initial clinical assessment. *Eur J Pediatr*.
- Patrick, K.**, and Makris, M. (2010). Images in haematology. Noonan syndrome associated with bleeding disorders. *Br J Haematol* 151, 117.
- Peraldi, P.**, Zhao, Z., Filloux, C., Fischer, E.H., and Van Obberghen, E. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5002-5006.
- Perez, B.**, Mechinaud, F., Galambrun, C., Ben Romdhane, N., Isidor, B., Philip, N., Derain-Court, J., Cassinat, B., Lachenaud, J., Kaltenbach, S., *et al.* (2010). Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia. *J Med Genet* 47, 686-691.
- Pergament, E.**, Alamillo, C., Sak, K., and Fiddler, M. (2011). Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenat Diagn* 31, 307-310.
- Perkins, L.A.**, Johnson, M.R., Melnick, M.B., and Perrimon, N. (1996). The nonreceptor protein tyrosine phosphatase corkscrew functions in multiple receptor tyrosine kinase pathways in Drosophila. *Dev Biol* 180, 63-81.
- Perkins, L.A.**, Larsen, I., and Perrimon, N. (1992). corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. *Cell* 70, 225-236.
- Philip, N.**, and Sigaudy, S. (1998). Costello syndrome. *J Med Genet* 35, 238-240.
- Plotnikov, A.**, Zehorai, E., Procaccia, S., and Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1619-1633.
- Princen, F.**, Bard, E., Sheikh, F., Zhang, S.S., Wang, J., Zago, W.M., Wu, D., Trelles, R.D., Bailly-Maitre, B., Kahn, C.R., *et al.* (2009). Deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in muscle leads to dilated cardiomyopathy, insulin resistance, and premature death. *Mol Cell Biol* 29, 378-388.

- Qu, C.K.**, and Feng, G.S. (1998). Shp-2 has a positive regulatory role in ES cell differentiation and proliferation. *Oncogene* *17*, 433-439.
- Raaijmakers, R.**, Noordam, C., Karagiannis, G., Gregory, J.W., Hertel, N.T., Sipila, I., and Otten, B.J. (2008). Response to growth hormone treatment and final height in Noonan syndrome in a large cohort of patients in the KIGS database. *J Pediatr Endocrinol Metab* *21*, 267-273.
- Ranke, M.B.**, Heidemann, P., Knupfer, C., Enders, H., Schmaltz, A.A., and Bierich, J.R. (1988). Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. *Eur J Pediatr* *148*, 220-227.
- Rauen, K.A.**, Banerjee, A., Bishop, W.R., Lauchle, J.O., McCormick, F., McMahan, M., Melese, T., Munster, P.N., Nadaf, S., Packer, R.J., *et al.* (2011). Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: Moving toward clinical trials in RASopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* *157*, 136-146.
- Rauen, K.A.**, Schoyer, L., McCormick, F., Lin, A.E., Allanson, J.E., Stevenson, D.A., Gripp, K.W., Neri, G., Carey, J.C., Legius, E., *et al.* (2010). Proceedings from the 2009 genetic syndromes of the Ras/MAPK pathway: From bedside to bench and back. *Am J Med Genet A* *152A*, 4-24.
- Razzaque, M.A.**, Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., Kamisago, M., Momma, K., Katayama, H., Nakagawa, M., *et al.* (2007). Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* *39*, 1013-1017.
- Reig, I.**, Boixeda, P., Fleta, B., Morenoc, C., Gamez, L., and Truchuelo, M. (2011). Neurofibromatosis-Noonan syndrome: case report and clinicopathogenic review of the Neurofibromatosis-Noonan syndrome and RAS-MAPK pathway. *Dermatol Online J* *17*, 4.
- Reynolds, J.F.**, Neri, G., Herrmann, J.P., Blumberg, B., Coldwell, J.G., Miles, P.V., and Opitz, J.M. (1986). New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement--the CFC syndrome. *Am J Med Genet* *25*, 413-427.
- Roberts, A.**, Allanson, J., Jadico, S.K., Kavamura, M.I., Noonan, J., Opitz, J.M., Young, T., and Neri, G. (2006). The cardiofaciocutaneous syndrome. *J Med Genet* *43*, 833-842.
- Rodriguez-Viciana, P.**, Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Fried, M., and McCormick, F. (2006). A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell* *22*, 217-230.
- Rodriguez-Viciana, P.**, Tetsu, O., Tidyman, W.E., Estep, A.L., Conger, B.A., Cruz, M.S., McCormick, F., and Rauen, K.A. (2006). Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* *311*, 1287-1290.
- Romano, A.A.**, Allanson, J.E., Dahlgren, J., Gelb, B.D., Hall, B., Pierpont, M.E., Roberts, A.E., Robinson, W., Takemoto, C.M., and Noonan, J.A. (2010). Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics* *126*, 746-759.
- Romano, A.A.**, Blethen, S.L., Dana, K., and Noto, R.A. (1996). Growth hormone treatment in Noonan syndrome: the National Cooperative Growth Study experience. *J Pediatr* *128*, S18-21.
- Romano, A.A.**, Dana, K., Bakker, B., Davis, D.A., Hunold, J.J., Jacobs, J., and Lippe, B. (2009). Growth response, near-adult height, and patterns of growth and puberty in patients with noonan syndrome treated with growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* *94*, 2338-2344.
- Rosario, M.**, and Birchmeier, W. (2003). How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* *13*, 328-335.
- Rosario, M.**, Franke, R., Bednarski, C., and Birchmeier, W. (2007). The neurite outgrowth multiadapter RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *J Cell Biol* *178*, 503-516.
- Roskoski, R., Jr.** (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* *399*, 313-317.
- Sadowski, C.L.**, Wheeler, T.T., Wang, L.H., and Sadowski, H.B. (2001). GH regulation of IGF-I and suppressor of cytokine signaling gene expression in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* *142*, 3890-3900.
- Samani, A.A.**, Yakar, S., LeRoith, D., and Brodt, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine reviews* *28*, 20-47.
- Sarkozy, A.**, Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M.C., Pantaleoni, F., Scioletti, A.P., Esposito, G., Cordeddu, V., Lepri, F., *et al.* (2009). Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and

cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 30, 695-702.

Sarkozy, A., Conti, E., Digilio, M.C., Marino, B., Morini, E., Pacileo, G., Wilson, M., Calabro, R., Pizzuti, A., and Dallapiccola, B. (2004). Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentigines LEOPARD syndrome. *J Med Genet* 41, e68.

Sarkozy, A., Digilio, M.C., and Dallapiccola, B. (2008). Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 3, 13.
Savage, M.O., Burren, C.P., and Rosenfeld, R.G. (2010). The continuum of growth hormone-IGF-I axis defects causing short stature: diagnostic and therapeutic challenges. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72, 721-728.

Saxton, T.M., Ciruna, B.G., Holmyard, D., Kulkarni, S., Harpal, K., Rossant, J., and Pawson, T. (2000). The SH2 tyrosine phosphatase shp2 is required for mammalian limb development. *Nat Genet* 24, 420-423.

Saxton, T.M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.S., and Pawson, T. (1997). Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J* 16, 2352-2364.

Schaeper, U., Gehring, N.H., Fuchs, K.P., Sachs, M., Kempkes, B., and Birchmeier, W. (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* 149, 1419-1432.

Schluter, G., Steckel, M., Schiffmann, H., Harms, K., Viereck, V., Emons, G., Burfeind, P., and Pauer, H.U. (2005). Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with massive hygroma colli, pleural effusion and ascites. *Prenat Diagn* 25, 574-576.

Sebastian, A., Matsushita, T., Kawanami, A., Mackem, S., Landreth, G.E., and Murakami, S. Genetic inactivation of ERK1 and ERK2 in chondrocytes promotes bone growth and enlarges the spinal canal. *J Orthop Res* 29, 375-379.

Seishima, M., Mizutani, Y., Shibuya, Y., Arakawa, C., Yoshida, R., and Ogata, T. (2007). Malignant melanoma in a woman with LEOPARD syndrome: identification of a germline PTPN11 mutation and a somatic BRAF mutation. *Br J Dermatol* 157, 1297-1299.

Sharland, M., Burch, M., McKenna, W.M., and Paton, M.A. (1992). A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child* 67, 178-183.

Shaw, A.C., Kalidas, K., Crosby, A.H., Jeffery, S., and Patton, M.A. (2007). The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. *Arch Dis Child* 92, 128-132.

Shoba, L.N., Newman, M., Liu, W., and Lowe, W.L., Jr. (2001). LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes. *Endocrinology* 142, 3980-3986.

Shuai, K., and Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3, 900-911.

Siwik, E.S., Zahka, K.G., Wiesner, G.L., and Limwongse, C. (1998). Cardiac disease in Costello syndrome. *Pediatrics* 101, 706-709.

Sjogren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Tornell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., *et al.* (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7088-7092.

Soulsby, M., and Bennett, A.M. (2009). Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases. *Physiology (Bethesda)* 24, 281-289.

Stewart, R.A., Sanda, T., Widlund, H.R., Zhu, S., Swanson, K.D., Hurley, A.D., Bentires-Alj, M., Fisher, D.E., Kontaridis, M.I., Look, A.T., *et al.* (2010). Phosphatase-dependent and -independent functions of Shp2 in neural crest cells underlie LEOPARD syndrome pathogenesis. *Dev Cell* 18, 750-762.

Stofega, M.R., Herrington, J., Billestrup, N., and Carter-Su, C. (2000). Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2, and STAT5B. *Mol Endocrinol* 14, 1338-1350.

Suzuki, K., Oneyama, C., Kimura, H., Tajima, S., and Okada, M. Down-regulation of the tumor suppressor C-terminal Src kinase (Csk)-binding protein (Cbp)/PAG1 is mediated by epigenetic histone

- modifications via the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *J Biol Chem* 286, 15698-15706.
- Swat, W.**, Shinkai, Y., Cheng, H.L., Davidson, L., and Alt, F.W. (1996). Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4683-4687.
- Sznajder, Y.**, Keren, B., Baumann, C., Pereira, S., Alberti, C., Elion, J., Cave, H., and Verloes, A. (2007). The spectrum of cardiac anomalies in Noonan syndrome as a result of mutations in the PTPN11 gene. *Pediatrics* 119, e1325-1331.
- Tang, T.L.**, Freeman, R.M., Jr., O'Reilly, A.M., Neel, B.G., and Sokol, S.Y. (1995). The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early *Xenopus* development. *Cell* 80, 473-483.
- Tartaglia, M.**, and Gelb, B.D. (2010). Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1214, 99-121.
- Tartaglia, M.**, Gelb, B.D., and Zenker, M. (2011). Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25, 161-179.
- Tartaglia, M.**, Kalidas, K., Shaw, A., Song, X., Musat, D.L., van der Burgt, I., Brunner, H.G., Bertola, D.R., Crosby, A., Ion, A., *et al.* (2002). PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 70, 1555-1563.
- Tartaglia, M.**, Martinelli, S., Stella, L., Bocchinfuso, G., Flex, E., Cordeddu, V., Zampino, G., Burgt, I., Palleschi, A., Petrucci, T.C., *et al.* (2006). Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 78, 279-290.
- Tartaglia, M.**, Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., *et al.* (2001a). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29, 465-468.
- Tartaglia, M.**, Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., *et al.* (2001b). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29, 465-468.
- Tartaglia, M.**, Niemeyer, C.M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J.D., and Gelb, B.D. (2003). Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 34, 148-150.
- Tefft, D.**, De Langhe, S.P., Del Moral, P.M., Sala, F., Shi, W., Bellusci, S., and Warburton, D. (2005). A novel function for the protein tyrosine phosphatase Shp2 during lung branching morphogenesis. *Dev Biol* 282, 422-431.
- Tefft, D.**, Lee, M., Smith, S., Crowe, D.L., Bellusci, S., and Warburton, D. (2002). mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L700-706.
- Theintz, G.**, and Savage, M.O. (1982). Growth and pubertal development in five boys with Noonan's syndrome. *Arch Dis Child* 57, 13-17.
- Thomas, B.C.**, and Stanhope, R. (1993). Long-term treatment with growth hormone in Noonan's syndrome. *Acta Paediatr* 82, 853-855.
- Tidyman, W.E.**, and Rauen, K.A. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev* 19, 230-236.
- Tomic, S.**, Chughtai, N., and Ali, S. (1999). SOCS-1, -2, -3: selective targets and functions downstream of the prolactin receptor. *Mol Cell Endocrinol* 158, 45-54.
- Tonks, N.K.**, Diltz, C.D., and Fischer, E.H. (1988). Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem* 263, 6722-6730.
- Trovo-Marqui, A.B.**, and Tajara, E.H. (2006). Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet* 70, 1-13.
- Ucar, C., Calyskan, U., Martini, S., and Heinritz, W. (2006). Acute myelomonocytic leukemia in a boy with LEOPARD syndrome (PTPN11 gene mutation positive). *J Pediatr Hematol Oncol* 28, 123-125.
- Uehara, T.**, Suzuki, K., Yamanaka, H., Kizaki, T., Sakurai, T., Ishibashi, Y., Ishida, H., and Ohno, H. (2007). SHP-2 positively regulates adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells. *Int J Mol Med* 19, 895-900.

