



Royaume du Maroc المملكة المغربية

كلية الطب والصيدلة
+٠٤٤٧٧٠١+ | +٠١٤٢٢٢٤+ Λ +٠٥٠٥٧٠+
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ETUDE MOLECULAIRE DU SYNDROME DE NOONAN : A PROPOS D'UNE SERIE DE 10 CAS

Docteur QEBIBO LEILA
Née le 28/03/1986 à MEKNES

Pour l'obtention du diplôme de spécialité en médecine
Option : Génétique Médicale

Rapporteur : Pr BOUGUENOUCHE LAILA

Sous la direction de : Pr OULDIM KARIM

Session Mai 2019

Remerciements

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

Au Pr Ouldin Karim,

Pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour tous les efforts fournis tout au long de ma formation.

Au Pr Bouguenouch Laila,

Pour ton soutien et ton aide durant ces quatre années et pour tes efforts continus afin de porter plus haut le laboratoire de génétique de Fès

A tous nos maitres de la faculté de médecine de Fès et des différents services hospitaliers en France,

Je vous reste à jamais reconnaissante, sincèrement respectueuse et toujours disciple dévouée.

Au personnel de l'unité de génétique et d'oncogénétique de Fès, à mes co-résidents, ainsi qu'aux doctorants, pour leur aide, encadrement et collaboration durant ces années de résidanat pendant lesquels nous avons partagé des moments de joie et de tristesse et nous nous sommes liés d'une véritable amitié

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS:	5
LISTE DES FIGURES :	9
INTRODUCTION.....	11
MATERIEL & METHODE.....	16
I. Extraction d'ADN.....	18
1. Extraction saline	18
2. Extraction d'ADN par Kit (Invitrogen)	19
II. Dosage de la concentration d'ADN	22
III. Amplification des régions cibles	22
IV. Séquençage des régions cibles	24
V. Caractérisation bio-informatique.....	26
1. Alignement des séquences	26
2. Annotation des variants.....	27
RESULTAT & DISCUSSION	30
I. Résultats.....	31
1. Données épidémiologiques	31
2. Données cliniques	32
3. Données moléculaires	34
II. Discussion	42
1. Clinique	42
2. Analyse des variants.....	54
3. Corrélation génotype-phénotype	59

4. Prise en charge	61
5. Conseil génétique.....	70
CONCLUSION	71
BIBLIOGRAPHIES	73
RESUME	78

Liste des abréviations:

A	Adénine
ACMG	American College of medical genetics
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ala	Alanine
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Acide asparatique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
C	Cytosine
C°	Degré Celsius
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
CCDS	Consensus codingsequence
CHU	Centre hospitalier universitaire
CIA	Communication inter-auriculaire
CPK	Créatine phosphokinase
C-SH2	C-amino terminal src-homology 2
Cys	Cystéine
DANN	Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks
ddATP	Didésoxyadenosine triphosphate
ddCTP	Didésoxycytidine triphosphate
ddGTP	Didésoxyguanosine triphosphate

ddTTP	Didésoxythymidine triphosphate
dNTP	Didésoxynucléotide triphosphate
EDTA	Ethylene diaminetriacetic acid
EMA	Européen medical association
FDA	Food and drug administration
G	Guanine
g	Gramme
GERP	Genomic Evolutionary Rate Profiling
GH	Growth hormone
Gln	Glutamine
Glu	Acide Glutamique
Gly	Glycine
GRC	Genome Reference Consortium
Hg19	Human genome 19
HGVS	Human genome variation society
IGF1	Insulin-like growth factor-1
IGF-BP3	Insulin-like growth factor- Binding Protein-3
IRM	Imagerie par raisonnance magnétique
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LZTR1	Leucine-zipper-like transcription regulator 1
Lys	Lysine
MEK1	Mitogen-activated protein kinase 1
Met	Methionine
Mg	Miligrame
MgCl2	Chlorure de magnésium

MI	Millimètre
Mm	Milimolaire
Mn	Minute
NaCL	Chlorure de sodium
NCBI	National center for biotechnology information
NRAS	Neuroblastoma ras viral
NS	Noonan syndrome
N-SH2	N- amino terminal src-homology 2
OMIM	Online mendelian inheritance in man
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
Polyphen2	Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
PTP	Protein-tyrosine phosphatase
PTPN11	Protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
QI	Quotient intellectuel
RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homolog
Ras-MAPK	Rat sarcoma viral oncogene homolog/mitogen-activated protein kinases
RGO	Reflux gastro-oesophagien
RIT1	Ric-like protein without caax motif 1
RPM	Roation par minute
Ser	Serine
SHOC2	Soc-2 suppressor of clear homolog (C.elegans)

SHP2	Src homology phosphatase 2
SIFT	Sorting tolerant from intolerant algorithm
SLB	Solution de lyse des globules blancs
SOS1	Son of sevenless homolog 1
SOS2	Son of sevenless homolog 2
T	Thymine
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris borate EDTA buffer
TCA	Temps de céphaline activé
TE	Tris-EDTA
TP	Temps de prothrombine
TSH	Thyroid simulating hormone
Tyr	Tyrosine
UV	Ultraviolet
Val	Valine

Liste des figures :

FIGURE 1 : Distribution des variants pathogenes ou probablement pathogenes rapportes dans clinvar sur les différents domaines du gene <i>PTPN11</i> (Pecan)	13
FIGURE 2 : Cascade moleculaire de la voie de signalisation ras-mapk et differents syndromes du spectre des rasopathies	15
FIGURE 3: Séquences des amorces des exons 2, 3, 4, 7, 8, 12, 13 utilises pour la PCR-sequençage	23
FIGURE 4 : Conditions réaction de PCR et programme thermocycleur ...	23
FIGURE 5 : Réaction de sequence et programme de purification.....	25
FIGURE 6 : Taux diagnostic du syndrome de Noonan a l'unité de génétique médicale du CHU Hassan II de Fes	31
FIGURE 7 : Distribution des signes cliniques observés de notre cohorte	32
FIGURE 8 : Fréquence des différentes atteintes cardiaques dans notre cohorte.....	32
FIGURE 9 : Description clinique et moleculaire des differents patients inclut dans notre cohorte:	33
FIGURE 10 : Dysmorphologie du syndrome Noonan :du nourrisson a l'âge adulte.....	43

FIGURE 11 : Caractérisation des traits dysmorphologique du syndrome de Noonan a partir d'un patient de notre cohorte43

FIGURE 12 : Patients Noonan porteurs de mutation *PTPN11* des premiers mois de vie jusqu'a l'age adulte44

FIGURE 13 : Pectus excavatum51

FIGURE 14 : Ecchymoses et excès de peau acral.....52

FIGURE 15 : Organisation de l'adn codant du gene *PTPN11*et de la structure proteique de SHP255

FIGURE 16 : Récapitulatif de l'analyse moleculaire et bio-informatique des variants de nos patients55

FIGURE 17 : Activation de la proteine SHP2 et changement de conformation57

FIGURE 18 : Modelisation de la proteine shp2 avec les differents domaines N-SH2/C-SH2 et PTP et distribution des variants trouvés chez notre cohorte.....58

FIGURE 19 ET 20 : Modélisation 3d de la proteine SHP2 avec les variants de notre cohorte58

FIGURE 21 : Correlation phénotype-génotype a partir des données des patients de notre cohorte59

INTRODUCTION

Le syndrome de Noonan est l'un des maladies mendéliennes du développement les plus rapportées dans la littérature et les plus fréquemment rencontrées en consultation de génétique avec une incidence évaluée de 1/1000 à 1/2500. Il a été décrit cliniquement pour la 1^{ère} fois en 1962, par Jacqueline Noonan, cardiopédiatre, qui rapporte une série de 9 patients ayant en commun une dysmorphologie et une sténose pulmonaire¹, et ce n'est qu'en 2001 que ce syndrome a été rattaché sur le plan moléculaire par Tartaglia et al au gène *PTPN11* (Protein-Tyrosine-Phosphatase Non Receptor type 11)(OMIM 176876) situé au locus chromosomique 12q24.1². Ce gène code pour la protéine « Src-homology 2 (SH2) domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) », à expression ubiquitaire³. Cette protéine cytoplasmique joue un rôle essentiel dans l'activation de la transduction de signal à travers la cascade moléculaire de la voie de signalisation Ras-MAPK et contrôle ainsi plusieurs processus développementaux puisqu'elle interfère avec des facteurs de croissance extracellulaire par le biais d'un récepteur membranaire à tyrosine kinase pour le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire, sa migration et sa survie⁴. Le gène *PTPN11* semblait alors un excellent gène candidat⁴.

La protéine SHP-2 est constituée de 3 domaines protéiques, à savoir les domaines N-SH2 (amino-terminal SRC-homology 2) et C-SH2 (Carboxy-terminal srhomology 2) qui se suivent en tandem et qui sont impliqués dans l'autorégulation de l'activité de SHP-2 suivi du domaine catalytique PTP (protein-tyrosine phosphatase) responsable de l'activité phospho-tyrosine phosphatase puis une queue C-terminal sans fonction précise connue⁴⁵. Les variants rapportés par Clinvar à ce jour sur *PTPN11* forment des clusters essentiellement au niveau et autour des domaines N-terminal et Phosphotyrosine phosphatase de la protéine SHP2 qui sont impliqués dans le switch conformation active/inactive de la

protéine^{6,7}(Fig. 1). Sa conformation inactive est stabilisée par un large réseau de ligand qui interagit avec les acides aminés situés au niveau de l'interface N-SH2/PTP⁷.La majorité des variants responsables du syndrome de Noonan sont des faux sens avec « gain de fonction » sur *PTPN11*, c'est-à-dire à effet activateur protéique⁴

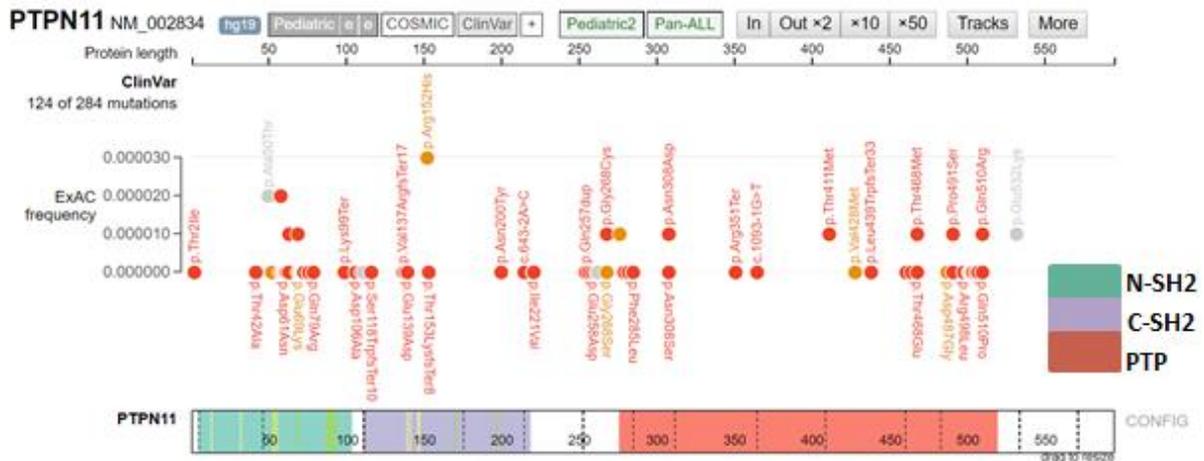


Figure 1 : Distribution des variants pathogènes ou probablement pathogènes rapportés dans Clinvar sur les différents domaines du gène *PTPN11*(PECAN)

Le syndrome de Noonan est assez facilement reconnu en consultation de génétique de par sa dysmorphologie caractéristique et ses signes cliniques incluant une cardiopathie faite typiquement d'une sténose pulmonaire supra-valvulaire(65–80%), un retard de croissance léger à modéré(50%), des difficultés d'apprentissages et des acquisitions, une déficience intellectuelle peu présente (20%), et une cryptorchidie unie ou bilatérale assez commune (60%)⁸. Il présente une pénétrance complète mais une variabilité d'expression est observée⁹.

Il fait partie du spectre clinique des « Rasopathies » incluant plusieurs autres variétés neurodéveloppementales syndromiques ayant en commun une variation pathogène des gènes de la voie de signalisation Ras MAP-kinase et qui sont : Le syndrome LEOPARD (OMIM 151100), Syndrome COSTELLO(OMIM 218040), Le

syndrome cardiofaciocutanée (CFC) (OMIM 115150), Le syndrome Noonan-like (OMIM607721), Syndrome Legius (OMIM 611431), et la Neurofibromatose de type 1 (OMIM 162200). Ces différents syndromes ont des manifestations cliniques chevauchantes et une expressivité variable rendant leur diagnostic assez difficile, et ceci est dû à leur grande hétérogénéité génétique : des variations dans le même gène peuvent donner des tableaux cliniques différents, et chaque syndrome de ce spectre peut être dû à des variations dans plusieurs gènes. (Fig.2)

A ce jour, les variants identifiés responsables du syndrome de Noonan sont portés par les gènes : *PTPN11* (OMIM 176876), *SOS1* (OMIM 182530), *RAF1* (OMIM 164760), *KRAS*

(OMIM 190070), *NRAS* (OMIM 164790), *RIT1* (OMIM 609591), *SOS2* (OMIM 601247), *SHOC2* (OMIM 602775), *CBL* (OMIM 165360) et *LZTR1* (OMIM 600574) avec une prédominance du gène *PTPN11* comptant près de 50% à 60% des variations identifiées^{10,11}

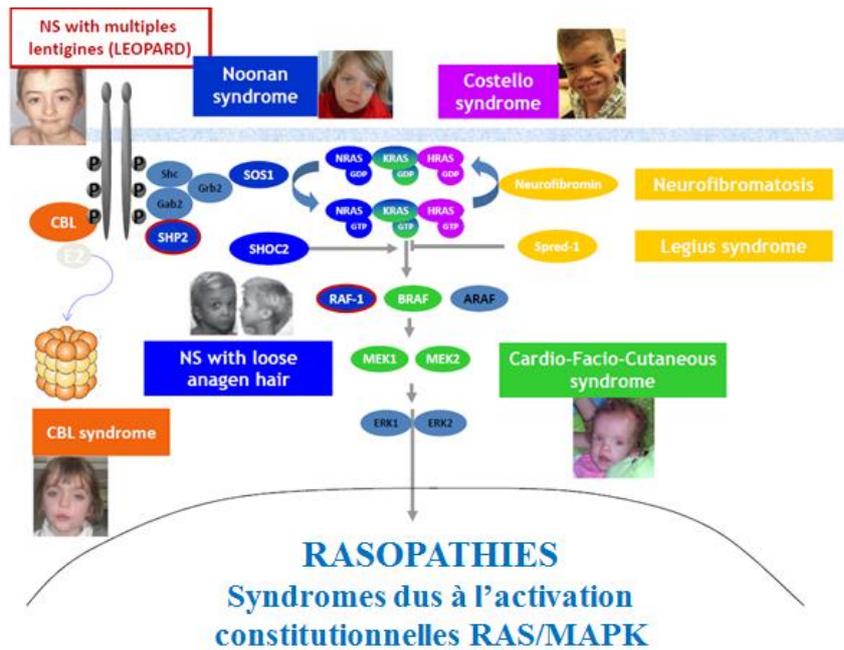


Figure 2 : Cascade moléculaire de la voie de signalisation Ras–MAPK et différents syndromes du spectre des rasopathies 11

Nous rapportons dans ce travail, la plus large série de patients marocains atteints du syndrome de Noonan et qui ont bénéficié du séquençage classique Sanger du gène *PTPN11*, principal gène du syndrome de Noonan, à l'unité de génétique et d'oncogénétique du Centre hospitalier–universitaire Hassan II de Fès.