- Ugi, S.**, Maegawa, H., Kashiwagi, A., Adachi, M., Olefsky, J.M., and Kikkawa, R. (1996). Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3'-kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 271, 12595-12602.
- van der Burgt, I.** (2007). Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2, 4.
- van der Burgt, I.**, Berends, E., Lommen, E., van Beersum, S., Hamel, B., and Mariman, E. (1994). Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 53, 187-191.
- van der Burgt, I.**, Thoonen, G., Roosenboom, N., Assman-Hulsmans, C., Gabreels, F., Otten, B., and Brunner, H.G. (1999). Patterns of cognitive functioning in school-aged children with Noonan syndrome associated with variability in phenotypic expression. *J Pediatr* 135, 707-713.
- Vogel, W.**, Lammers, R., Huang, J., and Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* 259, 1611-1614.
- Vogel, W.**, and Ullrich, A. (1996). Multiple in vivo phosphorylated tyrosine phosphatase SHP-2 engages binding to Grb2 via tyrosine 584. *Cell Growth Differ* 7, 1589-1597.
- Wakioka, T.**, Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412, 647-651.
- Wang, C.C.**, Cirit, M., and Haugh, J.M. (2009). PI3K-dependent cross-talk interactions converge with Ras as quantifiable inputs integrated by Erk. *Mol Syst Biol* 5, 246.
- Wennerberg, K.**, Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- White, S.M.**, Graham, J.M., Jr., Kerr, B., Gripp, K., Weksberg, R., Cytrynbaum, C., Reeder, J.L., Stewart, F.J., Edwards, M., Wilson, M., *et al.* (2005). The adult phenotype in Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 136, 128-135.
- Willecke, R.**, Heuberger, J., Grossmann, K., Michos, O., Schmidt-Ott, K., Walentin, K., Costantini, F., and Birchmeier, W. (2011). The tyrosine phosphatase Shp2 acts downstream of GDNF/Ret in branching morphogenesis of the developing mouse kidney. *Dev Biol*.
- Witt, D.R.**, Keena, B.A., Hall, J.G., and Allanson, J.E. (1986). Growth curves for height in Noonan syndrome. *Clin Genet* 30, 150-153.
- Witt, D.R.**, McGillivray, B.C., Allanson, J.E., Hughes, H.E., Hathaway, W.E., Zipursky, A., and Hall, J.G. (1988). Bleeding diathesis in Noonan syndrome: a common association. *Am J Med Genet* 31, 305-317.
- Wiznerowicz, M.**, and Trono, D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77, 8957-8961.
- Woywodt, A.**, Welzel, J., Haase, H., Duerholz, A., Wiegand, U., Potratz, J., and Sheikhzadeh, A. (1998). Cardiomyopathic lentiginosis/LEOPARD syndrome presenting as sudden cardiac arrest. *Chest* 113, 1415-1417.
- Wu, D.**, Pang, Y., Ke, Y., Yu, J., He, Z., Tautz, L., Mustelin, T., Ding, S., Huang, Z., and Feng, G.S. (2009). A conserved mechanism for control of human and mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation by shp2 tyrosine phosphatase. *PLoS One* 4, e4914.
- Wu, T.R.**, Hong, Y.K., Wang, X.D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Han, Z.Y., Feng, G.S., and Chin, Y.E. (2002). SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem* 277, 47572-47580.
- Wu, X.**, Simpson, J., Hong, J.H., Kim, K.H., Thavarajah, N.K., Backx, P.H., Neel, B.G., and Araki, T. (2011). MEK-ERK pathway modulation ameliorates disease phenotypes in a mouse model of Noonan syndrome associated with the Raf1(L613V) mutation. *J Clin Invest* 121, 1009-1025.
- Xu, D.**, and Qu, C.K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* 13, 4925-4932.
- Yakar, S.**, Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., Wu, Y., Liu, J.L., Ooi, G.T., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y.R., *et al.* (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *The Journal of clinical investigation* 110, 771-781.

- Yang, W.**, Klamann, L.D., Chen, B., Araki, T., Harada, H., Thomas, S.M., George, E.L., and Neel, B.G. (2006). An Shp2/SFK/Ras/Erk signaling pathway controls trophoblast stem cell survival. *Dev Cell* *10*, 317-327.
- Yart, A.**, Laffargue, M., Mayeux, P., Chretien, S., Peres, C., Tonks, N.K., Roche, S., Payrastre, B., Chap, H., and Raynal, P. (2001). A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of Ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J Biol Chem* *276*, 8856-8864.
- Yoon, G.**, Rosenberg, J., Blaser, S., and Rauen, K.A. (2007). Neurological complications of cardio-facio-cutaneous syndrome. *Dev Med Child Neurol* *49*, 894-899.
- Yoon, S.**, and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* *24*, 21-44.
- Yoshida, R.**, Hasegawa, T., Hasegawa, Y., Nagai, T., Kinoshita, E., Tanaka, Y., Kanegane, H., Ohyama, K., Onishi, T., Hanew, K., *et al.* (2004). Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* *89*, 3359-3364.
- Yoshizato, H.**, Tanaka, M., Nakai, N., Nakao, N., and Nakashima, K. (2004). Growth hormone (GH)-stimulated insulin-like growth factor I gene expression is mediated by a tyrosine phosphorylation pathway depending on C-terminal region of human GH receptor in human GH receptor-expressing Ba/F3 cells. *Endocrinology* *145*, 214-220.
- You, M.**, Yu, D.H., and Feng, G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol* *19*, 2416-2424.
- Young, A.**, Lyons, J., Miller, A.L., Phan, V.T., Alarcon, I.R., and McCormick, F. (2009). Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res* *102*, 1-17.
- Yu, C.L.**, Jin, Y.J., and Burakoff, S.J. (2000). Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem* *275*, 599-604.
- Yu, W.M.**, Hawley, T.S., Hawley, R.G., and Qu, C.K. (2003). Catalytic-dependent and -independent roles of SHP-2 tyrosine phosphatase in interleukin-3 signaling. *Oncogene* *22*, 5995-6004.
- Zenker, M., Buheitel, G., Rauch, R., Koenig, R., Bosse, K., Kress, W., Tietze, H.U., Doerr, H.G., Hofbeck, M., Singer, H., *et al.* (2004). Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr* *144*, 368-374.
- Zhang, C.C.**, and Lodish, H.F. (2008). Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* *15*, 307-311.
- Zhang, E.E.**, Chapeau, E., Hagihara, K., and Feng, G.S. (2004). Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 16064-16069.
- Zhang, S.Q.**, Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol* *22*, 4062-4072.
- Zhang, S.Q.**, Yang, W., Kontaridis, M.I., Bivona, T.G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J.A., Schraven, B.L., Philips, M.R., *et al.* (2004c). Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* *13*, 341-355.
- Zhang, S.S.**, Hao, E., Yu, J., Liu, W., Wang, J., Levine, F., and Feng, G.S. (2009). Coordinated regulation by Shp2 tyrosine phosphatase of signaling events controlling insulin biosynthesis in pancreatic beta-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 7531-7536.

-Annexes-

Croissance

Identification des mécanismes moléculaires d'insensibilité partielle à GH dans le syndrome de Noonan

Thomas Edouard^{1,2}
 Armelle Yart²
 Jean-Philippe Combier²
 Audrey Nédélec²
 Françoise Conte-Aurio²
 Maïté Tauber^{1,2}
 Jean Pierre Salles^{1,2}
 Patrick Raynal²

1. Service d'Endocrinologie Pédiatrique, Hôpital des Enfants, Place du Docteur Baylac 31059 Toulouse Cedex, France.
 2. INSERM, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Hôpital Purpan, Place du Docteur Baylac 31059 Toulouse Cedex, France.

Correspondance :

Thomas Edouard ou Patrick Raynal
 Tél : 05 62 74 86 71
 Fax : 05 62 74 86 66
 E-mail : edouard.t@chu-toulouse.fr
 ou raynal@toulouse.inserm.fr

Mots clés :

Syndrome d'insensibilité à l'hormone de croissance, récepteur à l'hormone de croissance, syndrome de Noonan, protéine tyrosine phosphatase Shp2

L'hormone de croissance (Growth Hormone, GH), sécrétée par l'anté-hypophyse dans la circulation générale, se lie à des récepteurs membranaires au niveau des tissus cibles pour stimuler la croissance somatique ; la plupart de ses effets sont indirects, médiés par l'*Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) sécrétée en réponse à GH. Les enfants avec un déficit de sécrétion complet en GH présentent un retard statural sévère, corrigé par un traitement substitutif par GH recombinante.

En 1966, Laron et al. évoquèrent pour la première fois la notion d'insensibilité à GH (*Growth Hormone Insensitivity*, GHI) chez 3 enfants présentant un phénotype évoquant un déficit complet en GH bien qu'associé à des concentrations sériques de GH élevées [1]. Cette hypothèse fut confirmée en 1989 par la mise en évidence de mutations inactivatrices du gène du récepteur de GH (*Growth Hormone Receptor*, GHR). Plus récemment, des anomalies des voies de signalisation en aval du GHR ont été mises en évidence, permettant d'identifier de nouveaux mécanismes responsables de GHI. Ainsi, des mutations du gène codant pour *Signal Transducer and Activator of Transcription 5b* (STAT5b) ont été retrouvées chez des enfants présentant un retard statural associé à un déficit immunitaire [2]. De même, des mutations du gène de la phosphatase Shp2 ont été identifiées chez des enfants présentant un syndrome de Noonan [3].

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ces GHI est

nécessaire pour une meilleure connaissance des modes d'action de la GH et permettra peut-être de proposer des traitements plus adaptés à ces patients.

Le syndrome de Noonan et les syndromes neuro-cardio-facio-cutanés : des maladies génétiques de la voie Ras/MAPK

Le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique de transmission autosomique dominante relativement fréquente (1/2000 naissances). Ce syndrome est caractérisé par l'association d'une dysmorphie faciale, d'un retard statural, d'une cardiopathie (essentiellement une sténose des valves pulmonaires) et d'une prédisposition tumorale (en majorité sous la forme de leucémies myélomonocytaires juvéniles) [4].

En 2001, des mutations du gène PTPN11, codant pour la protéine tyrosine phosphatase Shp2, ont été mises en évidence chez la moitié des patients présentant un SN [3]. D'autres mutations de PTPN11 sont également retrouvées dans le syndrome LEOPARD (SL) (*multiple Lentigines, Electrocardiographic-conduction abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth, sensorineural Deafness*). Ce syndrome qui associe une cardiopathie et un retard statural est phénotypiquement très proche du SN et ne s'en différencie que par l'existence d'une atteinte cutanée (lentigines multiples) et d'une surdité.

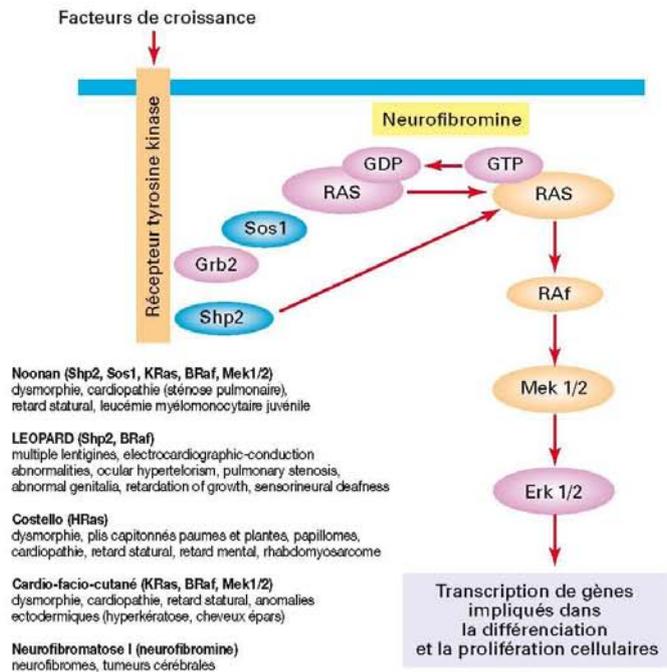


Figure 1. Les syndromes « neuro-cardio-facio-cutanés » sont provoqués par des mutations des protéines composant la voie de signalisation dite Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (Ras/MAPK). Pour chaque syndrome, est indiqué entre parenthèses les gènes de cette voie qui, à ce jour, ont été impliqués. HRas et KRas correspondent à deux isoformes de Ras codées par des gènes distincts. De même BRaf est une isoforme de Raf.

Plus récemment, des mutations de gènes codant pour d'autres molécules ont été mises en évidence chez les patients SN : SOS1 [5], KRAS [6], BRAF [7] et MEK1/2 [8]. Toutes ces molécules sont des acteurs de la voie *Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase* (Ras/MAPK) impliquée dans la régulation de la transcription de gènes contrôlant notamment la prolifération cellulaire.

En plus du SL, il existe deux syndromes phénotypiquement très proches du SN par la dysmorphie, la cardiopathie et le retard statural: il s'agit du syndrome Cardio-facio-cutané (CFC) et du syndrome de Costello. A côté de cette triade classique de symptômes, on retrouve dans le CFC une atteinte cutanée et des phanères spécifiques, et dans le syndrome de Costello un

retard mental et un risque tumoral élevé, de l'ordre de 15 %. Récemment des mutations de molécules également impliquées dans la voie Ras/MAPK ont été mises en évidence dans ces syndromes : ainsi des mutations de HRAS sont identifiées chez 80 à 90 % des patients atteints de syndrome de Costello [9] et des mutations de KRAS, BRAF et MEK1/2 chez ceux atteints de syndrome CFC [10]. Curieusement, certaines de ces mutations étaient connues pour provoquer, à l'état somatique, des tumeurs solides.

De manière générale, hormis dans le cas du SL, les mutations responsables de l'ensemble de ces syndromes semblent être de type gain-de-fonction, c'est-à-dire qu'elles conduisent à une activation de la voie Ras/MAPK supé-

rieure à la normale. Ainsi la description de ces mutations de molécules impliquées dans la voie Ras/MAPK semble fournir un mécanisme relativement commun à l'origine de tous ces syndromes phénotypiquement proches (Figure 1). Il a donc été proposé de regrouper l'ensemble de ces syndromes sous le nom de « syndromes neuro-cardio-facio-cutanés » [11].

Anomalies de la croissance dans le syndrome de Noonan

Le retard statural est présent chez 70 à 80 % des enfants présentant un SN et des courbes de croissance spécifiques ont pu être établies chez ces enfants [12, 13] (Figure 2). La croissance prénatale est souvent normale et le retard statural se manifeste au cours des deux premières années de la vie. Par la suite, la taille moyenne suit le troisième percentile jusqu'à 10 ans chez les filles et 12 ans chez les garçons, puis le retard statural s'accroît en rapport avec une puberté retardée. Le pic de croissance pubertaire apparaît avec un retard de deux ans et est souvent réduit, la taille finale étant atteinte à la fin de la deuxième décennie. La taille adulte spontanée est de 152.7 cm chez les femmes et 162.5 cm chez les hommes, soit au niveau du troisième percentile de la population normale. Dans les deux sexes, l'âge osseux est souvent retardé d'environ deux ans par rapport à l'âge chronologique.

La cause du retard statural chez ces enfants n'est pas claire. Dans la majorité des cas, la sécrétion de GH, spontanée ou lors de tests de stimulation pharmacologiques, est normale [14, 15], même si des réponses insuffisantes ou des anomalies neurosécrétoires ont pu être mises en évidence chez certains enfants [16-18]. De façon intéressante, les taux d'IGF-1 sont retrouvés abaissés dans la plupart des études [14, 15], ce qui, associé aux taux normaux de GH, est en faveur de l'existence d'une GHI. Cette GHI est partielle, en effet, plusieurs études ont démontré l'efficacité à court terme d'un traitement par

GH biosynthétique, avec une augmentation de la vitesse de croissance au cours des deux premières années de traitement [16]. Cependant, comme dans le cas d'autres pathologies traitées par GH, les études à long terme retrouvent un épuisement de l'effet initial avec un ralentissement de la vitesse de croissance [19-21].

Des études génétiques ont permis de préciser les caractéristiques des patients en fonction de la présence ou non de mutation de PTPN11. Comparés aux patients non mutés, les patients avec mutation de PTPN11 ont une taille de naissance plus petite, avec une proportion de SGA (*small for gestational age*) plus importante, puis un retard statural plus marqué [14, 22]. L'évaluation hormonale retrouve chez ces patients avec mutation de PTPN11 des taux d'IGF-1 plus bas, associés à des taux de GH plus élevés, ainsi qu'une plus faible réponse au traitement par GH, suggérant une GHI plus importante [14, 23, 24].

Le fait que les mutations de PTPN11, codant pour Shp2, soient responsables d'une GHI plus marquée suggère donc que cette phosphatase joue un rôle majeur dans les mécanismes de résistance « post-récepteur » à GH, même si les mécanismes moléculaires mis en jeu restent mal connus.

Implication de Shp2 dans la résistance partielle à GH ?

Quelques généralités sur le rôle physiologique de Shp2

La tyrosine phosphatase Shp2 est exprimée de manière ubiquitaire et joue un rôle fondamental dans la régulation de voies de signalisation majeures activées en réponse à de nombreux facteurs de croissance, cytokines et hormones. Ainsi, dans le cas du signal induit par l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), Shp2 facilite l'activation, de la voie Ras/MAPK [25, 26], mais est également un régulateur négatif de l'activation de la voie des Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K) [27] (Figure 3). Les voies Ras/MAPK et PI3K sont des modula-

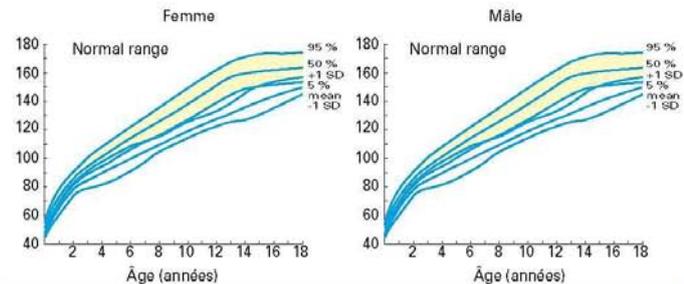


Figure 2. Courbe de croissance staturale de la naissance à 18 ans des filles (figure 2a) et des garçons (figure 2b) présentant un syndrome de Noonan (d'après Witt et al. *Clinical genetics* 1986 [13]). Les lignes correspondant à la moyenne, +1 et -1 déviation standard sont représentées, la zone grisée représente la courbe staturale normale de référence.

teurs cruciaux de la survie cellulaire, de la prolifération, de la différenciation, du métabolisme, ce qui explique que l'inactivation complète de Shp2 chez la souris soit létale in utero.

Ces deux voies (Ras/MAPK et PI3K) ainsi que la voie des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) sont activées en aval du GHR par des mécanismes partiellement définis (Figure 4). La molécule Shp2 pourrait être impliquée dans leur régulation, comme le suggèrent divers travaux (Figure 5). Ainsi, après stimulation par GH, il a été proposé que Shp2 puisse être recrutée par le GHR, par liaison directe au GHR, mais plus probablement par l'intermédiaire de la protéine multiadaptatrice Gab1 [28, 29]. Cependant, dans le cas de GH, la fonction moléculaire de Shp2 reste obscure, même s'il a été proposé un rôle apparemment positif de Shp2 dans l'activation de la voie Ras/MAPK, par des mécanismes à éclaircir. Concernant l'activation de la voie des STATs, les données de la littérature sont contradictoires, retrouvant soit un rôle régulateur négatif [30] soit activateur [31] de Shp2. Il apparaît donc essentiel d'éclaircir les mécanismes d'action de Shp2 dans la signalisation du GHR car cela permettrait de mieux comprendre comment des mutations de cette phosphatase induisent une résistance à GH chez les patients atteints du SN.

Shp2 pourrait être également impliquée dans la signalisation induite par

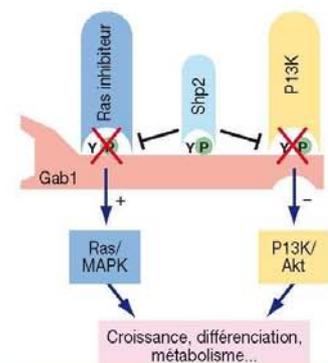


Figure 3. Implication du module Gab1/ Shp2 dans l'activation des voies Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (Ras/MAPK) et Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K). Il a été montré que sous stimulation par l'EGF, Gab1 est recruté au niveau du récepteur de l'EGF activé et est alors phosphorylé au niveau de ses sites de liaison pour Shp2, PI3K et RasGAP, un inhibiteur naturel de Ras. Ceci conduit alors à l'activation de ces enzymes. Shp2 module négativement l'activation de la voie PI3K/Akt en déphosphorylant les sites de liaison de PI3K sur Gab1. De même Shp2 déphosphoryle le site de liaison de RasGAP sur Gab1, empêchant ainsi le recrutement de RasGAP, ce qui permet ainsi la pleine activation de Ras.

l'IGF-1, comme le suggèrent certaines publications [32]. Si cette notion se confirmait, cela laisserait entrevoir la possibilité que chez certains patients présentant un SN, une résistance à l'IGF-1 puisse également être la cause du retard statural.

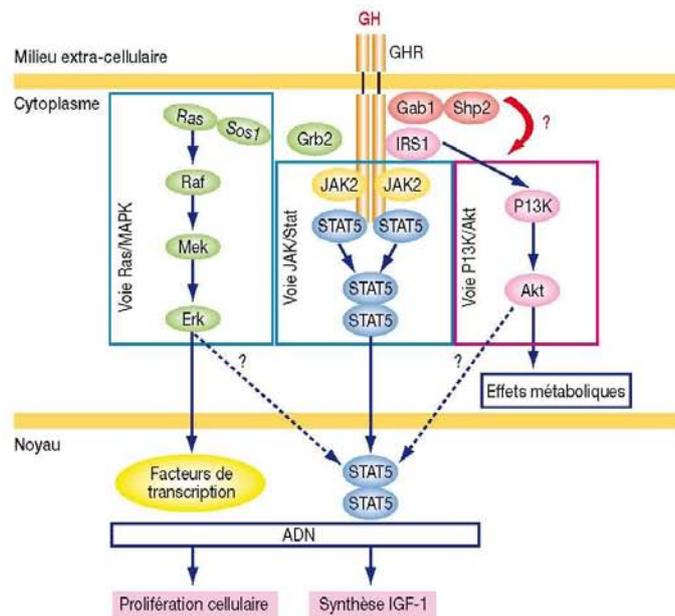


Figure 4. Les voies de transduction du signal en aval du récepteur à l'hormone de croissance (growth hormone receptor, GHR). Une molécule d'hormone de croissance (growth hormone, GH) se lie avec le domaine extracellulaire de 2 récepteurs entraînant leur homodimérisation. Cette homodimérisation permet l'activation de tyrosine kinases de la famille des Janus kinases (JAK-2) qui phosphorylent des tyrosines du domaine intracellulaire du GHR, ce qui crée des sites d'ancrage pour des molécules du signal. Différentes voies de transduction se déclenchent alors, dont les 3 principales sont : la voie des Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), la voie des Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (Ras/MAPK) et la voie des Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K). La voie des STATs (STAT5a et b) est considérée comme la voie principale de signalisation médiant les effets sur la croissance de la GH. En effet, les protéines STATs sont des facteurs de transcription stimulant la transcription de gènes cibles tel que l'Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1). La voie des Ras/MAPK est également impliquée dans la régulation de la transcription de gènes cibles contrôlant notamment la prolifération cellulaire. La voie PI3K semble médier la plupart des effets métaboliques de la GH. Plus récemment, la protéine adaptatrice Gab1 et la tyrosine phosphatase Shp2 ont été impliquées dans la signalisation du GHR, mais le rôle de ces protéines sur les effecteurs en aval du GHR reste obscur.

Comment les mutations de Shp2 provoquent une GHI partielle ? Une hypothèse

Shp2 est une protéine tyrosine phosphatase (PTP) contenant deux domaines Src homology 2 (N-SH2 et C-SH2) capables de se lier à des protéines possédant des résidus phosphotyrosines. Il s'agit donc d'une enzyme activée par des résidus phosphotyrosines, dans le but de déphosphoryler d'autres résidus phosphotyrosines. De manière basale,

Shp2 présente une activité catalytique faible du fait de l'interaction entre les domaines N-SH2 et PTP qui maintient la phosphatase dans une conformation dite fermée. Cette interaction est rompue lors de la liaison des domaines SH2 à des résidus phosphotyrosines activateurs (rencontrés par exemple sur la protéine multiadaptatrice Gab1), ce qui entraîne la stimulation de la phosphatase [33] (Figure 6a).

Dans le SN, la plupart des mutations sont situées au niveau de la surface d'interaction entre les domai-

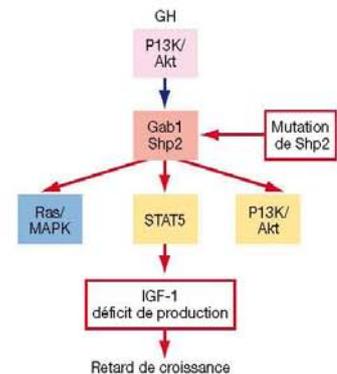


Figure 5. Implication du module Gab1/Shp2 dans la signalisation du récepteur à l'hormone de croissance (growth hormone receptor, GHR) ? Il a été montré que le module Gab1/Shp2 est recruté au niveau du GHR activé, cependant son rôle sur l'activation des différentes voies est peu connu. De même, les mutations de Shp2 seraient responsables d'une insensibilité à GH suivant un mécanisme inconnu.

nes N-SH2 et PTP impliquée dans le maintien de la molécule dans sa forme inactive : il s'agit donc de mutations gain-de-fonction car elles perturbent l'état « auto-inhibé » de la phosphatase [34] (Figure 6b). Dans le SL, les mutations de Shp2 sont localisées au niveau de la zone catalytique et notre équipe a été une des premières à montrer que ces mutations sont responsables d'une diminution de son activité enzymatique [35, 36]. Outre ces quelques données biochimiques, les conséquences fonctionnelles des mutations SN et SL de Shp2 ont été très peu étudiées et uniquement dans la signalisation de l'EGF. Ainsi, les mutants SN de Shp2, à l'inverse des mutants SL, seraient responsables d'une activation soutenue de la voie des MAPK, selon un mécanisme qui reste très mal compris [37]. Par conséquent, un certain nombre de questions intéressantes sur les plans moléculaire et physiopathologique restent posées, notamment comprendre comment des mutations activatrices ou inhibitrices de Shp2 peuvent être responsables du retard statural associé aux SN et SL, respectivement.