Les objectifs de ce travail sont :

- Etude du spectre clinique de nos patients atteints du syndrome de Noonan à *PTPN11*+ et ceux de la littérature.
- Etude du profil moléculaire des variants retrouvés sur *PTPN11* et de la conformation protéique en 3D.
- Rechercher une corrélation génotype–phénotype.
- Décrire les modalités de prise en charge, du diagnostic prénatal et conseil génétique.

Matériel & Méthode

Notre cohorte est constituée de patients référés à notre unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès, soit directement pour une suspicion du syndrome de Noonan ou devant l'association syndromique avec un premier signe d'appel qui est la cardiopathie et ce de 2009 à 2019. Pour cette étude, notre analyse s'est portée essentiellement sur les cas rendus positifs après étude moléculaire.

Le choix du gène à analyser en premier a été basé sur une étude bibliographique des bases de données dans le cadre d'une thèse de doctorat de science ¹²et a porté sur le gène *PTPN11*, gène majoritaire du syndrome de Noonan, puis ont été sélectionnés, les principaux exons de ce gène hébergeant 99% des variations pathogènes responsables de ce syndrome (exons 2, 3, 4, 7, 8, 12 et 13.³

A la suite d'une consultation de génétique lors de laquelle le patient est examiné, le bilan des examens complémentaires déjà réalisés est noté et un arbre généalogique est tracé, et après consentement éclairé recueilli, nous récupérons un prélèvement de sang du patient sur deux tubes EDTA(2 à 4ml) pour l'extraction de l'ADN. Après la mise en évidence d'un variant chez le cas index, un prélèvement des parents est demandé pour confirmer son caractère *de novo*. Les tubes peuvent être conservés à -4°C pour une utilisation dans les 72h ou à - 20°C pour une extraction à postériori.

I. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est manuelle et a été réalisé par deux méthodes :Extraction saline et extraction par kit Invitrogen.

1. Extraction saline :

Principe : Le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Le lysat est centrifugé et après élimination du surnageant, le culot cellulaire, contenant les leucocytes, est traité par une solution de lyse des globules blancs (SLB) contenant la protéinase K. (enzyme qui digère les protéines cellulaires). Les protéines seront par la suite éliminées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl (5 M) et la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (-20 °C).

Réactifs nécessaires :

- Tris-EDTA 20 mM / 5 mM Tris-EDTA 10 mM /1 mM
- SLB à +42°C
- Protéinase K 10 mg/ml
- Na Cl 5 M
- Ethanol 75 % à +4°C
- Eau Distillée stérile

Protocole expérimental : L'extraction d'ADN est réalisée à partir du sang total, conservé dans un tube EDTA et stocké à -20°C. Une décongélation de l'échantillon est donc nécessaire.

- ✓ Lyse des globules rouges : Une fois décongelé, le sang est récupéré dans un tube de 15 ml, traité avec deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5 (V/V), puis incubé dans la glace pendant 20 mn. Ces étapes

permettent la lyse des globules rouges. Après incubation, une centrifugation à 2500 tr/mn pendant 5 mn est réalisée, et le surnageant est ensuite éliminé. Les étapes précédentes sont répétées (ajout de deux volumes de TE 20/5, incubation... .) jusqu'à l'obtention d'un culot blanc ne renfermant que les globules blancs.

- ✓ Lyse des globules blancs : Le culot est suspendu dans 3 ml de SLB (Solution de lyse des globules blancs), puis 100 µl de protéinase K (10mg/ml) sont additionnés. L'incubation dure une nuit sous agitation douce à 42°C.
- ✓ Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés : Après l'incubation, 4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M sont ajoutés, le tube est par la suite homogénéisé, puis centrifugé à 3000 tr/mn pendant 30 mn.
- ✓ Précipitation et lavage de l'ADN : Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 ml, auquel deux volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. Après homogénéisation, "la méduse" d'ADN se forme dans le tube. Cette dernière sera récupérée dans un tube Eppendorff de 1.5 ml, puis lavée à l'éthanol 75 %. Après évaporation pour éliminer toute trace de l'éthanol, l'ADN est dilué dans 200 µl de TE (Tris-EDTA) puis stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure (pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

2. Extraction d'ADN par Kit (Invitrogen) :

C'est une méthode simple, rapide et avantageuse lorsqu'il y a un faible volume de sang.

Le système utilise la technologie de la membrane de silice pour l'isolation

simple et rapide de l'ADN génomique sans phénol-chloroforme. L'homogénéisation n'est pas nécessaire car les cellules sont directement lysées par la protéinase K. Le système tampon est optimisé pour permettre la liaison sélective de l'ADN à la membrane de gel de silice. Le protocole de centrifugation simple élimine complètement les contaminants tels que les protéines, les cations divalents, et les métabolites secondaires. L'ADN pur est ensuite élué dans l'eau ou un tampon pauvre en sel et est ensuite prêt à l'emploi.

➤ Réactifs nécessaires :

Kit Pure Link™ Genomic DNA Kits contenant les solutions suivantes :

- ✓ Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer
- ✓ Pure Link™ collection tubes (2ml)
- ✓ Pure Link™ spin columns with collection tubes
- ✓ Pure Link™ Genomic Elution Buffer
- ✓ Pure Link™ Genomic Wash Buffer 1 (concentré)
- ✓ Pure Link™ Genomic Wash Buffer 2 (concentré)
- ✓ RNase A (20 mg/ml)
- ✓ Protéinase K (20 mg/ml)

➤ Protocole expérimentale

Lyse des cellules avec la protéinase K et le tampon de lyse :

- Prévoir un bain marie à 55°C ou une étuve à 55°C
- Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml :
 - ✓ Ajouter 200 µL de sang ;
 - ✓ Ajouter 20 µL de Protéinase K ;
 - ✓ Ajouter 20 µL de RNase A ;
 - ✓ Vortexer environ 15 secondes ;
 - ✓ Incuber 2 minutes à température ambiante ;

- ✓ Ajouter 200 µL de Pure Link™ Genomic Lysis / Binding Buffer ;
- ✓ Vortexer environ 15 secondes ;
- ✓ Incuber 10 minutes à 55°C ;
- ✓ Ajouter 200 µL d'éthanol absolu, Vortexer environ 5 secondes ;

Absorption de l'ADN sur la membrane :

- Mettre le mélange dans la colonne Pure Link™ et centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;
- Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le Kit) et jeter le tube contenant le filtrat ;

Elimination des contaminants résiduels :

- Ajouter 400 µL de tampon Wash Buffer 1 et centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;
- Mettre la colonne dans un tube collecteur de 2ml (fourni dans le kit) et jeter le tube contenant le filtrat. ;
- Ajouter 400 µL de tampon Wash Buffer 2 et centrifuger 3 minutes à 14000 rpm
- Mettre la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 ml ;
- Mettre 50 ou 100 µL de tampon Pure Link™ Genomic Elution Buffer et incuber 1 à 5minutes à température ambiante ;
- Centrifuger 1 minute à 8000 rpm ;

Faire une 2ème élution : remettre les 50 µL dans la colonne et centrifuger 1 min à 8000 rpm.

Le stockage de l'ADN : à +4°C pour toute utilisation ultérieure (notons que pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

II. Dosage de la concentration d'ADN :

Avant de stocker les échantillons d'ADN à -20°C pour toute utilisation ultérieure, nous avons procédé au dosage de leurs concentrations par le Nano-drop « Nanovue plus, Thermo Scientific » qui mesure leur densité optique à une longueur d'onde de 260 nm et la convertit en une concentration exprimée en ng/ μl . Les rapports de pureté 260/280 et 260/230 qui accompagnent le résultat du dosage donnent respectivement une idée sur la présence des traces de protéines et des agents d'extraction (sels, détergent...) qui peuvent nuire à l'ADN et gêner les réactions ultérieures.

III. Amplification des régions cibles :

Le gène *PTPN11* renferme 15 exons qui codent pour une protéine de 593 acides aminés. Après une étude bibliographique, il a été constaté que 99% des mutations forment des clusters au niveau des exons 2, 3, 4, 7, 8, 12 et 13. Ainsi, il a été décidé de restreindre l'exploration moléculaire à ces exons. Les amorces utilisées pour amplifier ces régions ont été tirées du travail de Tartaglia et al. Le tableau (Fig.3) illustre les séquences des oligonucléotides utilisés ainsi que la taille des différents amplicons générés.

Exons	Amorce sens 5'>3'	Amorce anti-sens 5'>3'	Taille de l'amplicon (pb)	Taille de l'exon (pb)
Exon 2	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	405	123
Exon 3	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	384	195
Exon 4	AGGAGAGCTGACTGTATACAGTAG	AGGAGAGCTGACTGTATACAGTAG	447	193
Exon 7	GAACATTTCCTAGGATGAATTCC	GAACATTTCCTAGGATGAATTCC	271	97
Exon 8	GACATCAGGCAGTGTTACGTTAC	GACATCAGGCAGTGTTACGTTAC	350	80
Exon 12	GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC	GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC	250	68
Exon 13	CAACACTGTAGCCATTGCAACA	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	356	152

Figure 3: Séquences des amorces des exons 2, 3, 4, 7, 8, 12, 13 utilisés pour la PCR-Séquençage

L'étape suivante consiste en l'amplification des régions codantes par la technique de PCR qui constitue une réaction de polymérisation en cycles répétitifs de dénaturation-hybridation-élongation. Cette technique est assurée principalement par un programme thermique et une enzyme de polymérisation thermorésistante, la Taq polymérase. Les différents constituants de cette réaction, ainsi que le programme du thermocycleur sont détaillés dans le tableau suivant (Fig.4)

Réaction PCR			Programme PCR			
Réactifs	Concentrations	Volumes(ul)	Étapes	Températures (°C)	Durée	Nombre de cycles
Tampon	10X	2.5	Dénaturation initiale	94	8mn	1
MgCl ₂	50nM	1	Dénaturation	94	40s	35
dNTPs	10nM	1	Hybridation	Exon 2	65	
Amorce Sens	10nM	1		Exon3	63	
Amorce AntiSens	10nM	1		Exon4	62	
Taq Polymérase	5u/ul	0.2		Exon7	61	
ADN	60ng/ul	1		Exon8	58	
H2O	-	Qsp		Exon12	59	
	Volume total	25ul	Exon13	60		
			Elongation	72	40s	
			Elongation finale	72	10min	1

Figure 4 : Conditions réaction de PCR et programme thermocycleur

Pour chaque essai de PCR, un témoin négatif « Mix PCR sans ADN » est associé aux échantillons de nos patients, ce qui permet de contrôler l'absence des contaminants d'acides nucléiques.

Les produits PCR obtenus sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2% pour apprécier la qualité et la quantité des amplicons. Le gel utilisé contient 1 g de poudre d'agarose, 50 ml du tampon TBE 1X et 2 µl du bromure d'éthidium (10 mg/ml). Un marqueur de taille est également déposé pour identifier le poids moléculaire des amplicons ciblés initialement.

Après migration sous champ électrique, les bandes ayant été séparées selon leurs poids moléculaires sont visualisées sous lumière UV grâce à l'intercalation du bromure d'éthidium entre les différentes paires de bases.

IV. Séquençage des régions cibles :

Après avoir amplifié nos régions codantes du gène *PTPN11*, nous procédons au séquençage classique type Sanger des produits PCR obtenus. Le principe de cette technique consiste à effectuer une réaction de PCR spécifique (réaction de séquence) contenant, en plus des réactifs habituels cités ci-dessus, quatre types de didésoxyribonucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Durant cette réaction, les ddNTPs incorporés au cours de l'élongation bloquent le processus de polymérisation, et entraînent ainsi la libération de fragments de différentes tailles qui contiennent tous l'un des ddNTPs marqués à la fin de leurs séquences respectives. Les différents fragments de chaque échantillon sont par la suite séparés selon leurs poids moléculaires via une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La fluorescence émise par les différents ddNTP sera captée et transformée en pic de couleurs différentes correspondant à la succession des bases relative à chaque patient.

Ce processus est accompagné de deux étapes de purification dont le rôle principal est d'éliminer l'excès des réactifs qui peuvent gêner les étapes suivantes. La figure 5 résume les différentes étapes du séquençage avec les réactifs correspondants.

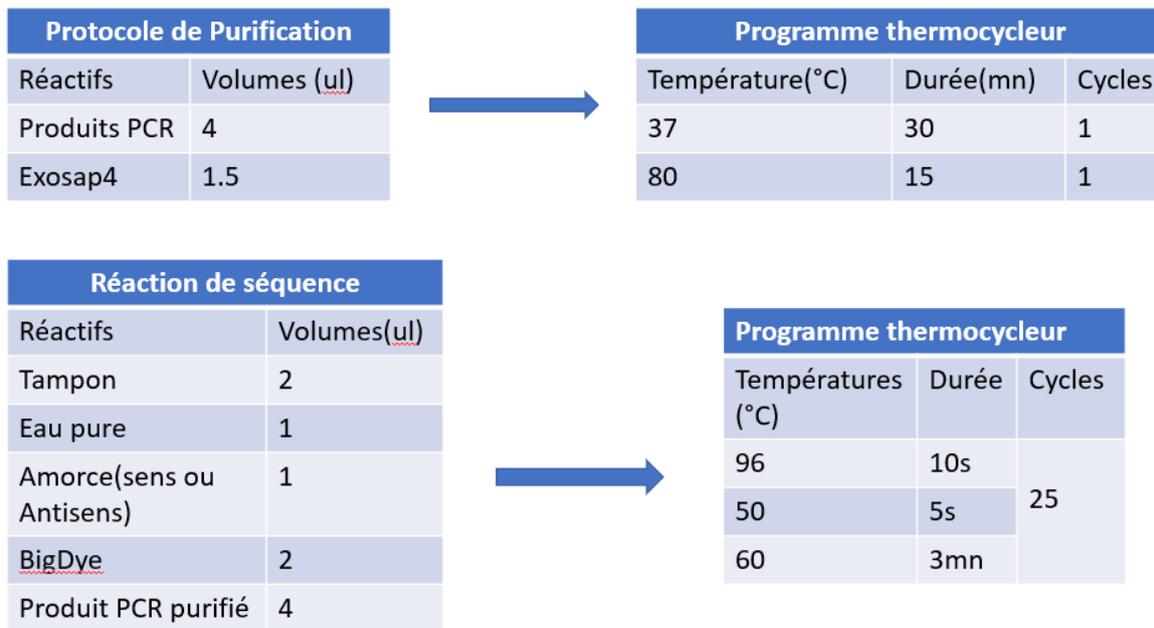


Figure 5 : Réaction de séquence et programme de purification

A la fin du séquençage nous avons obtenu des séquences nucléotidiques qui correspondent aux régions amplifiées du gène *PTPN11* des patients concernés. Ces différentes séquences ont été sujettes à une analyse bio-informatique dans le but de rechercher les variants par rapport à une séquence de référence et de les annoter.