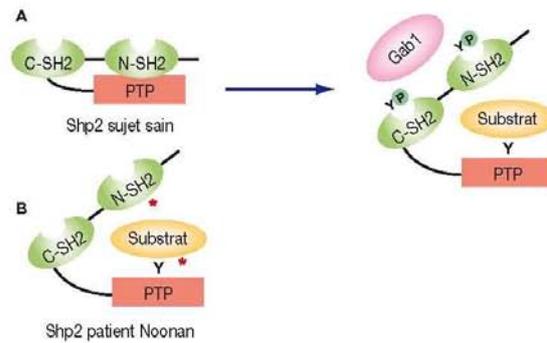


Figure 6. Des mutations activatrices de la tyrosine phosphatase Shp2 sont retrouvées chez la moitié des patients atteints de syndrome de Noonan. La structure de Shp2 consiste en un domaine catalytique protéine tyrosine phosphatase (PTP) et deux domaines Src homology 2 (SH2) qui reconnaissent des motifs phosphotyrosines spécifiques. Shp2 présente une activité catalytique basale faible du fait d'interactions étroites entre le domaine SH2 N-terminal et le domaine PTP, maintenant la phosphatase dans une conformation fermée auto-inhibée. Son activation catalytique requiert une ouverture de la molécule par le relâchement de ces interactions qui survient quand ses domaines SH2 lient des motifs phosphotyrosines spécifiques sur des molécules de signalisation situées en amont, comme la molécule adaptatrice Gab1 (figure 6a). Chez la moitié des patients atteints de syndrome de Noonan, sont retrouvées des mutations de Shp2 affectant des résidus localisés au niveau de la surface d'interaction entre les domaines SH2 et PTP. Il se produit alors une rupture de la conformation fermée auto-inhibée, résultant en une activité phosphatase basale augmentée : il s'agit donc de mutations activatrices avec gain de fonction (figure 6b).

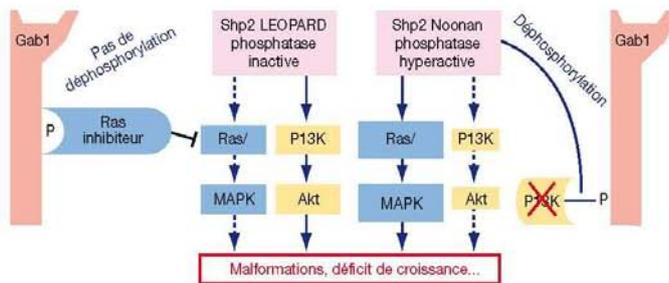


Figure 7. Du fait de l'implication du module Gab1/Shp2 dans l'activation des voies Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (Ras/MAPK) et Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K) (figure 3), notre hypothèse serait que la croissance normale des individus soit dépendante d'une activation équilibrée de ces deux voies en réponse à GH. Par conséquent, des mutations de Shp2 déséquilibrant cette balance dans un sens ou dans l'autre (hyperactivation de Ras/MAPK et hypoactivation de PI3K dans le cas du SN; hypoactivation de Ras/MAPK et hyperactivation de PI3K dans le cas du SL) puissent entraîner des anomalies de la production d'IGF-1 observées chez les patients SN ou SL.

Une de nos hypothèses de travail repose sur le fait que, sous EGF, Shp2 semble contrôler positivement la voie Ras/MAPK et négativement la voie PI3K, en déphosphorylant Gab1 sur ses sites de liaison à un inhibiteur de Ras, ainsi que ceux permettant l'association à PI3K, respectivement [26,

27] (Figure 3). Ainsi, on peut imaginer que la croissance normale des individus soit dépendante d'une activation équilibrée de ces deux voies en réponse à GH. Par conséquent, des mutations de Shp2 déséquilibrant cette balance dans un sens ou dans l'autre (hyperactivation de Ras/MAPK et hypoactivation de Ras/MAPK et hypoac-

tivation de PI3K dans le cas du SN; hypoactivation de Ras/MAPK et hyperactivation de PI3K dans le cas du SL) puissent entraîner des anomalies de la production d'IGF-1 observées chez les patients SN ou SL. Nos travaux en cours visent à tester la validité de cette hypothèse (Figure 7).

Références

1. Laron Z et al, *Isr J Med Sci*, 1966 ; 2:152.
2. Kofoed EM et al, *N Engl J Med*, 2003 ; 349:1139.
3. Tartaglia M et al, *Nat Genet*, 2001 ; 29:465.
4. Allanson JE, *J Med Genet*, 1987 ; 24:9.
5. Roberts AE et al, *Nat Genet*, 2007 ; 39:7.
6. Schubbert S et al, *Nat Genet*, 2006 ; 38:331.
7. Razaque MA et al, *Nat Genet*, 2007 ; 39:1013.
8. Nava C et al, *J Med Genet*, 2007 ; 44:763.
9. Aoki Y et al, *Nat Genet*, 2005 ; 37:1038.
10. Niihori T et al, *Nat Genet*, 2006 ; 38:294.
11. Bentires-Alj M et al, *Nat Med*, 2006 ; 12:283.
12. Ranke MB et al, *Eur J Pediatr*, 1988 ; 148:220.
13. Witt DR et al, *Clin Genet*, 1986 ; 30:150.
14. Limal JM et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 2006 ; 91:300.
15. Ahmed ML et al, *Acta Paediatr Scand*, 1991 ; 80:446.
16. Cotterill AM et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 1996 ; 81:2291.
17. Noordam C et al, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2001 ; 54:53.
18. Tanaka K et al, *Intern Med*, 1992 ; 31:908.
19. Noordam K et al, *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002 ; 15:175.
20. MacFarlane CE et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 2001 ; 86:1953.
21. Romano AA et al, *J Pediatr*, 1996 ; 128:518.
22. Zenker M et al, *J Pediatr*, 2004 ; 144:368.
23. Binder G et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 2005 ; 90:5377.
24. Ferreira LV et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 2005 ; 90:5156.
25. Yart A et al, *J Biol Chem*, 2001 ; 276:8856.
26. Montagner A et al, *J Biol Chem*, 2005 ; 280:5350.
27. Zhang SQ et al, *Mol Cell Biol*, 2002 ; 22:4062.
28. Kim SO et al, *J Biol Chem*, 1998 ; 273:2344.
29. Kim SO et al, *Endocrinology*, 2002 ; 143:4856.
30. Stofega MR et al, *Mol Endocrinol*, 2000 ; 14:1338.
31. Ke Y et al, *J Biol Chem*, 2006 ; 281:34374.
32. Maile LA et al, *J Biol Chem*, 2002 ; 277:8955.
33. Neel BG et al, *Trends Biochem Sci*, 2003 ; 28:284.
34. Keilhack H et al, *J Biol Chem*, 2005 ; 280:30984.
35. Kontaridis MI et al, *J Biol Chem*, 2006 ; 281:6785.
36. Hanna N et al, *FEBS Lett*, 2006 ; 580:2477.
37. Fragale A et al, *Hum Mutat*, 2004 ; 23:267.

Functional Effects of *PTPN11* (SHP2) Mutations Causing LEOPARD Syndrome on Epidermal Growth Factor-Induced Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Glycogen Synthase Kinase 3 β Signaling[∇]

Thomas Edouard,^{1†} Jean-Philippe Combier,^{1†} Audrey Nédélec,¹ Sophie Bel-Vialar,³ Mélanie Métrich,⁴ Françoise Conte-Auriol,^{1,2} Stanislas Lyonnet,⁵ Béatrice Parfait,⁶ Maithé Tauber,^{1,2} Jean-Pierre Salles,^{1,2} Frank Lezoualc'h,⁴ Armelle Yart,^{1*} and Patrick Raynal^{1,2*}

INSERM U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, F-31024 Toulouse, France¹; CHRU and Université Toulouse III, Hôpital Purpan, F-31059 Toulouse, France²; Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR5547, F-31062 Toulouse, France³; INSERM UMRS 769, Signalisation et Physiopathologie Cardiaque, Université Paris Sud 11, F-92296 Châtenay-Malabry, France⁴; Université Paris Descartes and INSERM U781, Hôpital Necker, F-75743 Paris, France⁵; and Université Paris Descartes and INSERM U745, UFR Pharmacie, F-75270 Paris, France⁶

Received 19 May 2009/Returned for modification 22 December 2009/Accepted 17 February 2010

LEOPARD syndrome (LS), a disorder with multiple developmental abnormalities, is mainly due to mutations that impair the activity of the tyrosine phosphatase SHP2 (*PTPN11*). How these alterations cause the disease remains unknown. We report here that fibroblasts isolated from LS patients displayed stronger epidermal growth factor (EGF)-induced phosphorylation of both AKT and glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) than fibroblasts from control patients. Similar results were obtained in HEK293 cells expressing LS mutants of SHP2. We found that the GAB1/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) complex was more abundant in fibroblasts from LS than control subjects and that both AKT and GSK-3 β hyperphosphorylation were prevented by reducing GAB1 expression or by overexpressing a GAB1 mutant unable to bind to PI3K. Consistently, purified recombinant LS mutants failed to dephosphorylate GAB1 PI3K-binding sites. These mutants induced PI3K-dependent increase in cell size in a model of chicken embryo cardiac explants and in transcriptional activity of the atrial natriuretic factor (ANF) gene in neonate rat cardiomyocytes. In conclusion, SHP2 mutations causing LS facilitate EGF-induced PI3K/AKT/GSK-3 β stimulation through impaired GAB1 dephosphorylation, resulting in deregulation of a novel signaling pathway that could be involved in LS pathology.

Noonan syndrome (NS) (MIM163950) is a relatively frequent (~1/2,000 births) autosomal dominant disease primarily characterized by facial dysmorphism, heart defects, and short stature. LEOPARD syndrome (LS) (MIM151100) is a rarer but related disorder that associates, roughly, NS symptoms with deafness and cutaneous abnormalities. Both NS and LS belong to the family of “neuro-cardio-facial-cutaneous” (NCFC) syndromes, a group of developmental disorders that display different combinations of the above-mentioned symptoms with mental retardation and tumor predisposition (4, 13).

At least 80% of LS and 50% of NS patients carry germ line missense mutations in *PTPN11*, the gene encoding SHP2. SHP2 is a widely expressed protein tyrosine phosphatase (PTP) that contains Src homology 2 (SH2) domains and promotes Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation through different molecular mechanisms (14, 27, 39, 47). Other LS or NS forms are caused by mutations in *KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, *BRAF*, and *SHOC2* genes, which encode key factors of the Ras-MAPK pathway (6, 32, 34, 37, 38, 41).

Although genetic studies have provided essential advances, how *PTPN11* mutations cause the diseases' symptoms remains an open question. Biochemical studies have shown that NS mutations are located at contact points between the catalytic and the SH2 domains and therefore disrupt SHP2 autoinhibitory conformation (11, 19), thereby stimulating SHP2 catalytic activity (gain-of-function mutations). Conversely, LS mutations are confined within the catalytic domain and repress SHP2 activity (15, 21, 40).

A key issue in understanding LS/NS pathogenesis is the identification of the signaling pathways that are altered by these mutations. It is now well accepted that NS mutants can exert a dominant-positive effect on Ras-MAPK activation and that this upregulation is responsible for the cardiac defects observed in NS (1, 2, 9, 11, 22, 23, 29). In addition, NS mutations could alter other signaling pathways (Ca²⁺/NFAT, RhoA, and Src) (17, 42, 44).

In the case of *PTPN11* mutations causing LS, our knowledge is much poorer, since even the outcomes of these mutations for the Ras-MAPK pathway are unclear (21, 31). It is thus important to examine whether these mutations modify other signaling pathways that regulate embryo development. It was shown recently that, besides promoting Ras/MAPK stimulation, wild-type (WT) SHP2 can regulate phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation by growth factors (46). In addition, our recent biochemical study suggests that LS mutations could promote PI3K activation (15). PI3Ks are lipid kinases with major functions during development, as shown by re-

* Corresponding author. Mailing address: INSERM U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, BP3028, Toulouse, F-31024, France. Fax: 33-562-748-666. Phone for Patrick Raynal: 33-562-748-671. E-mail: patrick.raynal@inserm.fr. Phone for Armelle Yart: 33-562-748-657. E-mail: armelle.yart@inserm.fr.

† T.E. and J.-P.C. contributed equally to the work.

∇ Published ahead of print on 22 March 2010.

combinant mouse models and human familial diseases. Similarly to Ras/MAPK, PI3K activity is highly regulated by growth factors and is critical for their actions in cell growth, apoptosis, migration, and differentiation (10, 18).

Therefore, we assessed whether LS mutations could influence PI3K activation. To this end, we generated primary and immortalized fibroblast cell lines from LS patients and healthy controls and showed that, in response to epidermal growth factor (EGF) stimulation, PI3K/AKT was upregulated in LS cells. This deregulation was due to impaired dephosphorylation of GAB1 PI3K-binding sites by LS mutants. Furthermore, LS mutants promoted PI3K-dependent upregulation of hypertrophy genes in cardiomyocytes.

MATERIALS AND METHODS

Generation, culture, and stimulation of LS, NS, and control fibroblasts. Primary fibroblast cultures were established from skin biopsy specimens obtained from four different patients (two LS patients carrying the Y279C or T468M mutation and two NS patients with the E76D or N308D mutation) and from two healthy subjects following standard protocols (5) approved by our institutional review board and after informed consent. The fibroblasts were expanded, immortalized with simian virus 40 (SV40), and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Invitrogen). Before stimulation, the cells were incubated overnight in serum-free medium. The stimulations were performed using 50 ng/ml EGF (Peprotech) for the indicated times. When indicated, cells were treated, before stimulation, with 20 μ M LY294002 or 100 nM wortmannin.

siRNA transfection. Forty-percent-confluent 6-well plates of immortalized fibroblasts were treated with a transfection mixture containing 800 μ l DMEM and 200 μ l Opti-MEM (Invitrogen) containing GAB1 or control small interfering RNA (siRNA) (Qiagen; catalog no. SI02654736 and 1027310; 30 nM) and 3 μ l Oligofectamine (Invitrogen). The cells were incubated in the transfection mixture for 4 h, and then 500 μ l DMEM, supplemented with 30% serum and antibiotics, was added to each plate. The cells were again incubated for 24 h and then serum starved overnight and stimulated or not with EGF as indicated.

Western blot analysis. Cells were scraped off in lysis buffer containing 25 mM Tris, pH 7.4, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 0.5% Triton X-100, 20 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors. The cell lysates were cleared by centrifugation, and total proteins were measured using the method of Bradford (Bio-Rad). Lysate aliquots containing identical amounts of proteins were diluted in Laemmli's sample buffer, boiled, and processed for immunoblotting using a standard procedure (7, 36). The polyclonal antibodies used were anti-phospho-AKT-Ser473 and anti-phospho-glycogen synthase kinase 3 α/β (GSK-3 α/β)-Ser219 (Cell Signaling Technology); anti-GAB1, -SHP2, -EGF receptor (EGFR), and -AKT (Santa Cruz); and anti-p85 (Upstate). The monoclonal antibodies were anti-GSK-3 β (Cell Signaling), antitubulin (Sigma), antihemagglutinin (anti-HA) (Roche), anti-Myc (Santa Cruz), and anti-V5 (Invitrogen). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Sigma. Blots were revealed using the Enhanced Chemiluminescence detection system (Amersham).

Transfection of HEK293 cells. Subconfluent HEK293 cells grown in 100-mm plates with DMEM containing 10% FBS and antibiotics (Invitrogen) were transiently transfected with a mixture containing 6 μ l of FuGene6 reagent (Roche) and 2 μ g of total DNA, according to the manufacturer's instructions. The pcDNA plasmids encoding WT SHP2 and mutants, GAB1-Myc, and HA-AKT were described previously (15, 27, 36) or were obtained using the QuikChange kit (Stratagene). After 24 h, the cells were serum deprived and stimulated as for human fibroblasts.

Immunoprecipitations and GST-p85 pull-downs. Cells were scraped off in lysis buffer containing 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors and then centrifuged to eliminate the insoluble material. For immunoprecipitation, the lysates were incubated with the indicated primary antibodies for 1 h at 4°C, followed by incubation with protein A-Sepharose (Amersham) for 1 h, and then collected by centrifugation and washed with lysis buffer containing 0.1% Nonidet P-40 and 0.1 mM Na₃VO₄. The immunoprecipitates were then processed for Western blot analysis as described above.

The glutathione β -transferase (GST) fusion protein containing the SH2 domains of p85 was described previously (7). The fusion protein was expressed in

Escherichia coli and extracted using glutathione-Sepharose beads (Sigma) in a standard procedure. For GST pull-down experiments, cells were scraped off in 1 ml lysis buffer containing 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.5% sodium desoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 1 μ g/ml each of aprotinin and leupeptin. The cleared lysates were incubated at 4°C for 2 h with 3 μ g of GST-p85 bound to glutathione-Sepharose beads. The beads were washed three times in lysis buffer and then boiled in electrophoresis sample buffer and processed for Western blotting.

Recombinant proteins and PTP assay. SHP2 mutant cDNAs were subcloned into the pProEX-HT vector to produce recombinant proteins according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Briefly, recombinant proteins were extracted from *E. coli* lysates using ProBond resin, and then the beads were washed with buffer containing 20 mM Tris, pH 7.4, 200 mM NaCl, 40 mM imidazole, 1 mM PMSF, and protease inhibitors. Proteins were eluted with 200 mM imidazole. Purification was monitored by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The purified proteins were stored in 33% glycerol at -80°C. PTP assays were performed by incubating 50 ng of each SHP2 recombinant protein in PTP buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM dithiothreitol [DTT]) with 250 μ M substrate phosphopeptide, Src-pY530 (TSTEPQ-pY-QPGENL) or GAB1-pY589 (DSEEN-pY-VPNPNL), in the presence or absence of activating peptides (IRSI-pY1172, SLN-pY-IDLDLVK) (where pY is phosphoryrosine). After a 30-min incubation at 37°C, the amount of released phosphate was assayed using Malachite Green solution (Upstate Biotechnology). The phosphopeptides were synthesized by NeoMPS.

Generation of recombinant adenoviruses. Bicistronic adenoviruses encoding green fluorescent protein (GFP) and SHP2-WT, -E76D, -N308D, -Y279C, or -T468M were obtained by subcloning the corresponding V5-tagged SHP2 construct into the pTrack CMV vector. Recombinant adenoviruses were then obtained according to the pAdEasy homologous-recombination system, followed by plaque purification, expansion, and titration in HEK293 cells (16).

Serum response factor (SRF)/myocardin assays with the luciferase reporter gene. Patient fibroblasts (50,000 cells/well) were seeded in 24-well plates 16 h prior to transfection. The transfection mixture contained 1.2 μ l of FuGene6 reagent (Roche), 15 ng of serum response element-luciferase reporter gene construct (30), 3 ng of pSV-Renilla luciferase expression vector as an internal control (Promega), 150 ng of myocardin expression vector (43) (unless otherwise indicated), and 160 ng of pcDNA3 plasmid. These optimal concentrations were the result of several experimental trials. The cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) 16 h after transfection and maintained in serum-free DMEM for 24 h. After EGF stimulation, cell extracts were prepared and luciferase activity was determined using the Dual Luciferase kit (Promega). Measurements were made using a Berthold Lumat LB950.

Chicken embryo myocardial explants and fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Fertile hen's eggs obtained from a local supplier were incubated at 38°C to yield embryos at the Hamburger-Hamilton stage 22 (embryonic day 3.5 [E3.5]). Myocardial cushions were excised from embryos, randomly assigned to the different treatment groups, and cultured for 3 days as follows. The cushions were incubated in 50 μ l of medium with 10⁸ PFU of adenoviruses encoding WT SHP2 or mutants for 30 min before being plated for organotypic cultures (25) in M199 (Cellgro) with 10% FBS (Invitrogen), 1% chicken embryo extract (Sera Laboratories International), and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). After 24 h, the cushions were incubated in M199 containing 2% FBS for 24 h and finally stimulated with 50 ng/ml EGF for the last 24 h. The myocardial explants were checked for GFP expression to assess the efficiency of adenoviral infection. Images of whole cushions were acquired with an SP2 Leica confocal microscope. At the end of the experiment, the explants were dissociated with trypsin and gentle pipetting. Individual cells were fixed on ice for 15 min with 2% paraformaldehyde, and cell size was analyzed using a FACSscan apparatus.

Measurement of ANF transcriptional activity. For measurement of atrial natriuretic factor (ANF) transcriptional activity, neonatal rat ventricular myocytes were isolated as described previously (45) and cultivated in 12-well plates. They were transfected with 0.35 μ g DNA of the SHP2 mutant construct and 0.15 μ g of plasmid carrying the rat ANF promoter fused to the luciferase reporter gene (ANF-Luc). DNA was mixed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in Opti-MEM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and as previously described (26, 28).

Statistics. Results are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM) and were compared using a paired Student's *t* test. The number of independent experiments (*n*) is indicated. A *P* value below 0.05 was considered significant.

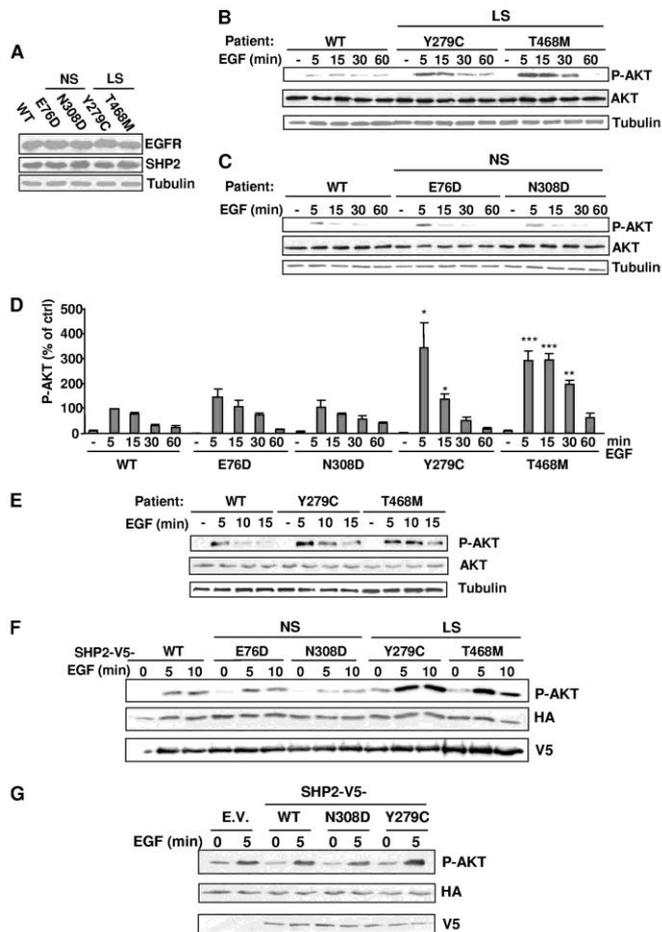


FIG. 1. Dominant-positive activity of LS mutants on AKT phosphorylation. (A) Immortalized skin fibroblasts from healthy subjects (WT) or from LS or NS patients carrying the indicated *PTPN11* mutations were lysed and probed by Western blot analysis to assess the level of EGFR and SHP2 expression. (B and C) The same cells were stimulated with EGF for the indicated times and probed by Western blot analysis to determine the level of AKT phosphorylation with an anti-phospho-AKT (P-AKT) antibody. AKT and tubulin were used as controls for gel loading. (D) P-AKT immunoblots from 3 independent experiments shown in panels B and C were quantified using ImageJ software. Only significant differences versus WT cells for the corresponding time are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; $n = 3$). The error bars indicate SEM. (E) The same experiment as shown in panel B performed with WT and LS fibroblasts prior to immortalization. (F) HEK293 cells were cotransfected with HA-tagged AKT and the indicated V5-tagged SHP2 constructs. Following EGF stimulation, the cells were immunoprecipitated with an anti-HA antibody and then probed with anti-P-AKT or anti-HA antibodies (top and middle gels). Aliquots of corresponding cell lysates were probed with an anti-V5 antibody (bottom gel). (G) The same experiment as shown in panel F performed with the indicated constructs (E. V., empty vector).

RESULTS

Dominant-positive activity of LS *PTPN11* mutants on AKT activation. To explore the possible effects of *PTPN11* mutations on the PI3K/AKT pathway, we monitored AKT phosphorylation following stimulation with EGF in immortalized fibroblasts from LS and NS patients and healthy controls. For this purpose, we measured AKT phosphorylation on Ser-473, which is dependent on PI3K under EGF stimulation

(data not shown). The different cell lines express EGFR and SHP2 to similar extents (Fig. 1A), implying that comparison of EGF-stimulated signaling between them could reveal possible effects of the corresponding SHP2 mutation. EGF-induced AKT phosphorylation was significantly more robust in fibroblasts from the two LS patients (Y279C and T468M) (Fig. 1B) than in NS cells (E76D and N308D) (Fig. 1C) compared to healthy controls (Fig. 1D). To ensure that immortalization did

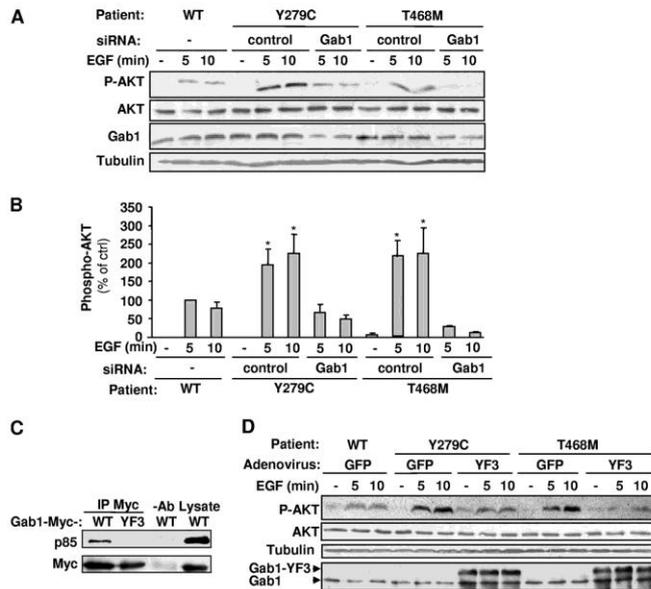


FIG. 2. LS mutant-induced PI3K upregulation is dependent on GAB1-mediated PI3K recruitment. (A) Immortalized skin fibroblasts from a healthy subject (WT) or from LS patients carrying the indicated *PTPN11* mutations were transfected with control or GAB1 siRNA, as indicated, before stimulation with EGF for the indicated times. The cells were then processed for Western blot analysis and probed with the indicated antibodies. (B) Immunoblots performed for panel A were quantified using ImageJ. Only significant differences versus WT cells for the corresponding time are indicated (*, $P < 0.05$; $n = 3$). The error bars indicate SEM. (C) HEK293 cells were transfected with constructs encoding Myc-tagged GAB1-WT or GAB1-YF3. Following EGF stimulation, the cells were subjected to anti-Myc immunoprecipitation (IP) and then analyzed by anti-p85 (top) or anti-Myc (bottom) immunoblotting. -Ab WT, mock immunoprecipitation performed from GAB1-WT-transfected cells without primary antibody; Lysate WT, aliquot of transfected cell lysate loaded on the gel as a positive control for Western blot revelation. (D) WT or LS fibroblasts were infected with adenoviruses encoding GAB1-YF3 or GFP as a control, as shown. Following stimulation with EGF, the cells were processed for Western blot analysis and probed with the indicated antibodies.

not influence AKT phosphorylation, the same experiment was also performed in LS and control fibroblasts before immortalization, with results comparable to those obtained with immortalized cells (Fig. 1E).