V. Caractérisation bio-informatique :

Les séquences obtenues à la fin du séquençage sont récupérées pour être analysées en utilisant différents outils de Bio-informatique.

1. Alignement des séquences :

Il est possible grâce à l'outil « Nucleotide BLAST » (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) de la plateforme NCBI qui compare les séquences d'ADN ciblées de nos patients à un génome de référence, Ce génome de référence est un assemblage de séquences nucléotidiques issues du séquençage d'ADN de plusieurs individus dans le cadre d'un consortium international de chercheurs au sein du « Human genome Project » réalisé entre 1990 et 2003. Cette séquence est continuellement mise à jour par le GRC (Genome Reference Consortium). À ce jour, la dernière version du génome humain est la GRCh38 mais la version la plus utilisée encore est la version GRCh37/Hg19 et que nous adoptons également.

BLAST nous indique alors le pourcentage d'homologie entre la séquence de notre patient et la séquence du génome de référence. En cas d'absence de variant, la succession des nucléotides de la séquence du patient est complètement identique à celle de la séquence de référence d'une personne indemne, alors qu'en présence de variants, le pourcentage d'identité diminuera en fonction du nombre des différences détectées.

Pour connaître la position exacte du variant détecté et sa nomenclature, nous utilisons l'option CCDS de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi)

CCDS affiche la séquence codante consensus du gène recherché, commençant par le codon initiateur ATG, et finissant par le codon stop. Ainsi, nous pouvons préciser la position du nucléotide exonique muté par rapport au premier nucléotide de l'ATG initiateur de la séquence codante CCDS (Consensus Coding Sequence).

L'option CCDS affiche également la séquence protéique du gène recherché, ce qui permet également l'identification de la position de l'acide aminé altéré par rapport au codon Méthionine initiateur et ainsi obtenir la nomenclature protéique du variant détecté en se basant sur les recommandations de l'HGVS.

2. Annotation des variants :

L'annotation permet d'évaluer la pathogénicité des variants et se base sur les critères de la classification des variants recommandés par des « guidelines » internationaux et publiés par l'ACMG (American College of medical genetics).

- Fréquence du variant :

La première étape est de vérifier la fréquence du variant dans les bases de données « GnomAD » qui inclut 125,748 exomes séquencés et 15,708 génomes d'individus préalablement investigués dans le cadre d'études de la génétique des populations ou pour des maladies génétiques spécifiques dont la liste est disponible sur leur site. Un pourcentage de fréquence d'un variant de plus de 1% indique que ce variant est un simple polymorphisme et donc un variant bénin.

- Base de données des variants :

Pour les variants dont la fréquence est $<$ à 1%, nous vérifions leur appartenance à la base de données Clinvar qui regroupe tous les variants soumis dans cette plateforme par les différents laboratoires de génétique à travers le monde en leur attribuant une classification selon les critères de l'ACMG :

Classe 5 : « Pathogène »

Classe 4 : « Probablement pathogène »

Classe 3 : « Variant de signification inconnue »

Classe 2 : « Probablement bénin »

Classe 1 : « Bénin »

- Outils de prédiction :

Nous soumettons ensuite nos variants à des outils bioinformatiques de prédiction de pathogénicité *in silico* qui se basent sur plusieurs paramètres dont le calcul de l'écart physico-chimique entre l'acide aminé de référence et l'alternatif qui pourra changer la conformation de la protéine et ses sites d'interactions, la vérification de l'emplacement du variant dans un domaine protéique important, aussi l'évaluation de la conservation de l'acide aminé à travers les espèces, un acide aminé très conservé aura un impact pathogénique plus important qu'un acide aminé faiblement ou non conservé puis pour les variants introniques pouvant affecter des sites donneur ou accepteur d'épissage calculer l'impact pour la création d'un site alternatif pouvant soit induire un saut d'exon ou une rétention d'intron.

- Pour l'évaluation de la conservation des acides aminés nous nous sommes basés sur le score **GERP** (**Genomic Evolutionary Rate Profiling**), un score d'alignement multi-espèces du variant ce qui permet l'évaluation de sa conservation à travers différentes espèces. Des scores positifs représentent des positions hautement conservées alors que les scores négatifs indiquent des positions faiblement conservées.
- L'outil **SIFT** (**Sorting intolerant from tolerant**), nous a permis de prédire l'impact de la substitution de l'acide aminé sur la fonction de la protéine en se basant sur le degré d'homologie de la séquence protéique et l'écart physico-chimique entre l'acide aminé de référence et l'alternatif. Les scores inférieurs à 0,05 sont considérés délétère et le reste toléré.
- Nous avons également testé l'outil **Polyphen2** (**Polymorphism Phenotyping v2**), qui fonctionne comme l'outil Sift mais en plus utilise la conformation 3D de la protéine, et interroge de nombreuses bases de données. La pathogénicité du variant est de plus en plus importante si le score

s'approche de 1.

- Nous avons interrogé l'outil **CADD**(Combine Annotation Dependent Depletion), qui prédit le caractère délétère des variants en se basant sur le croisement des résultats de la conservation des acides aminés et les données fonctionnelles protéiques. Les résultats sont affichés sous forme d'un score Phred, les scores supérieurs à 30 sont les plus délétères. Le score **DANN** (Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks) se base sur le même principe de calcul du caractère pathogène des variants que l'outil CADD.
- **PROVEAN** (Protein Variation Effect Analyzer) est un outil similaire à Polyphen 2 et Sift, le score calculé se base essentiellement sur l'homologie de séquences protéiques par rapport aux bases de données. Le seuil de pathogénicité est fixé à -2.282 et le score affiché est associé à son interprétation.

Pour l'utilisation simultanée de ces différents outils de prédiction, nous avons soumis nos variants sur le portail Varsome.

- Articles Pubmed :

Il est important également de vérifier sur le portail NCBI si le variant a préalablement fait l'objet d'une publication ce qui est un critère majeur de pathogénicité.

Résultat & Discussion

I. Résultats :

1. Données épidémiologiques :

Nous avons reçu 48 demandes d'analyses moléculaires de *PTPN11* ou d'avis génétique dans le cadre du syndrome de Noonan entre 2009 et 2019, 10 patients sont porteurs d'un variant pathogène ou probablement pathogène sur *PTPN11* ce qui signifie un taux diagnostique de 20% dans notre laboratoire sur un phénotype du syndrome de Noonan (Fig.6)

Phénotype Syndrome de Noonan



Figure 6 : Taux diagnostique du syndrome de Noonan à l'unité de génétique médicale du CHU Hassan II de Fès

Le sexe ratio est de 1.5, l'âge de demande d'analyse moléculaire s'étend de la période néonatale (J+3) jusqu'à 18 ans.

2. Données cliniques :

Phénotype	PTPN11 +
Dysmorphologie	10/10
Cardiopathie	9/10
Retard statural	6/10
Déficiences intellectuelles	3/10
Retard des acquisitions	5/10
Cryptorchidie	4/6
Atteinte squelettique	5/10
Troubles alimentaires	5/10
Présentation prénatale	1/10

Figure 7 : Distribution des signes cliniques observés de notre cohorte

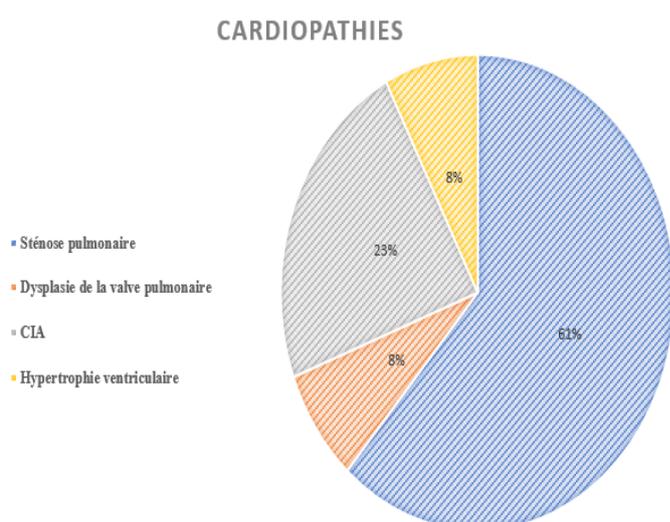


Figure 8 : Fréquence des différentes atteintes cardiaques dans notre cohorte

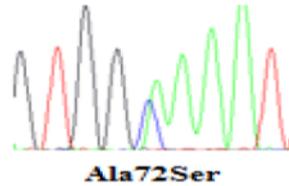
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexe	G	G	G	F	G	F	G	G	F	F
Age	4mois	18ans	3ans	8ans	10ans	6ans	3jours	1an	2ans	7ans
Variant Nucléotidique	c.214C>T	c.182A>G	c.214C>T	c.188A>G	c.182A>G	c.328G>A	c.1529A>G	c.1510A>G	c.923A>G	c.417G>C
Variant Protéique	p.(Ala72Ser)	p.(Asp61Glv)	p.(Ala72Ser)	p.(Tyr63Cys)	p.(Asp61Glv)	p.(Glu110Lys)	p.(Gln510Arg)	p.(Met504Val)	p.(Asn308Ser)	p.(Glu139Aasp)
Exon	3	3	3	3	3	3	13	13	8	4
Dysmorphie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cardiopathie	Sténose pulmonaire serrée	Sténose pulmonaire / CIA	Sténose pulmonaire serrée/CIA	-	Sténose pulmonaire	Sténose pulmonaire serrée/CIA	Dysplasie valve pulmonaire	Sténose pulmonaire modérée	Sténose pulmonaire serrée/ Hypertrophie triventriculaire	Sténose pulmonaire
Retard statural	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Retard des acquisitions	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Déficience intellectuelle	ND	+	-	-	+	+	ND	ND	ND	-
Pectus excavatum	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Cryptorchidie	+	+	+	ND	-	ND	-	+	ND	ND
Autres	Troubles alimentaires	Age osseux 13ans IGF1 basse	Hygroma kystique en prénatal Troubles alimentaires Nystagmus Pied valgus	Troubles alimentaires	-	Troubles alimentaires	Détresse respiratoire sévère en néonatal	Troubles alimentaires	Infections respiratoires à répétition	Déficit partiel en GH Strabisme

Figure 9 : Description clinique et moléculaire des différents patients inclut dans notre cohorte

+ : Présence ; - : Absence ; ND : Non déterminé

3. Données moléculaires :

Patient 1 et 3 : Variant c.214C>T ; p.(Ala72Ser) sur l'exon 3



Variant sur séquence Sanger

Polyphen2
 This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of 0.987 (sensitivity: 0.53, specificity: 0.95)

Score: **0.987**

DANN [?](#) **0.9971**
 GERP [?](#) NR [?](#)
 SIFT [?](#) prediction Damaging score 0.007, 0.006
 Provean [?](#) prediction Damaging score -2.59, -2.69

The CADD score for your variant is 26.3.

Details:

Chr	12
Pos	112888198
Ref	G
Alt	A
RawScore	3.777587
PHRED	26.3

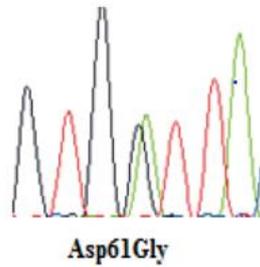
Pas connu de GnomAD

Clinvar

Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (Feb 22, 2018)	criteria provided, single submitter - GeneDx Variant Classification (06012015)	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (May 15, 2014)	criteria provided, single submitter - LMM.Criteria	clinical testing	Noonan syndrome (Autosomal dominant inheritance) [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Pathogenic (Oct 17, 2016)	criteria provided, single submitter - ACMG Guidelines, 2015 - ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Jun 13, 2017)	criteria provided, single submitter - Invitae Variant Classification Sherlock (09022015)	clinical testing	Rasopathy [MedGen Orphanet]

Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 2 et 5 : Variant c.182A>G ;p. (Asp61Gly) sur l'exon 3



Variant sur séquence Sanger

Polyphen2

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **0.930** (sensitivity: 0.67, specificity: 0.91)

Score: **0.9977**

DANN ?

GERP ?

SIFT ?

Provean ?

prediction: Damaging

score: 0.031, 0.001

score: -5.87, -5.64

The CADD score for your variant is 28.6.

Details:

Chr	12
Pos	112888166
Ref	A
Alt	G
RawScore	4.060768
PHRED	28.6

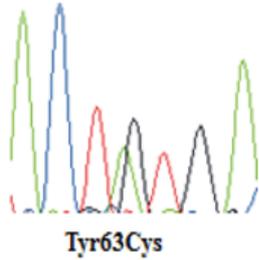
Pas connu de GnomAD

Clinvar

Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (Jan 15, 2019)	criteria provided, single submitter - GeneDx Variant Classification (06012015)	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Mar 1, 2013)	criteria provided, single submitter - EGL Classification Definitions, 2015	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Jul 21, 2016)	criteria provided, single submitter - LMM Criteria	clinical testing	Rasopathy (Autosomal dominant inheritance) [MedGen Orphanet]
Pathogenic (Oct 27, 2017)	criteria provided, single submitter - Nykamp K et al. (Genet Med 2017)	clinical testing	Rasopathy [MedGen Orphanet]
Pathogenic (Jan 1, 2017)	criteria provided, single submitter - ACMG Guidelines, 2015 - ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	Short stature [MedGen Human Phenotype Ontology]

Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 4 : Variant c.188A>G ;p. (Tyr63cys) sur l'exon 3



Variant sur séquence Sanger

The CADD score for your variant is 28.8.

Details:

Chr	12
Pos	112888172
Ref	A
Alt	G
RawScore	4.073249
PHRED	28.8

Population	Allele Count	Allele Number
▶ East Asian	1	18394
▶ Latino	1	34588
▶ European (non-Finnish)	1	113318
▶ African	0	16256
▶ Ashkenazi Jewish	0	10076
▶ European (Finnish)	0	21644
▶ Other	0	6120
▶ South Asian	0	30614
Total	3	251010

Include: Exomes Genomes

Clinvar

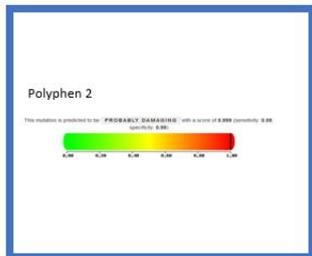
Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (Apr 3, 2017)	reviewed by expert panel - ClinGen RASopathy ACMG Specifications v1	curation	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Pathogenic (May 2, 2016)	criteria provided, single submitter - LabCorp Variant Classification Summary - May 2015	clinical testing	Noonan syndrome 3 [MedGen OMIM]
Pathogenic (Mar 28, 2017)	criteria provided, single submitter - ACMG Guidelines, 2015 - ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	Noonan syndrome 1 (Autosomal dominant inheritance) [MedGen OMIM]
Pathogenic (Nov 1, 2016)	criteria provided, single submitter - ACMG Guidelines, 2015 - ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	Noonan syndrome 1 [MedGen OMIM]
Pathogenic (Apr 26, 2017)	criteria provided, single submitter - ACMG Guidelines, 2015 - ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	Lymphoma [MeSH MedGen Orphanet Human Phenotype ...]
Pathogenic (Jan 7, 2015)	criteria provided, single submitter - Variant Classification	clinical testing	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Pathogenic (Jun 13, 2017)	criteria provided, single submitter - ARUP Molecular Germline Variant Investigation Process	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Dec 6, 2018)	criteria provided, single submitter - GeneDx Variant Classification (06012015)	clinical testing	not provided [MedGen]

DANN Score **0.9984**

GERP NR **5.63**

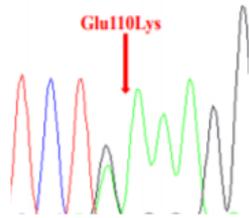
SIFT prediction Damaging score 0

Provean prediction Damaging score -7.47, -7.07



Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 6 :Variant c.328G>A ;p. (Glu110Lys) sur l'exon 3



Variant sur séquence Sanger

Polyphen2

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of 0.970 (sensitivity: 0.60, specificity: 0.93)

Score: **0.9993**

DANN: NR

GERP: 6.05

SIFT: prediction Damaging, score 0.003, 0.002

Provean: prediction Damaging, score -3.58, 42

The CADD score for your variant is 33.

Details:

Chr	12
Pos	112868312
Ref	G
Alt	A
RawScore	4.414880
PHRED	33

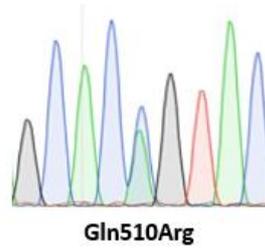
Pas connu de GnomAD

Clinvar

Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (Mar 8, 2016)	criteria provided, single submitter * GeneDx Variant Classification (06012015)	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Nov 21, 2014)	criteria provided, single submitter * LMM Criteria	clinical testing	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Likely pathogenic (Mar 14, 2016)	criteria provided, single submitter * LabCorp Variant Classification Summary - May 2015	clinical testing	Noonan syndrome 3 [MedGen OMIM]

Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 7 : Variant c.1529A>G ;p. (Gln510Arg) sur l'exon 13



Variant sur séquence Sanger

Clinvar

Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method
Pathogenic (Jan 26, 2018)	criteria provided, single submitter • GeneDx Variant Classification (06012015)	clinical testing
Pathogenic (Jul 30, 2005)	no assertion criteria provided	literature only

Population Frequencies

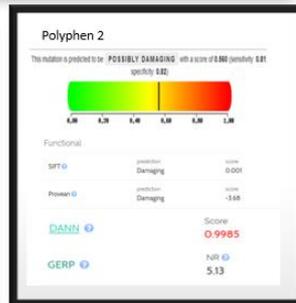
Population	Allele Count	Allele Number
▶ Latino	1	34592
▶ African	0	16256
▶ Ashkenazi Jewish	0	10080
▶ East Asian	0	18394
▶ European (Finnish)	0	21648
▶ European (non-Finnish)	0	113768
▶ Other	0	6138
▶ South Asian	0	30616
Total	1	251492

Include: Exomes Genomes

The CADD score for your variant is 28.0.

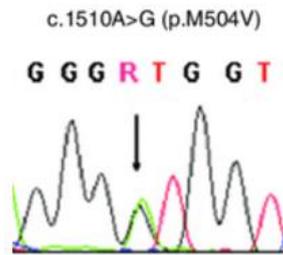
Details:

Chr	12
Pos	112926897
Ref	A
Alt	C
RawScore	4.003998
PHRED	28.0



Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 8 : Variant c.1510A>G ; p. (Met504Val) sur l'exon 13



Variant sur séquence Sanger

The CADD score for your variant is 23.3.

Details:

Chr	12
Pos	112926890
Ref	A
Alt	C
RawScore	2.828189
PHRED	23.3

Population Frequencies

Population	Allele Count	Allele Number
European (non-Finnish)	1	113766
African	0	16256
Latino	0	34592
Ashkenazi Jewish	0	10080
East Asian	0	18394
European (Finnish)	0	21648
Other	0	6138
South Asian	0	30616
Total	1	251490

Include: Exomes Genomes

Clinvar

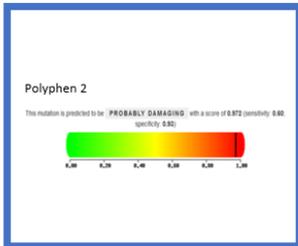
Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (Apr 3, 2017)	reviewed by expert panel • ClinGen_RASopathy_ACMG_Specifications_v1	curation	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Pathogenic (Apr 21, 2016)	criteria provided, single submitter • LabCorp_Variant_Classification_Summary - May 2015	clinical testing	Rasopathy [MedGen Orphanet]
Pathogenic (Feb 16, 2015)	criteria provided, single submitter • ACMG_Guidelines_2015 • ACMG_Guidelines_2015	clinical testing	Noonan syndrome 1 [MedGen OMIM]
Pathogenic (Oct 31, 2018)	criteria provided, single submitter • ACMG_Guidelines_2015 • ACMG_Guidelines_2015	clinical testing	Noonan syndrome 1 [MedGen OMIM] Juvenile myelomonocytic leukemia
Pathogenic (Jul 31, 2018)	criteria provided, single submitter • GeneDx_Variant_Classification_08012015	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Mar 1, 2013)	criteria provided, single submitter • EGL_Classification_Definitions_2015	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Nov 14, 2017)	criteria provided, single submitter • LMM.Criteria	clinical testing	Noonan syndrome (Autosomal dominant inheritance)

DANN [Score](#) 0.9958

GERP [NR](#) 5.13

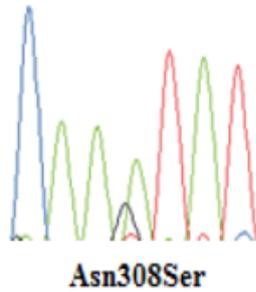
SIFT [prediction](#) Damaging [score](#) 0.002

Provean [prediction](#) Damaging [score](#) -3.48



Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 9 :Variantc.923A>G ;p. (Asn308Ser) sur l'exon 8



Variant sur séquence Sanger

Polyphen2
 This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of 0.580 (sensitivity: 0.81, specificity: 0.82)

Score: **0.9984**

DANN: **0.9984**

GERP: **5.6399**

SIFT: prediction Tolerated, score 0.072, 0.099

Provean: prediction Damaging, score -4.58, -4.67

The CADD score for your variant is 26.7.

Details:

Chr	12
Pos	112915524
Ref	A
Alt	C
RawScore	3.841962
PHRED	26.7

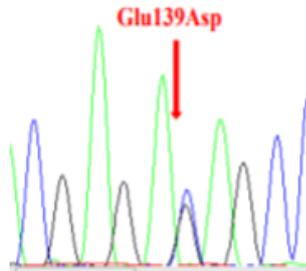
Pas connu de GnomAD

Clinvar

Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (May 9, 2018)	criteria provided, single submitter * Nykamp K et al. (Genet Med 2017)	clinical testing	Rasopathy [MedGen Orphanet]
Pathogenic (Dec 3, 2015)	criteria provided, single submitter * Variant Classification	clinical testing	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Pathogenic (Aug 5, 2015)	criteria provided, single submitter * ACMG Guidelines, 2015 * ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic (Sep 4, 2015)	criteria provided, single submitter * ACMG Guidelines, 2015 * ACMG Guidelines, 2015	clinical testing	Noonan syndrome 1 [MedGen OMIM]
Pathogenic (Jun 25, 2015)	criteria provided, single submitter * EGL Classification Definitions, 2015	clinical testing	not provided [MedGen]
Pathogenic	criteria provided, single submitter * Parsons et. al 2016	clinical testing	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]

Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

Patient 10 : Variant c.417G>C ; p. (Glu139Asp) sur l'exon 4



Variant sur séquence Sanger

Polyphen2
This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of 0.970 (sensitivity: 0.60; specificity: 0.93)

Score: **0.9987**

DANN ? NR ? 5.55

GERP ?

SIFT ? prediction Damaging score 0.009

Provean ? prediction Neutral, Damaging score -2.52, -2.42

The CADD score for your variant is 25.2.

Details:

Chr	12
Pos	112891083
Ref	G
Alt	C
RawScore	3.539447
PHRED	25.2

Pas connu de GnomAD

Clinvar

Clinical significance (Last evaluated)	Review status (Assertion method)	Collection method	Condition(s) (Mode of inheritance)
Pathogenic (Apr 3, 2017)	reviewed by expert panel - ClinGen RASopathy ACMG Specifications v1	curation	Noonan syndrome [MeSH MedGen Orphanet OMIM]
Pathogenic (Aug 28, 2017)	criteria provided, single submitter - LabCorp Variant Classification Summary - May 2015	clinical testing	Noonan syndrome 3 [MedGen OMIM]
Pathogenic (Oct 24, 2016)	criteria provided, single submitter - Ambry Autosomal Dominant and X-Linked criteria (10/2015)	clinical testing	Cardiovascular phenotype [MedGen]
Pathogenic (Jun 5, 2014)	criteria provided, single submitter - ambry_reporting_categories_2017	clinical testing	Inborn genetic diseases [MeSH MedGen]
Pathogenic (Jan 1, 2017)	criteria provided, single submitter - ACMG Guidelines_2015 - ACMG Guidelines_2015	clinical testing	Hypertrophic cardiomyopathy [MedGen Orphanet Human Phenotype Ontology]
Pathogenic (Oct 22, 2018)	criteria provided, single submitter - GeneDx Variant Classification (06012015)	clinical testing	not provided [MedGen]

Données de la fréquence du variant, son entrée Clinvar, et le résultat des différents outils de prédiction bio-informatiques

II. Discussion

1. Clinique :

Dysmorphologie : C'est un critère constant dans le phénotype du syndrome de Noonan chez nos patients (100%) mais aussi chez les patients décrits dans la littérature.

Elle est très caractéristique et évolue avec l'âge¹³. Dès la période néonatale, On retrouve déjà les aspects dysmorphologiques typiques du syndrome de Noonan incluant un front large, hypertélorisme, fentes palpébrales antimongoloïdes, épicanthus, un nez court et bulbeux à bout retroussé et base aplatie, un philtrum profond et bord de lèvres larges, un palais haut, une micrognathie, des oreilles basses implantées en rotation postérieure avec hélices épaisses et une peau de la nuque excessive (Ptérygiumcolli) avec des cheveux bas implantés. Durant l'enfance, la tête devient relativement large avec un front haut et proéminent contrastant avec un menton pointu, hypertélorisme, le ptosis apparait ainsi que les paupières deviennent épaisses tombantes caractéristiques, le nez est court et large avec une base déprimée. Avec les années, le visage s'allonge et peut apparaitre grossier et hypotonique(myopathique) avec des contours plus triangulaires. Au cours de l'adolescence, l'arête du nez devienne fine et proéminente avec une base large, le cou s'allonge et accentue l'aspect du ptérygium colli et le muscle du trapèze devient proéminent. A l'âge adulte, les plis nasogéniens deviennent proéminents et la peau apparait fine et transparente. Les cheveux peuvent être rares pendant l'enfance puis plus bouclés plutard.^{14,15}

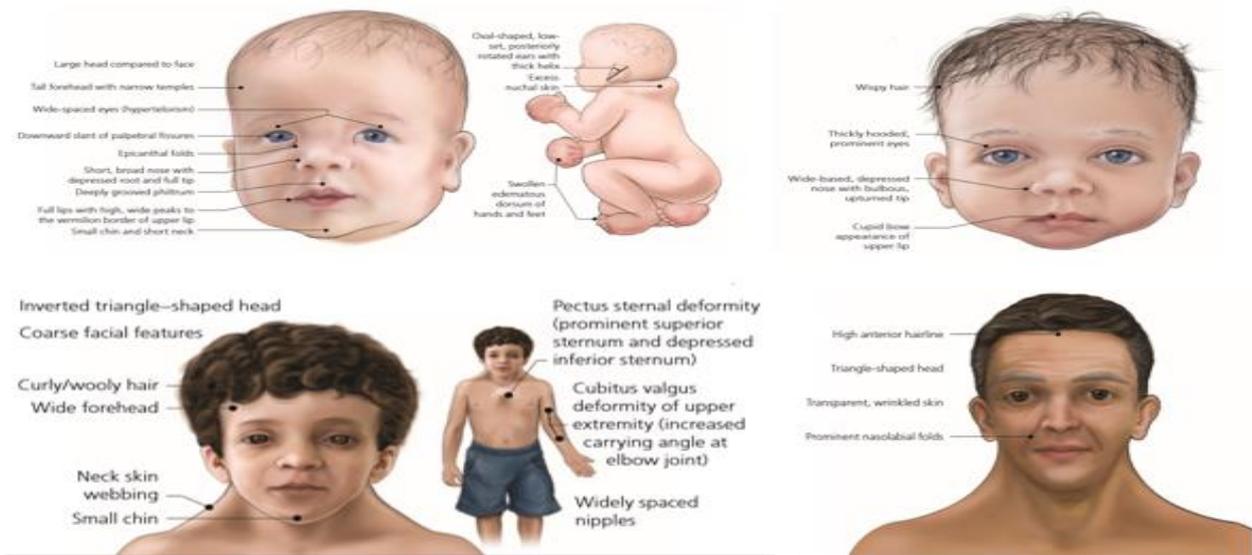


Figure 10 : Dysmorphologie du syndrome Noonan : Du nourrisson à l'âge adulte 31

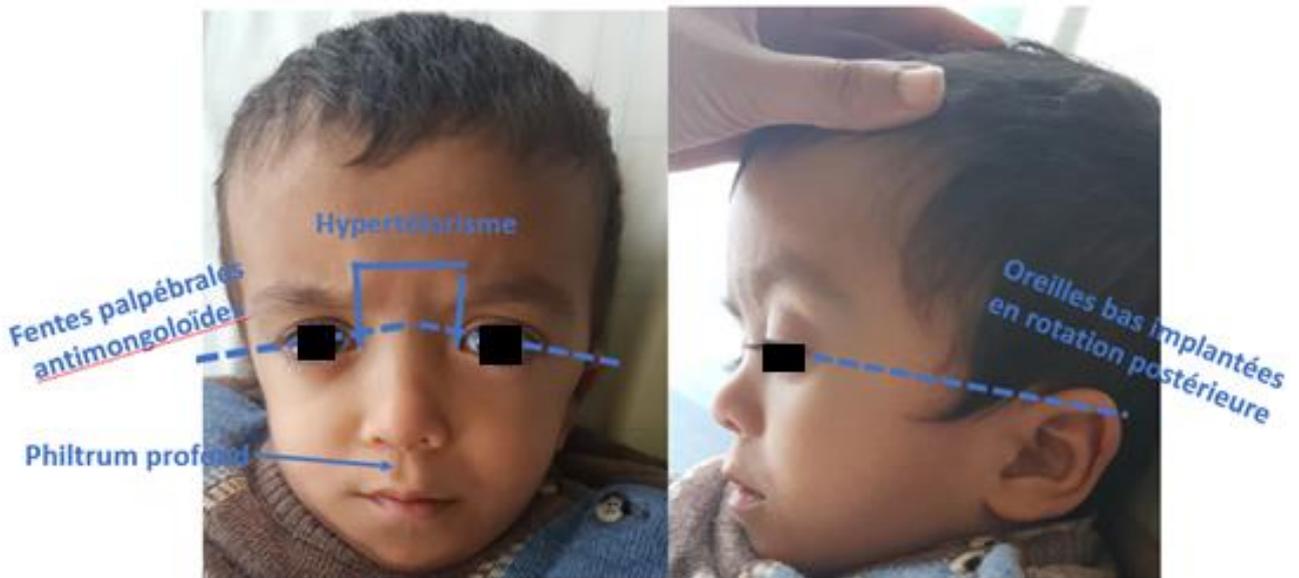


Figure 11 : Caractérisation des traits dysmorphologique du syndrome de Noonan à partir d'un patient de notre cohorte



Figure 12 : Patients Noonan porteurs de mutation *PTPN11* des premiers mois de vie jusqu'à l'âge adulte issus de la littérature^{13,20, 26}; * : Patient Noonan de notre cohorte à l'âge de 18 ans

Cardiopathie : L'analyse de notre cohorte de patients *PTPN11+* montre que 90% sont porteurs d'une cardiopathie, 61 % d'entre eux se présentent avec une sténose pulmonaire, 23% ont une communication inter-auriculaire 8% une hypertrophie ventriculaire puis 8% avec dysplasie de la valve pulmonaire sans sténose associée.