To further confirm this effect of LS mutations on the PI3K/AKT pathway, we monitored AKT phosphorylation in HEK293 cells, a standard model for the analysis of SHP2 molecular functions (21, 36), transfected with the corresponding LS and NS mutants, together with HA-AKT. SHP2-Y279C and -T468M mutants reinforced EGF-induced AKT phosphorylation in comparison to WT SHP2 and the NS mutants (E76D and N308D) (Fig. 1F). Similar results were obtained with other LS (Q510P) or NS (D61del and E139D) mutants (data not shown). As a control, we verified that expression of WT SHP2 did not significantly modify AKT phosphorylation compared to cells transfected with an empty vector (Fig. 1G).

These results indicate that SHP2 mutants identified in LS patients have a dominant-positive effect on AKT activation.

LS mutants promote PI3K/AKT upregulation through impaired dephosphorylation of GAB1 PI3K-binding sites. We next investigated how LS mutants exerted a dominant-positive effect on PI3K/AKT activation. EGF-dependent PI3K/AKT stimulation relies on GAB1, a docking protein phosphorylated by

EGF receptor on specific tyrosine residues involved in PI3K recruitment via its p85 regulatory unit (24). Since SHP2 can dephosphorylate these PI3K-binding sites to regulate PI3K/AKT activation (46), we hypothesized that a defect in this regulatory activity in LS patients could lead to increased EGF-induced PI3K activation, which would explain the stronger AKT activation observed in LS fibroblasts.

To test this hypothesis, we determined whether siRNA-mediated suppression of GAB1 expression had an effect on AKT hyperphosphorylation in LS cells. Upon reduction of GAB1 expression, AKT hyperphosphorylation was decreased (Fig. 2A), and a quantitative analysis showed a similar effect of GAB1 siRNA in decreasing AKT phosphorylation in fibroblasts obtained from both LS patients (Fig. 2B). This suggested that GAB1 was involved in PI3K/AKT upregulation in LS cells. To further validate this hypothesis, we analyzed EGF-induced AKT phosphorylation in LS cells transfected with the GAB1-YF3 mutant. This construct is mutated on its three PI3K-binding sites, and we verified that it is unable to associate with PI3K (p85) (Fig. 2C). When overexpressed in LS patient cells, GAB1-YF3 reduced AKT hyperphosphorylation, whereas, as a control, GFP had no effect (Fig. 2D). Hence, this result supported the above hypothesis.

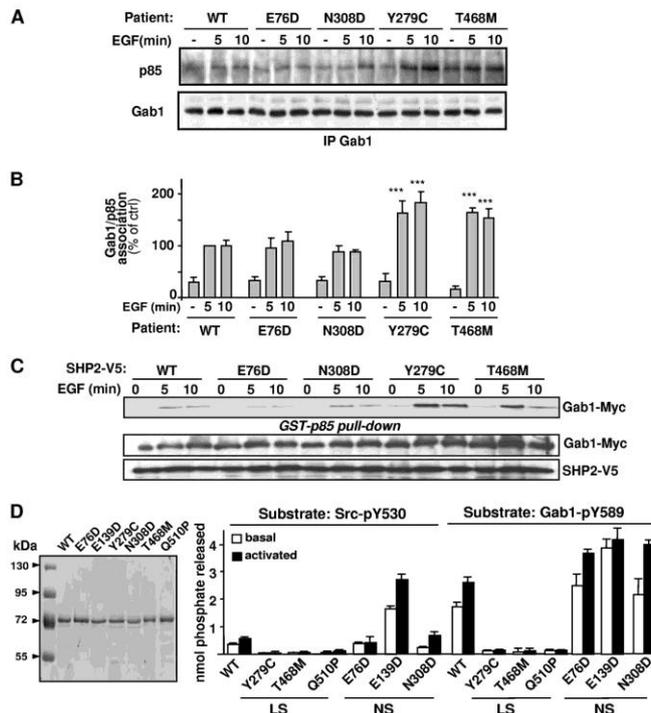


FIG. 3. LS mutants impair dephosphorylation of GAB1 PI3K-binding sites. (A) WT, NS, or LS fibroblasts were stimulated with EGF for the indicated times and then immunoprecipitated with an anti-GAB1 antibody and probed for p85 and GAB1. (B) Quantification of p85 precipitation using ImageJ. Only significant differences versus WT cells for the corresponding time are indicated (***, $P < 0.001$; $n = 3$). The error bars indicate SEM. (C) HEK293 cells were transfected with Myc-tagged GAB1 and the indicated V5-SHP2 constructs and then subjected to a PI3K affinity precipitation assay (pull-down) using a GST-PI3K (GST-p85) fusion protein. The amount of precipitated GAB1-Myc was analyzed with an anti-Myc antibody (top gel). Aliquots of corresponding lysates were probed with anti-Myc and anti-V5 antibodies (middle and bottom gels). (D) Analysis of recombinant LS and NS SHP2 mutants by *in vitro* phosphatase assays. (Left) Two micrograms of the indicated recombinant SHP2 proteins was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. (Right) Phosphatase assays were performed by incubating the indicated recombinant SHP2 proteins with Src-pY530 or GAB1-pY589 phosphopeptide as a phosphatase substrate. The assays were performed in the presence or absence of an SHP2-activating peptide, as indicated.

To assess whether this PI3K/AKT upregulation was due to increased interaction between GAB1 and PI3K, we measured the GAB1/PI3K association in WT, NS, and LS cells by coimmunoprecipitating GAB1 with p85 following stimulation with EGF. The amount of p85 that was present in GAB1 immunoprecipitates was significantly higher in LS cells than in control or NS cells (Fig. 3A and B). This suggests that LS mutations favor sustained binding of GAB1 to PI3K, which may explain why in LS cells AKT is hyperphosphorylated.

To further examine whether LS mutations promoted GAB1/PI3K binding through impaired dephosphorylation of GAB1, we analyzed GAB1 phosphorylation on its PI3K-binding sites in HEK293 cells transfected with the LS (SHP2-Y279C and -T468M) and NS (SHP2-E76D and -N308D) mutants. For convenience, we affinity precipitated GAB1 with a GST-p85 fusion protein, which allowed us to precipitate GAB1 when phosphorylated on its PI3K-binding sites (7). Figure 3C shows that, in comparison with WT SHP2, the LS mutants, but not

the NS mutants, facilitated GST-p85/GAB1 association, implying sustained phosphorylation of GAB1 on its PI3K-binding sites. This reinforced the hypothesis that LS mutants promote PI3K/AKT activation by facilitating PI3K recruitment by GAB1.

To further assess the impact of LS mutants on GAB1/PI3K interaction, we measured *in vitro* the catalytic activity of LS mutants on a synthetic phosphopeptide carrying one of GAB1 PI3K-binding sites (GAB1-pY589). To this end, we produced LS (Y279C, T468M, and Q510P) and NS (E76D, E139D, and N308D) mutants as purified recombinant proteins (Fig. 3D, left) to be used for *in vitro* PTP assays. The results (Fig. 3D, right) confirmed previous observations that LS mutants display extremely low enzymatic activity (15, 21, 40) when assayed using a standard PTP substrate (Src-pY530). In addition, similar results were obtained using a more specific SHP2 substrate (GAB1-pY589), suggesting that all LS mutants have similar biochemical features.

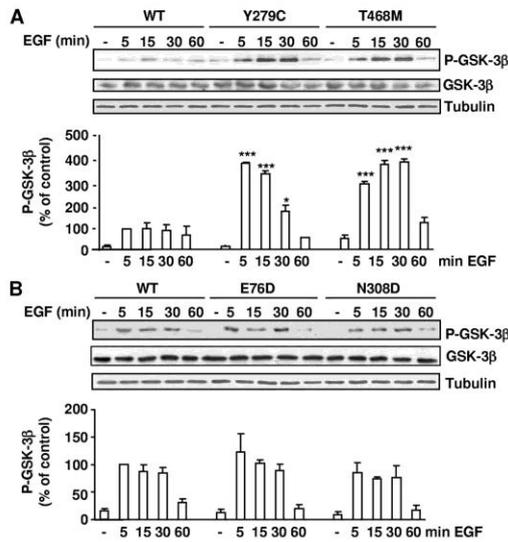


FIG. 4. LS fibroblasts display enhanced EGF-induced GSK-3 β phosphorylation. (A) (Top) Immortalized WT and LS (T468M or Y279C mutation) fibroblasts were stimulated with EGF and then processed for Western blot analysis and probed with anti-phospho-GSK-3 β (P-GSK-3 β), anti-total GSK-3 β , and antitubulin antibodies. (Bottom) P-GSK-3 β immunoblots were quantified using ImageJ. Only significant differences versus WT cells for the corresponding time are indicated (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; $n = 3$). The error bars indicate SEM. (B) The same experiment as shown in panel A with cells from WT or NS patients carrying the indicated *PTPN11* mutations.

Taken together, these results demonstrate that LS mutants promote GAB1/PI3K association as a consequence of impaired dephosphorylation of GAB1 PI3K-binding sites by these mutants. This explains why LS mutants exert a dominant-positive effect on EGF-induced PI3K/AKT activation.

LS mutants promote GSK-3 β phosphorylation in LS cells through a PI3K-dependent pathway. We then investigated which signaling pathways downstream of PI3K/AKT could be deregulated in LS. A good candidate was GSK-3 β , a multifunctional kinase involved in embryo development (12). To determine whether GSK-3 β was deregulated in LS, we measured GSK-3 β phosphorylation on Ser-9, a key regulatory residue which, when phosphorylated by AKT, represses GSK-3 β activity. EGF-induced GSK-3 β phosphorylation was significantly higher in LS fibroblasts than in control and NS cells (Fig. 4A and B). We then verified whether GSK-3 β hyperphosphorylation in LS cells was linked to PI3K/AKT upregulation. For this purpose, we treated LS cells with standard PI3K pharmacological inhibitors (LY294002 and wortmannin) before probing for GSK-3 β phosphorylation. As shown in Fig. 5A, this treatment virtually abolished the EGF-induced GSK-3 β hyperphosphorylation, while the Ras-MAPK inhibitor U0126 had only a minor effect. This result indicates that GSK-3 β hyperphosphorylation in LS is PI3K dependent, suggesting that

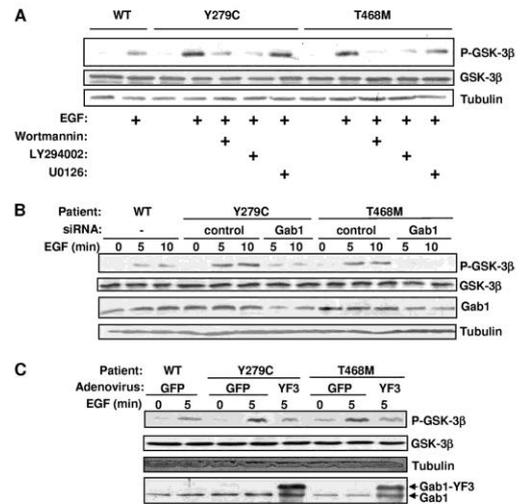


FIG. 5. LS mutants promote EGF-induced GSK-3 β phosphorylation through a PI3K- and GAB1-dependent pathway. (A) Immortalized skin fibroblasts from a healthy subject (WT) or LS patients carrying the indicated *PTPN11* mutations were treated or not with the indicated inhibitors for 30 min before stimulation with EGF, as shown. The cells were then lysed and processed for anti-P-GSK-3 β and anti-tubulin immunoblotting. (B) WT and LS fibroblasts were transfected with control or GAB1 siRNA, as indicated, before stimulation with EGF. The cells were then processed for Western blot analysis and probed with the indicated antibodies. (C) WT and LS cells were infected with adenoviruses encoding GAB1-YF3 or GFP as a control, as shown. Following stimulation with EGF, the cells were processed for Western blot analysis and probed with the indicated antibodies.

GSK-3 β deregulation in LS could be a consequence of PI3K/AKT upregulation.

To further test this hypothesis, we examined whether GAB1 was also implicated in GSK-3 β deregulation. Reduction of GAB1 expression by siRNA in LS fibroblasts suppressed GSK-3 β hyperphosphorylation (Fig. 5B). To further assess GAB1 involvement, we monitored GSK-3 β phosphorylation in LS cells infected with GAB1-YF3 adenoviruses. GAB1-YF3, but not GFP, overexpression resulted in the suppression of GSK-3 β hyperphosphorylation (Fig. 5C). Thus, disruption of GAB1 PI3K-binding sites prevents GSK-3 β hyperphosphorylation in LS cells, supporting the hypothesis that GSK-3 β deregulation is the result of GAB1-mediated PI3K/AKT upregulation.