Dans la littérature, la prévalence des cardiopathies est de 80–90%¹⁶ ce qui est tout à fait concordant avec notre étude. Le syndrome de Noonan est la deuxième étiologie des cardiopathies syndromiques après la trisomie 21⁶. 25 % des patients Noonan décèdent la 1^{ère} année de vie par insuffisance cardiaque. ⁶

La sténose pulmonaire et la cardiomyopathie hypertrophique sont les cardiopathies les plus prévalentes du syndrome de Noonan, avec une majorité des sténoses pulmonaires chez les mutés *PTPN11*, le spectre des anomalies cardiaques est large et inclut également les communications interauriculaires, atrio-ventriculaire et interventriculaire, les anomalies de la valve mitrale, la coarctation de l'aorte, la tétralogie de Fallot¹⁶.

La sténose de la valve pulmonaire est une valve dysplasique caractérisée par un épaissement fibreux de l'anneau et de la valve pulmonaire. Elle est souvent associée à une sténose supra annulaire due à la fusion de la valve avec les parois de l'artère pulmonaire.¹⁶ Le syndrome de Noonan est considéré comme facteur de risque de progression de la sténose pulmonaire due à la prévalence élevée des dysplasies pulmonaires¹⁷.

Les anomalies vasculaires sont rarement associées au syndrome de Noonan¹⁶, celles au niveau cérébral de type malformation artérioveineuse ont été décrites⁶, spécialement de type Moya Moya syndrome.¹⁸

Les électrocardiogrammes (ECG) des patients porteurs de SN montrent typiquement des complexes QRS larges avec des ondes négatives dans les aires précordiales gauches (62%), une déviation axiale (80%) et des ondes Q géantes¹⁹.

Troubles neuropsychologiques : La déficience intellectuelle est altérée chez 30% de nos patients ce qui rejoint là encore les données de la littérature qui nous indiquent que les capacités intellectuelles des patients Noonan sont légèrement basses par rapport à d'autres enfants²⁰ avec un QI variant de 70 à 120⁶, 35% ont des difficultés d'apprentissage²¹ avec près de la moitié qui aurait besoin d'une aide au cours de la scolarité²². Une fréquence élevée de déficit dans des domaines neuropsychologiques spécifiques est notée incluant l'analyse visuelle²³ la mémoire verbale à long terme²⁰, et le développement du langage²⁴.

Des études portant sur les fonctions cognitives des patients Noonan ont décrits des difficultés de reconnaissance des émotions altérant l'expression verbal émotionnelle (Alexithymie), des difficultés dans les compétences sociales, des troubles de l'attention et l'hyper activité⁶. Le mécanisme neurobiologique de ces déficits n'est encore élucidé, mais des recherches effectuées sur le modèle animal ont démontré le rôle essentiel des protéines de la voie de signalisation RAS-MAPK dans la plasticité synaptique et dans le processus de l'acquisition de la mémoire et sa consolidation²⁵.

Une étude portant sur la mémoire chez les enfants atteints du syndrome de Noonan a montré que 50% des individus de leur cohorte avec des mutations confirmées sur *PTPN11*, *SHOC2*, *RAF1* et *SOS1* ont des performances réduites dans la mémoire verbale mais que 5 à 20% présenterait un déficit dans la mémoire visuelle et de la reconnaissance spatiale ²⁵.

Le retard psychomoteur : Il est présent chez 50% des patients de notre cohorte avec un léger décalage des acquisitions. L'hypotonie est fréquente dans l'enfance, associée à un retard moteur (25 %). L'âge moyen de la marche est de 21 mois. Un retard d'acquisition du langage s'observe chez 20 % des enfants, et la plupart d'entre eux conservent un déficit relatif des performances verbales et des troubles articulatoires (70%). La majorité des enfants NS présentant des troubles du langage (85%) associent également une déficience intellectuelle, et des troubles auditifs ²⁴.

Le retard de croissance: il constitue le 3ème critère le plus important après la cardiopathie et la dysmorphologie, 60 % de nos patients *PTPN11+* ont un retard statural en sachant que les 40% ayant une taille normale ont un âge inférieur à 2ans.

Ce qui est bien confirmé par les précédentes études réalisées dans la littérature et ceci concerne 70% des patients Noonan²⁶, la Taille et poids de naissance sont souvent normaux⁶. Le fléchissement de la courbe staturale commence

au cours de la première année²⁷ avec une perte de 1 à 1,5 déviation standard²⁶, après 2 à 4 ans, la taille chute au-delà du 3ème Percentile jusqu'à la puberté qui survient après un décalage. La taille finale sera de 152,4 à 154,4cm chez les femmes et de 167.4 à 169.2cm chez les hommes ce qui reste inférieur de 1.5DS par rapport à la population générale ²⁶.

Le retard statural chez les patients Noonan est une conséquence de la dysrégulation de la voie de signalisation Ras–Mapk, de l'insuffisance en hormone de croissance et de la résistance à cette hormone. Il a été également rapporté que les troubles alimentaires durant la première année de vie présents chez 50% des cas pourraient être le premier déclencheur de cette chute staturale²⁸. L'étude faite par Croonen et al en 2017 a prouvé que les facteurs influençant négativement la taille sont en plus des troubles alimentaires, le fait d'être porteur d'une mutation dans le gène *PTPN11*, d'avoir eu une chirurgie cardiaque pendant la 1ère année de vie et d'avoir un parent atteint du syndrome de Noonan²⁸.

Environ 40 à 50% des patients Noonan présentent un pic de GH inférieur à 10ng/ml au cours des tests de stimulation. Les enfants Noonan à petite taille ont un taux faible de la concentration nocturne et une pulsatilité inhabituelle de la GH suggérant un dysfonctionnement de la neurosecrétion.

Il a été également observé que Les patients *NSPTPN11+* ont une plus petite taille de naissance, des taux faibles de l'IGF1 et de l'IGF–BP3 et un taux normal ou légèrement élevé de l'hormone de croissance et un taux élevé après stimulation et une réponse pauvre au traitement par GH par rapport aux patients Noonan sans mutations *PTPN11+* ^{26,27}.

En 2007 le traitement à l'hormone de croissance recombinante pour les patients Noonan a été approuvé avec une dose de 0.066mg/kg/jour. Cependant ce traitement reste à ce jour controversé⁶, Il permettra de gagner jusqu'à 10cm de taille

et ceci dépendra de l'âge de l'initialisation du traitement et sa durée, il est indiqué qu'en cas de déficit en GH. Il est à noter que la taille à l'âge adulte est normale dans 50% des cas même sans traitement par GH ²⁷.

Puberté et fertilité : Les patients Noonan ont une puberté retardée chez les deux sexes comparés à la population générale. 33% des garçons entre en puberté à l'âge de 13.5 ans et 44% des filles à 13ans⁶. La moyenne de l'âge des ménarches est de 14.6ans⁹

La fertilité ne semble pas être affectée chez les femmes, cependant des dysfonctions gonadiques et une déficience de la spermatogénèse ont été rapportés chez les hommes Noonan, ceci pourra expliquer le sexe ratio prédominant des mères transmettrices dans les cohortes familiales rapportées. Cette infertilité masculine peut être expliquée par l'ectopie testiculaire qui est très fréquente chez les garçons atteints de ce syndrome (80% dans la littérature et 66% chez nos patients), pourtant des cas de dysfonction des cellules de Sertoli ont été décrits chez des hommes qui n'ont pas eu de cryptorchidie ce qui suggère un défaut intrinsèque de ces cellules surtout en sachant le rôle critique de la protéine SHP2 dans la maintenance de la fonction des cellules de Sertoli. Encore, les altérations métaboliques récemment rattachés aux rasopathies pourraient aussi affecter les fonctions gonadiques ⁹

Difficultés alimentaires: La majorité des enfants du syndrome de Noonan présentent des troubles alimentaires et la fréquence est de 75 % dans la littérature ⁹, notre cohorte objective un taux de 50% de difficultés alimentaires durant la 1^{ère} année de vie.

Ces difficultés sont faites de troubles de déglutition, des vomissements récurrents, de temps d'alimentation allongé, et 25% présentent des troubles sévères et auraient besoin d'une alimentation par sonde. Le reflux gastro-œsophagien est

également commun. Ces troubles se résolvent généralement vers l'âge de 15 mois⁶ mais un petit poids est tout de même maintenu jusqu'à l'âge adulte malgré les bons apports nutritionnels, les patients Noonan gardent un profil de dépenses énergétiques élevées et qui serait dû à l'augmentation de l'activité de biogénèse mitochondriale⁹

Troubles hématologiques et cancer : Les enfants atteints du syndrome de Noonan sont exposés à de nombreux troubles hématologiques incluant les monocytoses transitoires, les thrombocytopénies, les maladies myéloprolifératives, mais l'atteinte la plus fréquente est les hémorragies dues au défaut de coagulation. Une étude a montré que 65 % des patients de leur cohorte avaient des ecchymoses ou saignement anormaux, 40% avaient un temps de la thromboplastine activée élevée et 50% avaient des troubles de la voie intrinsèque, la déficience en facteur de coagulations et en plaquettes toucheraient un tiers des patients⁶.

Les enfants NS avec mutation *PTPN11*+ sont particulièrement prédisposés aux cancers hématologiques par rapport à la population générale et plus particulièrement à la leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML, OMIM 607785), qui est une pathologie myéloproliférative rare chez les enfants et est associée à un spectre étroit de mutations affectant le gène *PTPN11* avec une mutation majoritaire qui est rarement observée chez les patients NS (218C>T, Thr73Ile) Ces variants sont localisés entre la portion N terminal et PTP de la protéine SHP2 et semblent être plus activatrices. Elle est également associée à des variants germinaux du gène *KRAS*, et elle peut être due à des mutations somatiques du gène *PTPN11* dans 30 % des cas chez les enfants non NS²⁷ et avec un pronostic plus défavorable par rapport à sa survenue dans le cadre du syndrome de Noonan⁶

La JMML peut régresser spontanément sans traitement, ou peut avoir une évolution agressive et peut également évoluer vers la leucémie myéloïde aigue.

Des cancers à cellules géantes(MGCLs) de la mâchoire ou autre localisation osseuse ou des tissus mous sont plus rarement associés au syndrome de Noonan. Ils ont été observés chez les patients NS mutés *PTPN11* ou *SOS1* ou *BRAF* ou *MEK1*²⁷

Des cas ont été rapportés de rhabdomyosarcome embryonnaire (duodénum, vessie, orbite, vagin, ouraque et abdomen), de tumeurs à cellules granuleuses, d'astrocytome pilocystique, des tumeurs de Sertoli sur un testicule ectopique et des tumeurs gliales, une large étude de 297 patients NS avec *PTPN11*+ a observé un risque calculé de 3 à 5 fois plus de risque de développer un cancer chez cette catégorie par rapport à la population ⁶

Troubles lymphatiques :Plusieurs des manifestations du syndrome de Noonan sont dues à des troubles lymphatiques durant le développement, incluant le pterygium coli, la proéminence du trapèze, la cryptorchidie, les mamelons écartés, les oreilles basses implantées en rotation postérieurs, l'hypertélorisme et le ptosis.

Les lymphœdèmes périphériques sont présentes chez moins de 20% des patients mais présentent une morbidité importante, ils surviennent pendant l'enfance et peuvent se résorbés pour réapparaître au cours de l'adolescence ou l'âge adulte.

Plus rarement rapportés, l'hydrops fetalis, les lymphantiectasies intestinales ou testiculaires, l'épanchement pleural ou du péritoine, les anomalies des lymphatiques thoraciques, inguinales, iliaques et des jambes ⁶

Anomalies squelettiques :Le syndrome de Noonan s'accompagne de déformations squelettiques progressives: accentuation de l'angle de Louis (70 %) donnant une déformation typique du sternum en bréchet, associant *pectus carinatum* supérieur et *pectus excavatum* inférieur (**Fig.13**). Cette déformation conduit à un écart inter-mamelonnaire excessif, et souvent à une scoliose(25 %) qui peut être évolutive, surtout à l'adolescence²¹, nous la rapportons chez 40% de nos patients.



Fig13 : Pectus Excavatum²⁰

Il est également rapporté un cubitus valgus (50%) et des anomalies vertébrales²⁷Il existe souvent une hyperlaxité des petites articulations. Les doigts peuvent présenter une morphologie caractéristique, étant plutôt larges et à bout carré (30 %).²¹

La mesure de la densité osseuse attestée par plusieurs techniques chez les patients NS est basse comme pour les autres rasopathies notamment les syndromes NF1 et Costello.