LS mutant-dependent PI3K hyperactivation enhances myocardin/SRF activity. Previous reports had shown that GSK-3 β , among different targets, regulates myocardin, a transcriptional cofactor of the SRF (3, 20, 43). Therefore, we wondered whether LS-induced PI3K/GSK-3 β deregulation could affect myocardin activity. As a first attempt to test this hypothesis, we assessed whether LS or NS mutants of SHP2 could modulate myocardin activity. To this end, WT, LS, and NS fibroblasts were transfected with increasing amounts of myocardin before SRF activity was monitored. As shown in Fig. 6A, myocardin expression in patient fibroblasts induced a dose-response in-

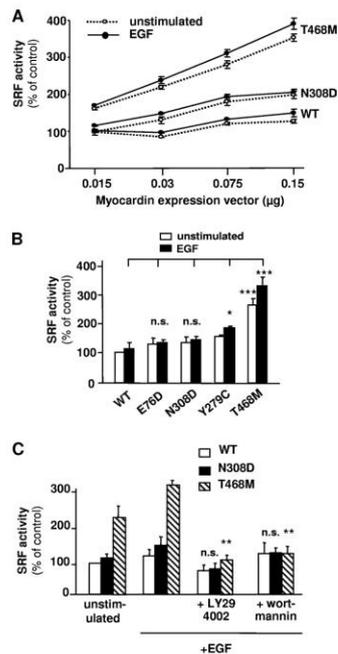


FIG. 6. LS mutations promote upregulation of SRF activity through a PI3K-dependent pathway. (A) SRF activity was measured using a luciferase gene reporter assay in LS (T468M), NS (N308D), and control (WT) fibroblasts in the presence of increasing concentrations of myocardin. The error bars indicate SEM. (B) The same experiment as shown in panel A performed with all available patient cell lines. Significant differences versus stimulated WT cells are indicated (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; n.s., not significant). (C) The same experiment as shown in panel A performed in the presence of the indicated inhibitors. **, $P < 0.01$; n.s., not significant. Significant differences versus corresponding cells, stimulated with EGF in the absence of inhibitor, are indicated.

crease in SRF activity. Interestingly, we observed a stronger response in T468M LS cells than in WT or N308D NS cells (Fig. 6A). We next compared SRF activities in fibroblasts from all available patients and confirmed that EGF-induced SRF activity was significantly higher in the two LS cell lines than in cells from NS patients or healthy controls (Fig. 6B). Of note, SRF activity in the unstimulated and EGF-stimulated states was higher in the LS cells, particularly the T468M mutant. The fact that SRF deregulation appeared stronger in T468M than in Y279C fibroblasts is probably a consequence of a more robust AKT deregulation in T468M than in Y279C fibroblasts (Fig. 1B). We then assessed whether the increased SRF/myocardin activity in LS fibroblasts was mediated by PI3K upregulation. PI3K inhibition by LY294002 or wortmannin abolished the myocardin-dependent SRF stimulation observed in the T468M LS cell line (Fig. 6C). Consequently, these data suggest that LS-induced PI3K upregulation can enhance SRF/myocardin activity in a reconstituted model.

LS mutant-induced PI3K upregulation promotes hypertrophic growth in chicken embryo explants and ANF expression in cultured cardiomyocytes. Since GSK-3 β activity/activation and subsequent inhibition of myocardin-dependent transcriptional transactivating activity may be involved in reduced cardiomyocyte hypertrophy (3), we hypothesized that LS mutants could promote hypertrophy in a PI3K-dependent manner. In human primary cells derived from adult heart ventricles, we observed that LS, but not NS, mutants induced AKT and GSK-3 β hyperphosphorylation (data not shown), suggesting that LS mutants can cause deregulation of the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in cardiac cells. Next, we analyzed the effect of LS mutations on the size of primary cells derived from chicken embryo myocardial cushions following adenoviral infection of the most "signal-altering" LS mutant (SHP2-T468M) in the tissue. After stimulation with EGF, explants were dissociated, and the sizes of individual cells were assessed by FACS analysis. Interestingly, the size of cells expressing the LS mutant SHP2-T468M was increased in comparison with cells infected with WT SHP2. Moreover, following PI3K inhibition with LY294002 (LY), the most stable and the least toxic of the two PI3K inhibitors, the shift of cell size induced by the LS mutant was abolished (Fig. 7A). Of note, under those experimental settings, the size of noninfected, GFP-negative cells was not significantly modified by LY294002 treatment (data not shown). This signifies that the cell size enlargement in tissue infected with the LS mutant was dependent on PI3K.

Finally, we evaluated whether LS-induced deregulation of the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway was associated with cardiomyocyte hypertrophy. Reexpression of embryonic genes, including ANF, and transient activation of immediate-early genes are frequently used as markers of myocyte hypertrophy. Therefore, to test whether LS mutants could induce cardiomyocyte hypertrophy, we overexpressed SHP2-WT, N308D, or T468M in neonatal rat ventricular myocytes, and we studied their impacts on ANF expression using a luciferase gene reporter assay. SHP2-T468M induced a stronger ANF-luciferase response than WT SHP2 or the NS mutant SHP2-N308D (Fig. 7B). This higher ANF transcriptional activity was abolished by LY294002, suggesting that LS mutants could promote cardiomyocyte hypertrophy through PI3K upregulation.

DISCUSSION

In this study, we analyzed the effect of SHP2 mutations identified in LS patients on the PI3K/AKT pathway. Upon EGF induction, AKT was hyperphosphorylated both in LS fibroblasts and in HEK293 cells overexpressing the corresponding LS mutants. We then analyzed in detail the mechanism of PI3K/AKT upregulation by LS mutants and obtained the following data: (i) reducing GAB1 expression using siRNA prevents PI3K/AKT upregulation in LS patient cells, (ii) adenovirus-driven expression of GAB1-YF3 (deficient for PI3K binding) suppresses AKT upregulation in LS cells, (iii) the amount of GAB1/PI3K complex is higher in LS cells than in cells from healthy subjects or NS cells, and (iv) recombinant LS SHP2 mutants are particularly inactive in dephosphorylating a peptide carrying a GAB1 PI3K-binding site, whereas WT SHP2 or NS mutants dephosphorylate this peptide more efficiently than a standard PTP substrate. All these observations

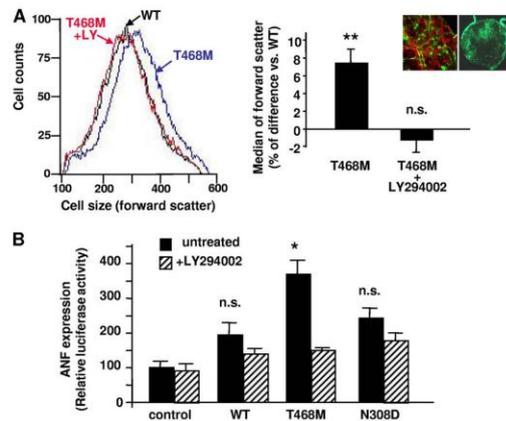


FIG. 7. An LS mutant enhances ANF expression and promotes cardiac cell hypertrophy through a PI3K-dependent pathway. (A) Myocardial cushions from chicken embryos were infected with adenoviruses expressing GFP and a SHP2-WT, or -T468M mutant. After stimulation with EGF, the sizes of cushion cells were measured by FACS. (Left) FACS profile from a representative experiment. (Right) Medians of FACS profiles from 3 different experiments. The error bars indicate SEM. (Inset) Confocal images of GFP and rhodamin-phalloidin staining showing tissue integrity at the end of the experiment (left) and GFP staining of a whole cushion infected with SHP2-WT adenoviruses (right). (B) Neonatal rat cardiomyocytes were cotransfected with the indicated SHP2 construct (WT, N308D, or T468M) and a luciferase (Luc) construct under the control of the ANF promoter. Two days after transfection, the cells were assayed for Luc activity. When indicated, the cells were treated, before the Luc assay, overnight with LY294002 (control, cotransfection of ANF-Luc and empty vector). The graphs are presented as the mean and SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. In panel A, significant differences versus stimulated WT cells are indicated. In panel B, significant differences versus the untreated control are indicated. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; n.s., not significant.)

indicate that LS mutants cannot efficiently dephosphorylate GAB1 PI3K-binding sites. This defect in SHP2 catalytic activity leads to the upregulation of PI3K/AKT observed in LS cells.

The fact that SHP2-LS mutants have a stimulatory effect on PI3K/AKT in transfected cells and patient fibroblasts is probably the consequence of a dominant-positive effect of these mutants on EGF-induced PI3K/AKT stimulation. In transfected cells, this is certainly due to the recruitment into signaling complexes of transfected SHP2 mutants in lieu of endogenous WT SHP2. Indeed, those mutants possess all the functional domains to be recruited in signaling complexes (SH2 domains and phosphorylation sites). Therefore, it is likely that the mutants compete with endogenous SHP2 for SHP2-binding sites, and since they are overexpressed by transfection, they substitute for endogenous SHP2. As they carry a point mutation that alters their catalytic activity, they cannot complement endogenous SHP2 function, i.e., downregulation of EGF-induced AKT activation. Thus, substitution of endogenous SHP2 by inactive LS mutants in signaling complexes results in AKT upregulation.

In the case of patient cells, SHP2 produced from the mutated allele is not overexpressed compared to SHP2 produced

from the WT allele, and the two forms of protein are probably equimolar. Therefore, while in healthy subjects signaling complexes contain 100% WT SHP2, in patient cells, the signaling complexes are composed of 50% WT SHP2 and 50% mutated SHP2. In the case of LS mutants, this is apparently enough to alter SHP2-dependent AKT activation. Of note, in the case of NS patients, others have concluded that NS mutations exert a dominant-positive effect on Ras/MAPK activation through a similar mechanism, considering that WT SHP2 promotes Ras/MAPK activation and that catalytically hyperactive SHP2 NS mutants seem to hyperactivate Ras/MAPK (2, 11).

In a former study, one (T468M) out of three tested LS mutants appeared somewhat able to dephosphorylate a GAB1 phosphopeptide in an *in vitro* assay, even though this mutant, like the others, was deficient in its catalytic activity on a standard phosphatase substrate (15). To clarify this point, in the current work, we produced LS mutants as purified recombinant proteins. This allowed us to perform a study of these mutants' catalytic activities that was more thorough and reliable than what has been achieved thus far. The results (Fig. 3D) showed that the three LS mutants were equally defective in dephosphorylating GAB1, which does not confirm that the T468M mutant behaves differently from other LS mutants.

In addition, our previous study suggested that the T468M mutant, when overexpressed in Vero cells, retained some phosphatase activity toward the PI3K-binding sites borne by GAB1, whereas the Y279C mutant did not. In contrast, in the current study, when transfected in a more standard cell line for signaling studies (HEK293), the T468M and Y279C mutants behaved similarly. More importantly, both mutants displayed the same dominant-positive effect in patient cells, with the T468M mutant being even stronger than the Y279C mutant. The lack of effect of T468M in Vero cells is likely not due to the level of mutant overexpression, since we could observe the dominant-positive effect of the T468M mutant in patient cells that did not overexpress the mutant. Thus, one may assume that the mutations can have different "biological penetrance" in a given cell type, depending, possibly, on the expression level of the binding partners or on the level of stimulation. Supporting this view is a report showing that an NS-causing SHP2 mutation has differential effects on an intracellular signaling pathway when different cell types carrying the mutation are considered (2).

Different mechanisms can be imagined to explain PI3K/AKT upregulation (increased adapter phosphorylation, Ras-mediated hyperactivation of PI3K, increased ErbB3 phosphorylation, decreased PTEN activity, etc.). In this study, we used siRNA targeting GAB1 as a first approach to determine whether this adapter protein was involved in PI3K/AKT upregulation. The fact that GAB1 siRNA suppressed PI3K/AKT upregulation suggested that GAB1 was involved in the process. Then, we explored in detail the role of GAB1, by using the GAB1-YF3 mutant and by analyzing GAB1/PI3K association. The results of these experiments clearly supported the view that increased PI3K recruitment on GAB1 was an important cause of PI3K/AKT upregulation. However, this does not exclude the possibility that future studies could identify other mechanisms also participating in LS-associated PI3K/AKT downregulation, notably those involving Ras, which is most likely deregulated in LS.

Our study also revealed that the phosphorylation of GSK-3 β on Ser-9, a major regulatory site, is enhanced in LS fibroblasts. This is certainly a consequence of PI3K/AKT upregulation in LS cells, as this site is a well-established phosphorylation target of AKT (12). Supporting this view is our observation that in LS cells, Ser-9 phosphorylation showed a requirement for PI3K or GAB1 (Fig. 5). Interestingly, GSK-3 β is a multifunctional kinase with key functions during embryo development (12). Consequently, it will be interesting to examine whether GSK-3 β deregulation is associated with LS symptoms, and notably hypertrophic cardiomyopathy, considering that cardiomyocyte hypertrophy can involve GSK-3 β (20). Nevertheless, deregulated pathways distinct from PI3K/AKT/GSK-3 β certainly participate in this cardiopathy, as shown by a recent report involving Raf1 gain-of-function in NS or LS patients with hypertrophic cardiomyopathy (32).