Cette baisse en masse osseuse induit souvent une ostéoporose et des

fractures plutard à l'âge adulte, elle est due à un déséquilibre entre la formation ostéoblaste dépendante et la résorption ostéoclaste dépendante, une étude a donc démontrée l'augmentation de la résorption osseuse chez les patients NS suggérant un rôle clé des ostéoclastes ce qui est tout à fait conformes avec d'autres études qui ont attribué à la protéine SHP2 un rôle régulateur du développement des ostéoclastes et de leur fonctionnement, ce qui peut être médié par une activation de la voie Ras/MAPK⁹

Il est à noter que l'hypoestrogenisme chez les garçons peut entraîner à l'âge adulte un surrisque d'ostéopénie et de résorption osseuse. ⁶



Fig. 14 : Ecchymoses et excès de peau acral¹⁰

Troubles ophtalmologiques:75% des patients Noonan avec mutation *PTPN11*³⁰ ont au moins une manifestation oculaire qui peut être un strabisme, des troubles réfractives, amblyopie ou un nystagmus⁶. 57% des patients développeraient les anomalies de la chambre antérieures³¹ incluant une cataracte, des anomalies au fond d'œil comme les drusens oculaires, l'hypoplasie du disque oculaire, les colobomes ou la myélinisation nerveuse qui surviennent chez 20% des patients. ^{6,29}

Troubles auditifs : Les problèmes auditifs sont très fréquents, en particulier la surdité de perception, qui se rencontre dans toutes les RASopathies, chez 25 % des patients Noonan et encore plus fréquemment dans le syndrome de Noonan avec lentigines multiples. Une surdité de transmission est fréquemment notée, du fait de conduits auditifs étroits, de bouchons de cérumen obstructifs ou d'otites séromuqueuses⁸

Atteinte dermatologique : Une étude pilote en France a confirmé la fréquence assez faible de l'atteinte dermatologique chez les patients Noonan et plus particulièrement les *PTPN11* + par rapport aux autres lalopathies en écartant le syndrome de Noonan–lentigines multiples des cas étudiés. Elle a montré la présence d'ecchymoses dans 58.5% des cas (Fig. 14), des anomalies capillaires dans 46,9% incluant des cheveux bouclés ou ondulés et une alopécie temporale respectivement dans

23,1% et 15,4%, des troubles de la kératinisation dans 18,5% et la présence de multiples taches café–au–lait chez 4,7%, une hyperpigmentation générale n'a pas été notée. Autres manifestations sont une hyperlaxité de la peau, un excès de peau acral (Fig. 14), un lymphœdème, une lentigine multiple et multiples naevis mélanocytaires observés respectivement dans 26,1%, 10,8%, 7,7%, 6,1 et 6,1%¹⁰

Présentation prénatale : La clarté nucale épaisse est le premier signe du syndrome du Noonan en prénatale et qui est due aux troubles lymphatiques caractéristiques de ce syndrome, elle est plus facilement détectée depuis la mise en place du programme de dépistage des aneuploïdies au cours de l'échographie du 1^{er} trimestre de grossesse. Elle peut être associée plus tard dans la grossesse à un hydrops fœtal, un épanchement pleural, la cardiopathie et le polyhydramnios qui sont les manifestations caractéristiques du syndrome de Noonan en prénatal³². Une élévation des marqueurs sériques est également rapportée³³. Le poids et la taille

chez les fœtus NS sont généralement dans les normes²⁷

Une étude a montré que 40% des fœtus à caryotype normal avec nuque épaisse ont été diagnostiqués avec un syndrome de Noonan³²

2. Analyse des variants:

Tous les variants retrouvés chez les patients de notre cohorte sont des faux sens hétérozygotes sur le gène *PTPN11*. La majorité ne sont pas connus de GnomAD sauf trois variants qui ont une fréquence extrêmement rare de l'ordre de 0.0012% et de 0.00040%. Tous nos variants ont été rapportés dans la base de données ClinVar comme étant pathogène ou probablement pathogène et ils sont prédits délétères par les différents outils de prédiction in silico.

La plupart de ces variants forment un cluster au niveau de l'exon 3 (60%) qui compte à lui seul quatre variants parmi nos 10 patients (c.214C>T ; p. (Ala72Ser), c.182A>G ; p. (Asp61Gly), c.188A>G ; p. (Tyr63Cys), c.328G>A ; p. (Glu110Lys), dont 2 variants récurrents. Deux variants sont localisés au niveau de l'exon 13 (20%) : (c.1510A>G ; p. (Met504Val), c.1529A>G p. (Gln510Arg)), un variant sur l'exon 4 (10%) (c.417G>C ; p. (Glu139Asp)) et un autre sur l'exon 8 (c.923A>G ; p. (Asn308Ser)) (10%).

Les deux variants récurrents sur l'exon 3 sont : c.214C>T ; p. (Ala72Ser) et c.182A>G ; p. (Asp61Gly). (Fig.16)

Les variants retrouvés dans notre étude sont des variants décrits comme « Hot spot » mutationnel, le domaine N-SH2 est codé par les exons 1 à 3 et le domaine PTP par les exons 6 à 13, les exons 4 à 6 codent pour le domaine C-SH2⁵(Fig.15)

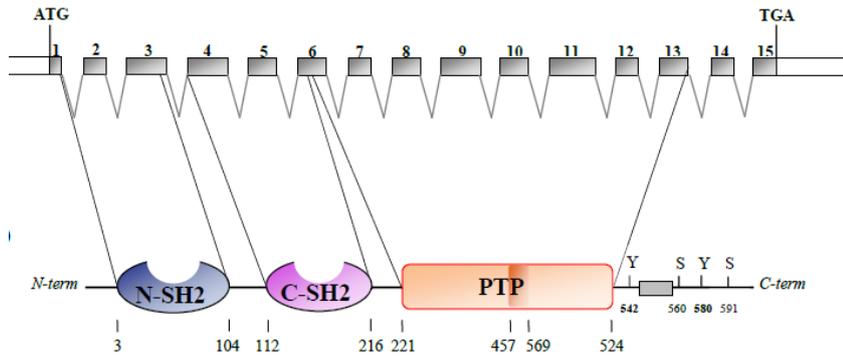


Figure 15 : Organisation de l'ADN codant du gène *PTPN11* et de la structure protéique de SHP2³³

Position génomique	Nomenclature	Exon	Domaine protéique	Fréquence GnomAD	Prédiction Sift/Polyphen2	Clinvar
112888166	c.182A>G ; p.(Asp61Gly)	3	N-SH2	0	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène
112888172	c.188A>G ; p.(Tyr63cys)	3	N-SH2	0,0012	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène
112888198	c.214C>T ; p.(Ala72Ser)	3	N-SH2	0	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène
112888312	c.328G>A ; p.(Glu110Lys)	3	Jonction N-SH2/C-SH2	0	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène/ Probablement pathogène
112891083	c.417G>C ; p.(Glu139Asp)	4	C-SH2	0	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène
112915524	c.923A>G ; p.(Asn308Ser)	8	PTP	0	Toléré/ Probablement pathogène	Pathogène
112926890	c.1510A>G ; p.(Met504Val)	13	PTP	0,00040	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène
112926897	c.1529A>G ; p.(Gln510Arg)	13	PTP	0,00040	Délétère/ Probablement pathogène	Pathogène

Figure 16 : Récapitulatif de l'analyse moléculaire et bio-informatique des variants de nos patients

La plupart des variants décrits responsables du syndrome de Noonan sont situés au niveau des domaines N-SH2 et PTP ou proches de ces sites ce qui rejoint également nos données (75% de nos variants sont au niveau des domaines N-SH2 et PTP) (Fig. 18, 19, 20), le rôle

de ces acides aminés touchés par ces variants est de stabiliser la protéine SHP2 sur sa conformation catalytiquement inactive. Ces variants vont alors augmenter l'activité physiologique de SHP2 en désactivant le switch entre sa conformation active et inactive en la maintenant en conformation active. Le domaine N-SH2 joue le rôle majeur dans le contrôle de son activation. Les données de la cristallographie montrent que lorsque la protéine SHP2 est en conformation inactive, le domaine N-SH2 se met en contact du domaine PTP sur une large interface bloquant ainsi son site catalytique situé au niveau du domaine PTP (Fig. 17). Cette interface représente une zone d'interaction complexe entre les domaines PTP et N-SH2 qui est stabilisée grâce à un large réseau de ligand qui interagit avec les acides aminés Asn58, Gly60, Asp61, Ala72, Glu76, Gln79, Cys459 et Gln506. D'autres acides aminés situés à proximité jouent aussi un rôle dans cette stabilité et qui sont Tyr62, Tyr63, Thr73, Tyr279, Ile282, Phe285, Asn308, Ile309, Arg501, et Met504, les analyses structurales ont confirmés que les variants sur ces acides aminés bloquent la protéine SHP2 sur sa conformation active sans altérer son site catalytique² ce qui est en faveur d'un gain de fonction de la protéine SHP2.³⁴

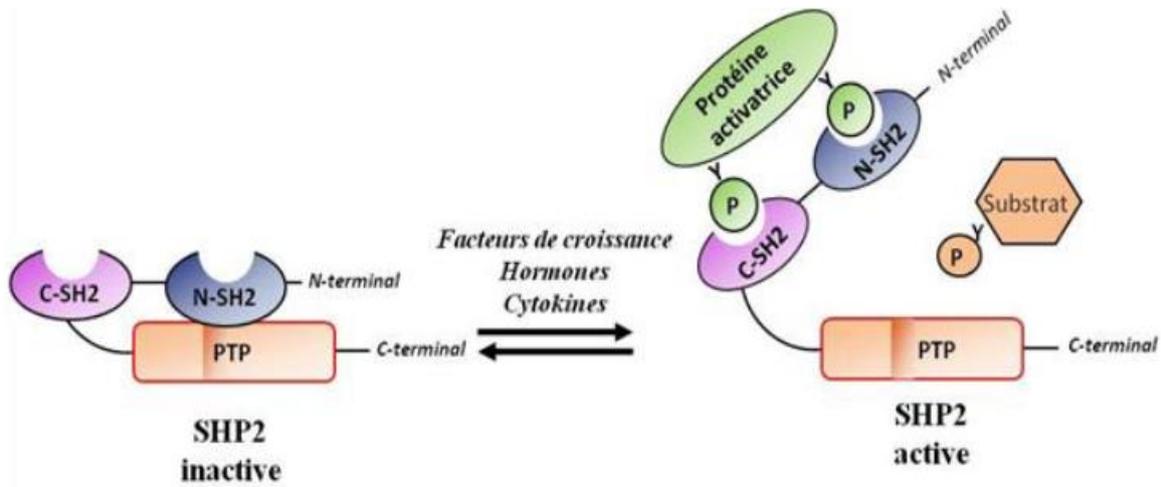


Figure 17 : Activation de la protéine SHP2 et changement de conformation 33

Quand les domaines N-SH2 et C-SH2 se lient à un résidu phosphotyrosyl, l'interaction entre N-SH2 et PTP diminue changeant ainsi la conformation de SHP2 et rendant le site catalytique disponible pour l'interaction avec les substrats modulant ainsi positivement le niveau de l'activité phosphatase de SHP2. Pour les rares variants localisés au niveau de la jonction entre N-SH2 et C-SH2 (Glu110), ils altèrent fort probablement la flexibilité du domaine N-SH2, empêchant ainsi l'interaction entre les domaines N-SH2 et PTP. Le variant localisé au niveau du domaine C-SH2 (Glu139) fait partie des phosphopeptides de liaison de chaque domaine SH2, les données expérimentales suggèrent qu'il augmente l'activité de SHP2 en augmentant son affinité ou en altérant sa spécificité lors de la signalisation de phosphorylation avec ses partenaires. ⁴³

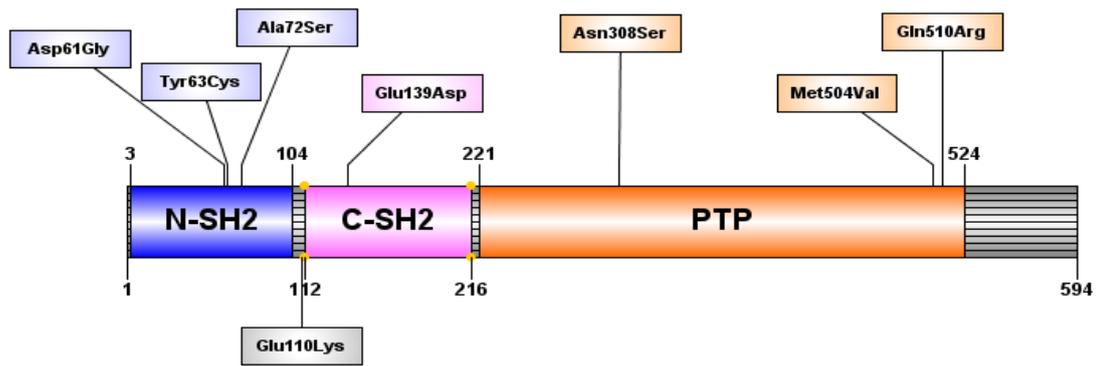


Figure 18 : Modélisation de la protéine SHP2 avec les différents domaines N-SH2/C-SH2 et PTP et distribution des variants trouvés chez notre cohorte

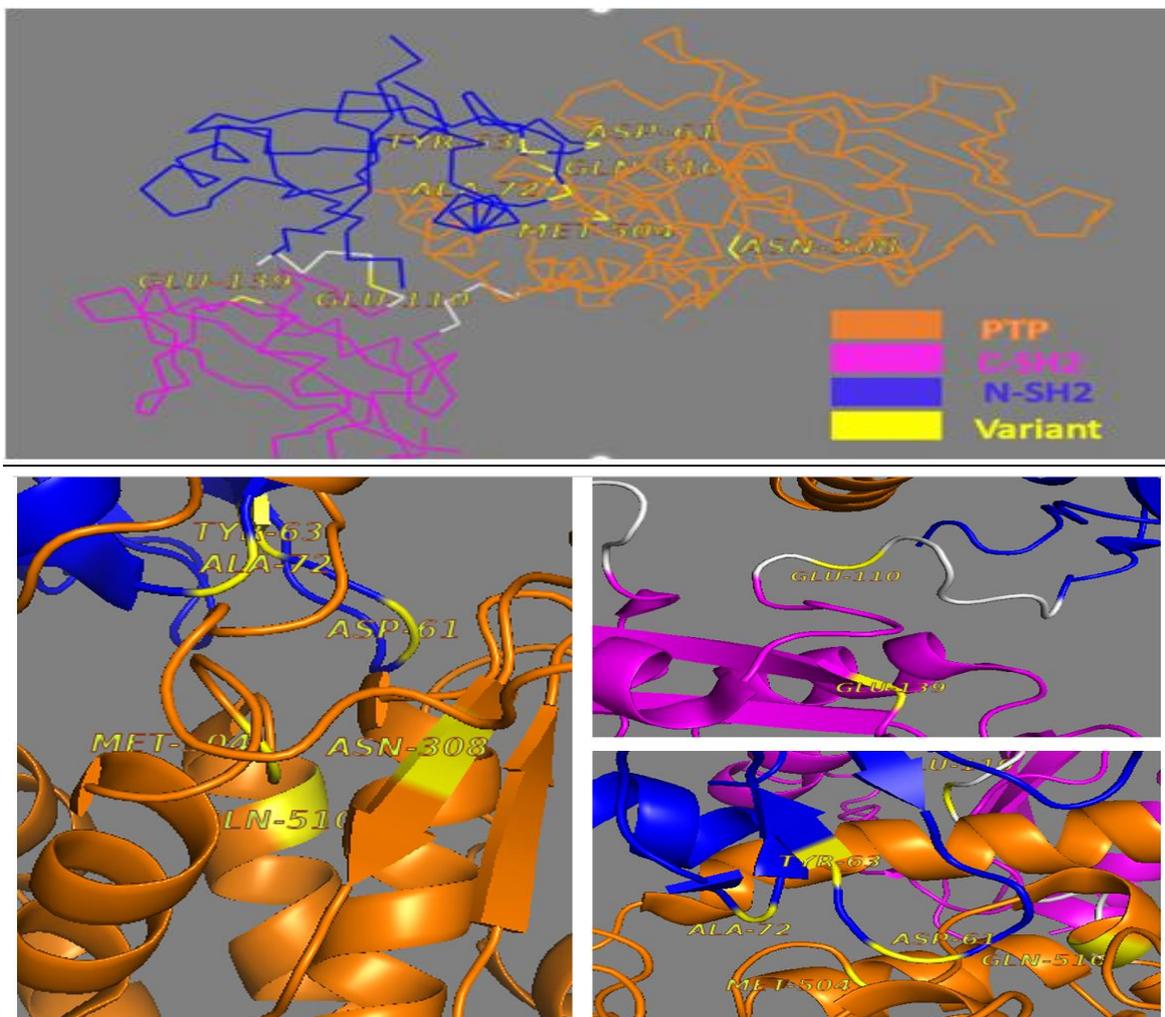


Figure 19 et 20 : Modélisation 3D de la protéine SHP2 avec les variants de notre cohorte

3. Corrélation génotype-phénotype:

Malheureusement avec le nombre limité de notre cohorte de patients, une corrélation phénotype-génotype ne peut être parfaite, nous pouvons tout de même affirmer que les phénotypes les plus riches et les plus sévères sont rattachés au domaine N-SH2, et dans l'autre sens le tableau le plus léger est présenté par le patient porteur du variant dans le domaine C-SH2, ce qui rejoint parfaitement les études de cohorte réalisées précédemment chez les autres populations qui confirment que les variants au niveau des domaines N-SH2 et PTP sont plus sévères(Fig.19) et aussi qu'il y 'a plus de variants pathogènes ou probablement au niveau de ces deux domaines qu'ailleurs au niveau de la protéine SHP2.(Fig.1)

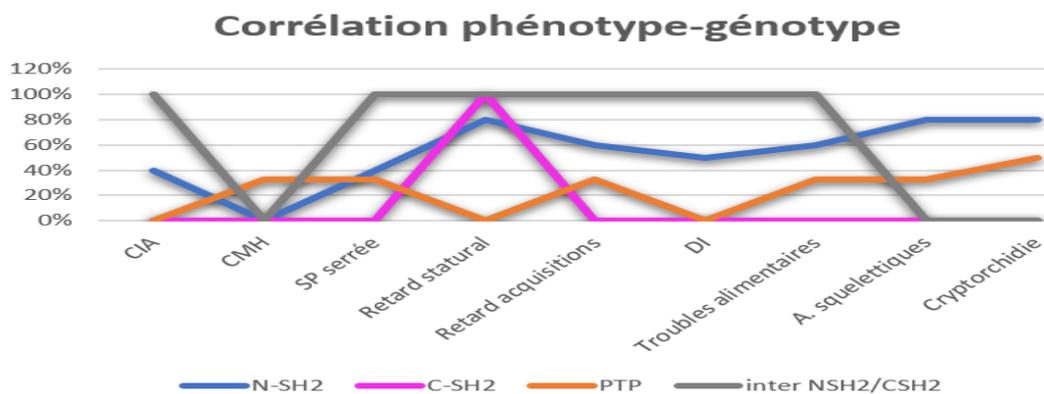


Figure 21 : Corrélation phénotype-génotype à partir des données des patients de notre cohorte

Les variants dans le gène *PTPN11* dans le syndrome de Noonan sont d'avantage associés à la sténose pulmonaire que la cardiomyopathie hypertrophique ce qui a bien été confirmé par notre étude³. Les variants dans l'exon 3 sont plus communément associés aux défauts de communication auriculaires, seul ou en association avec la sténose pulmonaire. Pour les défauts de communication atrioventriculaire, un variant est assez récurrent c.124A>G¹⁷

Par ailleurs, ils sont positivement corrélés à la petite taille, la déformation pectorales, la déficience en facteur VIII de coagulation et négativement à la déficience en facteur XI.

Encore selon la littérature, les patients porteurs du variant Asn308Ser semblent avoir une mémoire correcte, ²⁵ pour ce qui est de notre patient porteur de ce variant, il ne présente pas de retard des acquisitions mais la déficience intellectuelle n'a pu être évaluée vu le jeune âge du patient (2 ans).

La prise de poids est également influencée négativement par la présence d'un variant dans *PTPN11* avec des troubles alimentaires plus sévères²⁸

Aussi la présence de troubles oncohématologiques sont d'avantage rattachés aux domaines N-SH2 et PTP. L'activation de SHP2 due à ces altérations déstabilise l'interaction auto-inhibitoire entre ces deux domaines, augmentant ainsi l'activité phosphatase de SHP2 et l'affinité de ligation avec ses partenaires⁷

4. Prise en charge :

Devant le spectre large des manifestations induites par le syndrome de Noonan, une prise en charge multidisciplinaire autour de ces patients est indispensable et elle devra être coordonnée par le pédiatre ou le généticien.

Ces recommandations de prise en charge ont été formulées spécifiquement pour le syndrome de Noonan dans le cadre du parcours national de soin publié par la haute autorité de santé française et rédigé par les référents du syndrome de Noonan⁸

Sur le plan nutritionnel, une prise en charge gastrologique est nécessaire pour évaluer le RGO et les troubles de l'oralité qui doivent être objectivés par les moyens habituels (pH-métrie œsophagienne, scintigraphie œsophagienne, fibroscopie...). Le recours à une exploration endoscopique est nécessaire en cas de diarrhée chronique associée. En cas de difficultés alimentaires persistantes retentissant sur la croissance pondérale, une nutrition entérale par sonde nasogastrique est parfois requise dans le syndrome de Noonan. Une rééducation orthophonique spécialisée doit être proposée en cas de troubles de la déglutition ou de dysfonctionnement plus complexe du tronc cérébral.

Devant tout retard de la croissance, une visite chez l'endocrinologue pédiatre est nécessaire pour son suivi sur une courbe standard (qui permet d'identifier les situations où un traitement par hormone de croissance peut être proposé) et sur les courbes spécifiques pour le syndrome de Noonan. En cas d'infléchissement de la courbe de croissance à partir de 2 ou 3 ans ou d'hypoglycémies, un déficit en hormone de croissance doit être recherché par un dosage de l'IGF1, de l'IGF-BP3, et par les épreuves de stimulation adéquates. Le dosage des hormones thyroïdiennes (TSH, T4 libre) est recommandé en cas de ralentissement de la croissance et

systématiquement, tous les ans, en cas de positivité des anticorps anti thyroïdiens. Les anticorps antithyroïdiens sont recherchés systématiquement, chaque année, à partir de l'âge de 10 ans. En cas d'hypothyroïdie, le traitement ne diffère pas des autres étiologies.

En cas de déficit avéré en hormone de croissance, le traitement substitutif est justifié dans tous les cas. Selon les critères habituellement retenus, le déficit en hormone de croissance est confirmé si l'on observe des pics d'hormone de croissance inférieurs à 20 UI/ml sur deux tests, dont l'un couplé. Ces tests doivent être faits après "priming" par stéroïdes sexuels chez le grand enfant et l'adolescent, surtout dans le contexte de retard pubertaire qui est fréquent dans le syndrome de Noonan.

Le traitement substitutif par hormone de croissance est indiqué dans le cadre de l'AMM, à la posologie de 0,025 à 0,035 mg/kg/j. Le traitement substitutif nécessite :

- Une information complète et objective des parents sur le bénéfice incertain dans le cadre du syndrome de Noonan et les risques du traitement.
- Une IRM cérébrale initiale systématique (à la recherche d'une anomalie hypothalamo-hypophysaire) et une recherche de pan hypopituitarisme par les dosages hormonaux appropriés
- Un bilan cardiologique : la présence d'une cardiomyopathie hypertrophique bien tolérée ne contraindique pas le traitement mais, en cas de cardiomyopathie, une évaluation échographique est indispensable à l'initiation du traitement puis tous les 6 mois. La surveillance du traitement est du ressort des endocrinologues pédiatres. L'IGF1, qui doit impérativement rester inférieure à + 2DS pour l'âge, est contrôlée tous les 6-12 mois en même temps que les paramètres auxologiques. Glycémie à

jeun, lipidogramme et fonction thyroïdienne sont contrôlés chaque année, tout comme l'âge osseux.

Dans le cas d'un retard statural sans déficit en hormone de croissance : Un traitement par l'hormone de croissance, en l'absence de déficit, a été évalué dans plusieurs publications pour le syndrome de Noonan. Deux méta-analyses ont été publiées en 2015 : il existe en général un effet positif à court terme, mais un bénéfice final limité à l'âge adulte (gain moyen de 0,6 à 1,4 DS). En Europe, l'EMA a refusé d'élargir le champ des indications du traitement par l'hormone de croissance au syndrome de Noonan en 2009. En revanche, aux USA, l'indication a été retenue par la FDA en 2007 et la dose recommandée va jusqu'à 0,066 mg/kg/j. Les pratiques relatives au traitement par hormone de croissance dans le syndrome de Noonan sont variables entre les services d'endocrinologie pédiatrique, en l'absence de donnée documentant de façon claire l'effet de l'hormone de croissance sur la taille adulte. En cas de retard cognitif important, ce traitement ne paraît pas justifié. Il n'existe pas de données publiées qui indiqueraient une augmentation du risque tumoral en cas de traitement par l'hormone de croissance dans le syndrome de Noonan.

Une recherche systématique d'une **cryptorchidie** est obligatoire et si elle est mise en évidence, le patient doit être adressé chez un chirurgien viscéral pour une prise en charge selon les protocoles habituels.

En cas de **retard pubertaire** : un bilan de l'axe hypophysogonadique est indiqué (absence de développement des seins chez la fille à 13 ans, absence d'accroissement du volume des testicules à 14 ans). En fonction des résultats de ce bilan, un traitement substitutif par des stéroïdes sexuels doit être proposé du fait des conséquences somatiques et psychologiques du retard pubertaire non traité. Il n'y a pas de données concernant l'impact du traitement par stéroïdes sexuels à l'âge

de la puberté dans le syndrome de Noonan. De façon générale, il est bien établi que retarder la puberté n'augmente pas la taille adulte et que les traitements par stéroïdes sexuels utilisés de façon appropriée ne diminuent pas la taille adulte. Les hommes atteints d'un syndrome de Noonan peuvent présenter une dysfonction endocrine des cellules de Leydig et de Sertoli, qui peut être objectivée par l'abaissement des taux plasmatiques de l'inhibine B et qui peut être responsable d'une infertilité.

L'infertilité : La prise en charge de l'infertilité se fait dans un centre de procréation médicalement assistée, selon des protocoles standards. Le syndrome de Noonan n'est pas une contre-indication à la procréation médicalement assistée. La personne atteinte doit être informée du risque de transmission de son syndrome (50%) et de la grande variabilité d'expression de celui-ci, y compris au sein d'une même famille.

Sur le plan cardiologique :La surveillance sera conditionnée par la nature de l'anomalie. La sténose pulmonaire et la cardiomyopathie hypertrophique (CMH) peuvent apparaître ou progresser avec l'âge, surtout chez le jeune enfant. En l'absence d'anomalie connue, l'échographie cardiaque doit être répétée annuellement chez les enfants durant les 3 premières années de vie pour exclure l'apparition d'une cardiomyopathie. Par la suite, un contrôle échographique systématique est souhaitable tous les 2 à 3 ans, jusqu'à 20 ans, puis tous les 3 à 5 ans à l'âge adulte, en raison du risque de développer une cardiomyopathie tardive et des dilatations coronariennes. L'ECG est indispensable en cas de cardiomyopathie hypertrophique et lors de la première évaluation. En cas d'anomalie du rythme cardiaque notée avant un an, un enregistrement par Holter doit être pratiqué.

Une prévention de l'endocardite bactérienne est indiquée chez les patients ayant des anomalies à risque.

Une prise en charge du patient NS sur le **plan neurologique** est importante, L'imagerie cérébrale est recommandée d'emblée en présence d'une épilepsie, d'un examen neurologique anormal, d'une croissance excessive du périmètre crânien ou d'une notion de régression dans les acquisitions de céphalées répétées ou d'autres manifestations neurologiques atypiques : malaises répétés, troubles de l'équilibre, douleurs cervicales, apparition de troubles de déglutition ou d'un torticolis dans le syndrome de Noonan. La « malformation » d'Arnold Chiari se constitue au cours du temps en raison d'une hypertrophie tardive du cervelet. Dans le syndrome de Noonan sans déficience intellectuelle, l'IRM cérébrale n'est pas indiquée systématiquement dans l'enfance. En cas de déficience intellectuelle, qui pourrait rendre le dépistage clinique plus difficile, une IRM tous les 5 ans jusqu'à l'âge adulte est recommandée. Cette IRM devrait être répétée tous les 2 ans lorsque l'imagerie initiale montre une malformation d'Arnold Chiari et tous les 5 ans jusqu'à l'âge adulte dans les autres cas, ou plus tôt en cas de symptomatologie neurologique nouvelle. En cas de suspicion de neuropathie périphérique (rare mais peut-être sous diagnostiquée), un électromyogramme avec une étude des vitesses de conduction doit être proposée.

Pour les patients présentant **des troubles du neurodéveloppement**, ils nécessitent une rééducation spécifique et une assistance éducative. La détection et la prise en charge des difficultés d'apprentissage devraient donc être très précoces. L'hypotonie des premiers mois justifie la mise en place de séances de psychomotricité ou kinésithérapie motrice. Un déficit auditif (central ou périphérique) doit être recherché en cas de retard de langage, en particulier si le langage n'est pas apparu à 18 mois. Une rééducation orthophonique sera souvent nécessaire et une approche individualisée est nécessaire, avec un suivi régulier des étapes du développement psychomoteur et des compétences cognitives et

adaptatives. Vers 5 ans, une évaluation psychométrique formelle est souhaitable, avant l'entrée en école élémentaire, pour évaluer les prérequis aux apprentissages scolaires, ajuster l'orientation et demander éventuellement une aide humaine (auxiliaire de vie scolaire (AVS)). De même, une évaluation régulière du langage et une prise en charge orthophonique précoce sont souvent nécessaires. Le choix du type de scolarité le plus adapté à l'enfant doit prendre en compte ses déficiences mais aussi ses compétences cognitives et affectives, pour stimuler ses apprentissages sans qu'il perde confiance en lui et se démotive. Il faut savoir réévaluer une décision d'orientation si l'enfant est en difficulté.

Une consultation auprès **d'un dermatologue** peut être organisée au décours du diagnostic :

- S'il existe un retentissement fonctionnel ou esthétique (sècheresse cutanée, kératodermie palmoplantaire, kératose pilaire, hyperhidrose...).
- S'il existe de nombreux nævimélanocytaires (« grains de beauté ») pouvant nécessiter un suivi spécialisé. Les nævi mélanocytaires sont souvent plus nombreux chez les patients atteints de RASopathies. Bien qu'un sur-risque de mélanome ne soit pas démontré dans cette population, la protection solaire chez les malades présentant une peau sensible aux UV (phototype clair) et le suivi des nævimélanocytaires doivent être particulièrement rigoureux.

Sur le plan orthopédique : La statique rachidienne doit être systématiquement surveillée cliniquement, en particulier au début de la puberté et en cas de traitement par GH. En cas de déformations du thorax (pectus excavatum ou thorax en entonnoir), Une correction chirurgicale peut être envisagée à partir de l'âge de 10 ans, en fonction de la demande esthétique des familles. Des explorations fonctionnelles respiratoires et un scanner thoracique sont indispensables avant

toute intervention chirurgicale ainsi qu'un bilan hématologique vu le risque hémorragique.