Taking into consideration that catalytically inactive LS mutants promote PI3K/AKT upregulation through impaired GAB1 dephosphorylation, one may wonder why hyperactive NS mutants did not downregulate PI3K/AKT, since they seemed to facilitate GAB1 dephosphorylation. A possible explanation could be linked to the gain-of-function effects of NS mutants on Ras/MAPK (13). Indeed, it is now well established that, at least in the case of oncogenic Ras mutants, activated Ras stimulates PI3K through direct interaction (33). In the case of NS mutants, increased Ras activity should lead to higher-than-normal PI3K activation, which could compensate for the inhibitory effect on PI3K due to GAB1 dephosphorylation. Specific studies will be needed to solve this issue, as PI3K activation is a very dynamic process. Indeed, the possibility that NS mutants alter this signaling pathway under particular conditions not tested in our study cannot be excluded.

In conclusion, this report shows that LS-causing *PTPN11* mutations cause abnormal upregulation of the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. In light of these findings, it will be interesting to examine whether this pathway deregulation is involved in the development of LS symptoms. The relevance of this research is reinforced by recent reports suggesting that, in addition to Ras-MAPK signaling defects, PI3K-dependent pathways could be altered in other NCFC syndromes (8, 35).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (Programme Maladies Rares), Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer (sections Aude, Haute-Garonne, Tarn, and Tarn-et-Garonne), E-Rare (NS-EuroNet), and Fondation pour la Recherche Médicale.

We are grateful to T. Levade for cell line immortalization. We thank E. Olson, R. Hipskind, S. Roche, C. Racaud-Sultan, and B. Mariamé for reagents; E. Agius for valuable assistance in organotypic culture; M. Mus, A. Bros, and N. Malet for valuable technical help; A. Montagner and M. Dance for helpful discussions; and F. L'Paqhi and V. Duplan-Eche for FACS analysis.

REFERENCES

- Araki, T., G. Chan, S. Newbigging, L. Morikawa, R. T. Bronson, and B. G. Neel. 2009. Noonan syndrome cardiac defects are caused by *PTPN11* acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:4736-4741.
- Araki, T., M. G. Mohi, F. A. Ismat, R. T. Bronson, I. R. Williams, J. L. Kutok, W. Yang, L. I. Pao, D. G. Gilliland, J. A. Epstein, and B. G. Neel. 2004. Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of *Ptpn11* mutation. *Nat. Med.* 10:849-857.
- Badorf, C., F. H. Seeger, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2005. Glycogen synthase kinase 3 β inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation. *Circ. Res.* 97:645-654.
- Bentires-Alj, M., M. I. Kontaridis, and B. G. Neel. 2006. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat. Med.* 12:283-285.
- Chatelut, M., K. Harzer, H. Christomanou, J. Feunteun, M. T. Pieraggi, B. C. Paton, Y. Kishimoto, J. S. O'Brien, J. P. Basile, J. C. Thiers, R. Salvayre, and T. Levade. 1997. Model SV40-transformed fibroblast lines for metabolic studies of human prosaposin and acid ceramidase deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 262:61-76.
- Cordeddu, V., E. Di Schiavi, L. A. Pennacchio, A. Ma'ayan, A. Sarkozy, V. Fodale, S. Cecchetti, A. Cardinale, J. Martin, W. Schackwitz, A. Lipzen, G. Zampino, L. Mazzanti, M. C. Digilio, S. Martinelli, E. Flex, F. Lepri, D. Bartholdi, K. Kutsche, G. B. Ferrero, C. Anichini, A. Sclicorni, C. Rossi, R. Tenconi, M. Zenker, D. Merlo, B. Dallapiccola, R. Iyengar, P. Bazzicalupo, B. D. Gelb, and M. Tartaglia. 2009. Mutation of *SHOC2* promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat. Genet.* 41:1022-1026.
- Dance, M., A. Montagner, A. Yart, B. Masri, Y. Audigier, B. Perret, J. P. Salles, and P. Raynal. 2006. The adaptor protein GAB1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 281:23285-23295.
- Dasgupta, B., Y. Yi, D. Y. Chen, J. D. Weber, and D. H. Gutmann. 2005. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res.* 65:2755-2760.
- Eminaga, S., and A. M. Bennett. 2008. Noonan syndrome-associated SHP-2/*PTPN11* mutants enhance SIRP α and PZR tyrosyl phosphorylation and promote adhesion-mediated ERK activation. *J. Biol. Chem.* 283:15328-15338.
- Engelman, J. A., J. Luo, and L. C. Cantley. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7:606-619.
- Fragale, A., M. Tartaglia, J. Wu, and B. D. Gelb. 2004. Noonan syndrome-associated SHP-2/*PTPN11* mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation. *Hum. Mutat.* 23:267-277.
- Frame, S., and P. Cohen. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359:1-16.
- Gelb, B. D., and M. Tartaglia. 2006. Noonan syndrome and related disorders: Dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. *Hum. Mol. Genet.* 15(Spec. 2):R220-R226.
- Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga, K. Matsumoto, and E. Nishida. 2004. SHP-2, an SH2-containing protein tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor sprouty. *J. Biol. Chem.* 279:22992-22995.
- Hanna, N., A. Montagner, W. H. Lee, M. Miteva, M. Vidal, M. Vidaud, B. Parfait, and P. Raynal. 2006. Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: consequences for PI3K binding on GAB1. *FEBS Lett.* 580:2477-2482.
- He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:2509-2514.
- Jopling, C., D. van Geemen, and J. den Hertog. 2007. SHP2 knockdown and Noonan/LEOPARD mutant SHP2-induced gastrulation defects. *PLoS Genet.* 3:e225.
- Katso, R., K. Okkenhang, K. Ahmadi, S. White, J. Timms, and M. D. Waterfield. 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615-675.
- Keilback, H., F. S. David, M. McGregor, L. C. Cantley, and B. G. Neel. 2005. Diverse biochemical properties of SHP2 mutants. Implications for disease phenotypes. *J. Biol. Chem.* 280:30984-30993.
- Kerkela, R., K. Woulfe, and T. Forre. 2007. Glycogen synthase kinase-3 β : Actively inhibiting hypertrophy. *Trends Cardiovasc. Med.* 17:91-96.
- Kontaridis, M., L. K. D. Swanson, F. S. David, D. Barford, and B. G. Neel. 2006. *PTPN11* (SHP2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J. Biol. Chem.* 281:6785-6792.
- Krenz, M., J. Gulick, H. E. Osinska, M. C. Colbert, J. D. Molkentin, and J. Robbins. 2008. Role of ERK1/2 signaling in congenital valve malformations in Noonan syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:18930-18935.
- Krenz, M., K. E. Yutzy, and J. Robbins. 2005. Noonan syndrome mutation Q79R in SHP2 increases proliferation of valve primordial mesenchymal cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling. *Circ. Res.* 97:813-820.
- Mattoon, D. R., B. Lamothe, I. Lax, and J. Schlessinger. 2004. The docking protein GAB1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/AKT cell survival pathway. *BMC Biol.* 2:24.
- Mekki-Dauriac, S., E. Agius, P. Kan, and P. Cocharde. 2002. Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development* 129:5117-5130.
- Metrich, M., A. Lucas, M. Gastineau, J. L. Samuël, C. Heymes, E. Morel, and F. Lezoualc'h. 2008. Epcac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 102:959-965.

27. Montagner, A., A. Yart, M. Dance, B. Perret, J. P. Salles, and P. Raynal. 2005. A novel role for GAB1 and SHP2 in EGF-induced Ras activation. *J. Biol. Chem.* 280:5350-5360.
28. Morel, E., A. Marcontani, M. Gastineau, R. Birkedal, F. Rochais, A. Garnier, A. M. Lompre, G. Vandecasteele, and F. Lezoualc'h. 2005. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 97:1296-1304.
29. Nakamura, T., M. Colbert, M. Krenz, J. D. Molkeni, H. S. Hahn, G. W. Dorn II, and J. Robbins. 2007. Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *J. Clin. Invest.* 117:2123-2132.
30. Nissen, L. J., J. C. Gelly, and R. A. Hipskind. 2001. Induction-independent recruitment of CREB-binding protein to the c-fos serum response element through interactions between the bromodomain and Elk-1. *J. Biol. Chem.* 276:5213-5221.
31. Oishi, K., H. Zhang, W. J. Gault, C. J. Wang, C. C. Tan, I. K. Kim, H. Ying, T. Rahman, N. Pica, M. Tartaglia, M. Mlodzik, and B. D. Gelb. 2009. Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 have gain-of-function effects during *Drosophila* development. *Hum. Mol. Genet.* 18:193-201.
32. Pandit, B., A. Sarkozy, L. A. Pennacchio, C. Carta, K. Oishi, S. Martinelli, E. A. Pogna, W. Schackwitz, A. Ustaszewska, A. Landstrom, J. M. Bos, S. R. Omnen, G. Esposito, F. Lepri, C. Faul, P. Mundel, J. P. Lopez-Sigüero, R. Tenconi, A. Selicorni, C. Rossi, L. Mazzanti, I. Torrente, B. Marino, M. C. Digilio, G. Zampino, M. J. Ackerman, B. Dallapiccola, M. Tartaglia, and B. D. Gelb. 2007. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.* 39:1007-1012.
33. Ramjann, A. R., and J. Downward. 2007. Ras and phosphoinositide 3-kinase: partners in development and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6:2902-2905.
34. Roberts, A. E., T. Araki, K. D. Swanson, K. T. Montgomery, T. A. Schiripo, V. A. Joshi, L. Li, Y. Yassin, A. M. Tamburino, B. G. Neel, and R. S. Kucherlapati. 2007. Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 39:70-74.
35. Rosenberger, G., S. Meien, and K. Kutsche. 2009. Oncogenic HRAS mutations cause prolonged PI3K signaling in response to epidermal growth factor in fibroblasts of patients with Costello syndrome. *Hum. Mutat.* 30:352-362.
36. Sampaio, C., M. Dance, A. Montagner, T. Edouard, N. Malet, B. Perret, A. Yart, J. P. Salles, and P. Raynal. 2008. Signal Strength Dictates PI3K contribution to Ras/ERK1-2 activation via differential GAB1/SHP2 recruitment: consequences for resistance to EGFR inhibition. *Mol. Cell Biol.* 28:587-600.
37. Sarkozy, A., C. Carta, S. Moretti, G. Zampino, M. C. Digilio, F. Pantaleoni, A. P. Scioletti, G. Esposito, V. Cordeddu, F. Lepri, V. Petrangeli, M. L. Dentici, G. M. Mancini, A. Selicorni, C. Rossi, L. Mazzanti, B. Marino, G. B. Ferrero, M. C. Silengo, L. Memo, F. Stanzial, F. Faravelli, L. Stuppia, E. Puxeddu, B. D. Gelb, B. Dallapiccola, and M. Tartaglia. 2009. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 30:695-702.
38. Schubbert, S., M. Zenker, S. L. Rowe, S. Boll, C. Klein, G. Bollag, I. van der Burgt, L. Musante, V. Kalscheuer, L. E. Wehner, H. Nguyen, B. West, K. Y. Zhang, E. Sistermans, A. Rauch, C. M. Niemeyer, K. Shannon, and C. P. Kratz. 2006. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 38:331-336.
39. Shi, Z. Q., D. H. Yu, M. Park, M. Marshall, and G. S. Feng. 2000. Molecular mechanisms for the SHP-2 tyrosine function in promoting growth factor stimulation of ERK activity. *Mol. Cell Biol.* 20:1526-1536.
40. Tartaglia, M., S. Martinelli, L. Stella, G. Bocchini, E. Flex, V. Cordeddu, G. Zampino, I. Burgt, A. Palleschi, T. C. Petrucci, M. Sorcini, C. Schoch, R. Foa, P. D. Emanuel, and B. D. Gelb. 2006. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am. J. Hum. Genet.* 78:279-290.
41. Tartaglia, M., L. A. Pennacchio, C. Zhao, K. K. Yadav, V. Fodale, A. Sarkozy, B. Pandit, K. Oishi, S. Martinelli, W. Schackwitz, A. Ustaszewska, J. Martin, J. Bristow, C. Carta, F. Lepri, C. Neri, I. Vasta, K. Gibson, C. J. Curry, J. P. Sigüero, M. C. Digilio, G. Zampino, B. Dallapiccola, D. Barsagi, and B. D. Gelb. 2007. Gain-of-function *SOS1* mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 39:75-79.
42. Uhlen, P., P. M. Burch, C. I. Zito, M. Estrada, B. E. Ehrlich, and A. M. Bennett. 2006. Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/PTPN11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:2160-2165.
43. Wang, D., P. S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J. A. Richardson, E. Small, P. A. Krieg, and E. N. Olson. 2001. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105:851-862.
44. Wang, S., W. M. Yu, W. Zhang, K. R. McCrae, B. G. Neel, and C. K. Qu. 2009. Noonan syndrome/leukemia-associated gain-of-function mutations in SHP-2 phosphatase (PTPN11) enhance cell migration and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 284:913-920.
45. Wollert, K. C., T. Taga, M. Saito, M. Narazaki, T. Kishimoto, C. C. Glennbetski, A. B. Vernallis, J. K. Heath, D. Pennica, W. I. Wood, and K. R. Chien. 1996. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 271:9535-9545.
46. Zhang, S. Q., W. G. Tsiras, T. Araki, G. Wen, L. Minichiello, R. Klein, and B. G. Neel. 2002. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase SHP2. *Mol. Cell Biol.* 22:4062-4072.
47. Zhang, S. Q., W. Yang, M. I. Kontaridis, T. G. Bivona, G. Wen, T. Araki, J. Luo, J. A. Thompson, B. L. Schraven, M. R. Philips, and B. G. Neel. 2004. SHP2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol. Cell* 13:341-355.