Pour la scoliose : En cas de courbure évolutive supérieure à 20°, un avis sera demandé à l'orthopédiste pédiatre. Chez l'enfant immature, le traitement sera orthopédique, à l'aide de corsets essentiellement nocturnes. En cas d'évolution malgré le traitement orthopédique, des corsets diurnes pourront être ajoutés, éventuellement relayés par des séries de plâtres. Les indications de traitement chirurgical le plus souvent en fin de croissance, en fonction de l'angle de la déformation (> 45°), du déséquilibre clinique et de la demande cosmétique. En cas de traitement chirurgical envisagé pour scoliose, une malformation de Chiari devra systématiquement être recherchée car elle augmente le risque de complication

Une visite chez le **stomatologiste-dentiste** est nécessaire pour en cas de micrognathie, une malocclusion des arcades dentaires, des dents incluses, une anomalie de position des incisives, une maladie des gencives (parodontopathie) et des tumeurs à cellules géantes des maxillaires (chérubisme). En raison du risque carieux important lié à des facteurs aggravants comme le reflux gastroœsophagien, les prises alimentaires longues et les difficultés à assurer l'hygiène bucco-dentaire en cas de déficience intellectuelle, il est important de mettre en place dès l'apparition des premières dents temporaires un programme de santé et d'hygiène bucco-dentaire et de suivi. L'éducation aux gestes d'hygiène bucco-dentaire, au brossage effectué par un parent et ensuite supervisé est à mettre en place précocement. L'utilisation de dentifrice fluoré est à proposer. Des visites régulières chez le dentiste (2 à 4 fois par an) sont nécessaires. Elles pourront être espacées en fonction de l'évolution du risque carieux. Un bilan orthodontique précoce permet de prendre en charge les troubles de l'occlusion liés notamment à l'hypodéveloppement mandibulaire. Des thérapeutiques fonctionnelles pour stimuler

la croissance mandibulaire pourront être utilisées. En cas de soins dentaires, il faut prévoir la prévention d'une endocardite infectieuse en cas de cardiopathie. La prévention des saignements excessifs en cas de trouble de la coagulation impliquant le facteur Willebrand est faite selon les recommandations utilisées pour la maladie de Willebrand.

Les **troubles ophtalmologiques** classiques (myopie, strabisme...) sont très fréquents. Ils doivent être dépistés précocement et systématiquement. Les examens systématiques recommandés pour la population générale sont réalisés

- La première semaine de vie (en général par le pédiatre de la maternité qui alertera l'ophtalmologiste en cas d'anomalie évidente)
- À 9 mois (car les capacités visuelles sont évaluables)
- À 2 ans et demi (avec l'importance de dépister une amblyopie)
- À 6 ans (à l'entrée au CP). Tout signe d'appel (strabisme, nystagmus, reflet anormal de la pupille...) implique un examen rapide sans suivre le calendrier classique.

Pour ce qui est du ptosis, le monitoring de la réfraction et de l'acuité visuelle sont indispensables. Si le ptosis entrave l'axe visuel, une amblyopie peut se développer : dans ce cas il y a une indication chirurgicale pour dégager le ou les axes visuels.

Il est également indispensable de dépister les **problèmes auditifs** précocement en raison de leurs impacts sur l'acquisition du langage et le comportement de l'enfant.

La prise en charge d'une déficience auditive est assurée par les services d'ORL spécialisés et ne présente pas de spécificité en fonction du syndrome sous-jacent. Les infections ORL sont fréquentes et doivent être traitées agressivement.

Du côté néphrologique, au diagnostic, il faut rechercher les malformations de

l'arbre urinaire. En cas d'anomalie, le suivi est adapté à la gravité de l'anomalie, selon les protocoles standards.

Hématologie et immunologie : Le bilan de base initial doit comprendre une numération formule sanguine (NFS) et un bilan de coagulation comprenant un bilan standard : plaquettes, TP, TCA, fibrinogène, les dosages des facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, étude du facteur Willebrand et éventuellement un temps d'occlusion plaquettaire (TO). La numération plaquettaire doit être monitorée tous les 6 mois en cas de traitement par l'acide valproïque. En cas de manifestations hémorragiques En cas de diathèse hémorragique évidente (ecchymoses multiples, saignements muqueux ou post-opératoires) et allongement du TO, une étude des fonctions plaquettaires est indispensable (agrégations plaquettaires et étude des plaquettes par cytométrie de flux).

Pour le **syndrome myélodysplasique** : Les manifestations initiales en sont une hyperleucocytose avec monocytose ($>10^9$ /L), myélémie et blastose sanguine, souvent accompagné d'une hépato- ou d'une splénomégalie. Si ces anomalies sont détectées chez un nourrisson bien portant, il doit être référé en urgence vers une consultation spécialisée en hématologie pédiatrique. Le dépistage systématique des syndromes myélodysplasiques est discuté : il a été suggéré de réaliser une NFS tous les 6 mois jusqu'à 2 ans ou 2 ans et demi. Au-delà de cet âge, aucun examen systématique n'est recommandé.

En cas d'**anesthésie** pour geste chirurgical, un bilan de coagulation doit être proposé systématiquement dans le syndrome de Noonan. Chez les patients sans mutation identifiée, il a été recommandé de doser les CPK. En effet, certains patients atteints d'une forme d'hyperthermie maligne présentent une dysmorphie évoquant un syndrome de Noonan. Cette association (appelée syndrome de King-Denborough) n'a jamais été rapportée chez des patients dont le diagnostic est

confirmé par la présence d'une mutation d'un gène de syndrome de Noonan.

Et dans le cadre d'un **diagnostic prénatal**, Le caractère peu spécifique des signes anténataux, la complexité moléculaire des RASopathies et leur rareté expliquent pourquoi le diagnostic prénatal du syndrome de Noonan est rarement envisagé en l'absence d'antécédents familiaux. Il est d'ailleurs probable que certains cas de RASopathies à révélation anténatale ayant une issue défavorable (mort fœtal ou interruption médicale de grossesse) restent sous diagnostiqués.

Une demande de diagnostic prénatal en raison d'antécédents familiaux nécessite une consultation de génétique et une discussion en Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN). Il faut intégrer à la réflexion le vécu familial du parent atteint, l'existence d'un apparenté sévèrement affecté... Si une mutation a été identifiée chez le patient index, le diagnostic pourra être proposé sur biopsie trophoblastique ou ponction du liquide amniotique, avec une très grande fiabilité.

5. Conseil génétique:

Le syndrome de Noonan dû à un variant sur le gène *PTPN11* présente une hérédité autosomique dominante, ce qui induit chez un patient atteint de ce syndrome, 50% de risque de transmission à sa descendance quel que soit leur sexe. En cas de survenu de novo de ce syndrome chez un enfant (Parents non porteurs du variant), le risque de récurrence dans la fratrie est de l'ordre de 1% qui est une estimation de la présence d'une éventuelle mosaïque germinale chez les parents, dans ce cas, un diagnostic prénatal peut être proposé si le couple est demandeur pour les rassurer.

Conclusion

Notre étude décrit la plus large série de patients atteints du syndrome de Noonan au Maroc du au gène majoritaire *PTPN11*, et rejoint ce qui a été rapporté préalablement par la littérature tant qu'au niveau clinique et moléculaire. Cependant, la limitation au séquençage Sanger explique le nombre de patients négatifs malgré un tableau clinique convaincant.

Grâce aux nouvelles technologies du séquençage en haut débit d'ADN, le syndrome de Noonan, n'est plus restreint uniquement aux variants au niveau du gène *PTPN11*, il est également le résultat de différentes altérations au niveau de la cascade moléculaire Ras–Mapkinase et fait ainsi partie de la grande famille des Rasopathies, et face à la variabilité d'expression et la large diversité clinique chez les patients NS, le séquençage en haut débit a permis également grâce à de larges cohorte de patients la réalisation de corrélation génotype–phénotype et de documenter pour chaque gène un tableau clinique assez caractéristique.

La mise en place du séquençage en haut débit d'un panel des gènes connus responsables du spectre des Rasopathies dans notre unité de génétique permettra d'améliorer le taux diagnostique de nos patients, d'explorer le spectre mutationnel spécifique à notre population marocaine et permettra de tracer une meilleure corrélation phénotype–génotype et bien évidemment ceci nous offrira à nos patients une prise en charge personnalisée et un conseil génétique adapté.

Bibliographies

1. Noonan, J. A. Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. *Am. J. Dis. Child.* 1960 **116**, 373–380 (1968).
2. Tartaglia, M. *et al.* Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* **29**, 465–468 (2001).
3. Tartaglia, M. *et al.* PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype–phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1555–1563 (2002).
4. Tartaglia, M., Zampino, G. & Gelb, B. D. Noonan Syndrome: Clinical Aspects and Molecular Pathogenesis. *Mol. Syndromol.* **1**, 2–26 (2010).
5. El Bouchikhi, I. *et al.* Noonan syndrome–causing genes: Molecular update and an assessment of the mutation rate. *Int. J. Pediatr. Adolesc. Med.* **3**, 133–142 (2016).
6. Roberts, A. E., Allanson, J. E., Tartaglia, M. & Gelb, B. D. Noonan syndrome. *Lancet Lond. Engl.* **381**, 333–342 (2013).
7. Pannone, L. *et al.* Structural, Functional, and Clinical Characterization of a Novel PTPN11 Mutation Cluster Underlying Noonan Syndrome. *Hum. Mutat.* **38**, 451–459 (2017).
8. Haute Autorité de Santé – RASopathies : syndromes de Noonan, cardio–facio–cutané et apparentés. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2679254/fr/rasopathies-syndromes-de-noonan-cardio-facio-cutane-et-apparentes. (Accessed: 10th May 2019)
9. Noonan syndrome: an update on growth and development. – PubMed – NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29120925>. (Accessed:

10th May 2019)

10. Bessis, D. *et al.* Dermatological manifestations in Noonan syndrome: a prospective multicentric study of 129 patients positive for mutation. *Br. J. Dermatol.*(2018). doi:10.1111/bjd.17404
11. Cavé, H. Rasopathies. (22018).
12. El Bouchikhi, I. *Caractérisation moléculaire et bio-informatique des variants des gènes NKX2-5, GATA4 et PTPN11 impliqués dans les cardiopathies congénitales au niveau d'une population Marocaine.*(2017).
13. Allanson, J. E. & Roberts, A. E. Noonan Syndrome. in *GeneReviews*[®] (eds. Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, 1993).
14. Allanson, J. E. *et al.* The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype. *Am. J. Med. Genet. A.152A*, 1960–1966 (2010).
15. Allanson, J. E. Objective studies of the face of Noonan, Cardio-facio-cutaneous, and Costello syndromes: A comparison of three disorders of the Ras/MAPK signaling pathway. *Am. J. Med. Genet. A.170*, 2570–2577 (2016).
16. Pierpont, M. E. & Digilio, M. C. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Curr.Opin.Pediatr.30*, 601–608 (2018).
17. Cardiac findings in Noonan syndrome on long-term follow-up. – PubMed – NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750712>. (Accessed: 10th May 2019)
18. Hung, P.-C., Wang, H.-S. & Wong, A. M.-C. Moyamoya Syndrome in a Child with Noonan Syndrome. *Pediatr.Neurol.45*, 129–131 (2011).
19. van der Burgt, I. Noonan syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.2*, 4 (2007).
20. Pierpont, E. I. Neuropsychological Functioning in Individuals with Noonan Syndrome: a Systematic Literature Review with Educational and Treatment Recommendations. *J. Pediatr. Neuropsychol.2*, 14–33 (2016).

21. Verloes, A. & Cavé, H. Syndrome de Noonan et apparentés. *MédecineReprod.*12, 82–89 (2010).
22. Roelofs, R. L., Janssen, N., Wingbermhühle, E., Kessels, R. P. C. & Egger, J. I. M. Intellectual development in Noonan syndrome: a longitudinal study. *Brain Behav.*6, (2016).
23. Visual processing in Noonan syndrome: Dorsal and ventral stream sensitivity – Alfieri – 2011 – American Journal of Medical Genetics Part A – Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.a.34229>. (Accessed: 10th May 2019)
24. Pierpont, E. I. *et al.* The language phenotype of children and adolescents with Noonan syndrome. *J. Speech Lang. Hear. Res. JSLHR*53, 917–932 (2010).
25. Pierpont, E. I., Tworog–Dube, E. & Roberts, A. E. Learning and memory in children with Noonan syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.*161A, 2250–2257 (2013).
26. Seo, G. H. & Yoo, H.–W. Growth hormone therapy in patients with Noonan syndrome. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.*23, 176–181 (2018).
27. Tartaglia, M., Gelb, B. D. & Zenker, M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*25, 161–179 (2011).
28. First–year growth in children with Noonan syndrome: Associated with feeding problems? – PubMed – NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29575624>.
29. Comparison of effectiveness of growth hormone therapy according to disease–causing genes in children with Noonan syndrome. – PubMed – NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30514065>. (Accessed: 10th May 2019)

30. van Trier, D. C. *et al.* Ocular findings in Noonan syndrome: a retrospective cohort study of 105 patients. *Eur. J. Pediatr.* **177**, 1293–1298 (2018).
31. Guerin, A. *et al.* Expanding the clinical spectrum of ocular anomalies in Noonan syndrome: Axenfeld–anomaly in a child with PTPN11 mutation. *Am. J. Med. Genet. A.* **167A**, 403–406 (2015).
32. Schreurs, L. *et al.* First trimester cystic hygromacolli: Retrospective analysis in a tertiary center. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **231**, 60–64 (2018).
33. BHAMBHANI, V. & MUENKE, M. Noonan Syndrome. *Am. Fam. Physician* **89**, 37–43 (2014).
34. De Rocca Serra–Nedelec, A. *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.* (2012).

Résumé

Le syndrome de Noonan est l'un des maladies mendéliennes du développement les plus rapportées dans la littérature et les plus fréquemment rencontrées en consultation de génétique avec une prévalence estimée de 1/1000 à 1/2500, il est causé par une variation pathologique germinale à l'état autosomique dominant de certains gènes affectant la cascade moléculaire de la voie de transduction de signal Ras MAP-kinase (Ras-Mitogen-activatedprotein kinases) qui interfère avec des facteurs de croissance extracellulaire par le biais d'un récepteur membranaire pour le contrôle de la prolifération cellulaire. Les mutations germinales des gènes de cette voie de signalisation sont également responsables d'autres pathologies du développement constituant ainsi avec le syndrome de Noonan une entité nommée les « Rasopathies ». Au niveau somatique, les mutations activatrices de la voie Ras MAP-kinase sont retrouvées dans 30% des cancers humains.

Nous rapportons dans ce travail, la plus grande série marocaine du syndrome de Noonan qui ont bénéficié du séquençage du gène Protein-Tyrosine-Phosphatase Non Receptor type 11 (PTPN11), principal gène hébergeant plus de 50% des variations pathogéniques connus du syndrome de Noonan, à l'unité de génétique et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès. Nous décrivons également les aspects cliniques et moléculaires de ce syndrome ainsi que les recommandations de prise en charge et conseil génétique.

Noonan's syndrome is one of the most commonly reported Mendelian developmental diseases in the literature and most frequently encountered in genetic consultation with an estimated prevalence of 1/1000 to 1/2500, it is caused by a germ line pathological variation in the autosomal dominant state of genes affecting the molecular cascade of the Ras MAP-kinase (Ras-mitogen-activated protein kinases) signal transduction pathway which interferes with extracellular growth factors through a membrane receptor for cell proliferation control. Germ-line mutations in the genes of this signalling pathway are also responsible for other developmental pathologies thus constituting with Noonan syndrome an entity named "Rasopathy". At the somatic level, active mutations of the Ras MAP-kinase pathway are found in 30% of human cancers.

We report in this study, the largest Moroccan series of patients with Noonan syndrome, who have been sequenced for the Protein-tyrosine-phosphatase Non receptor type 11 gene (*PTPN11*), the main gene that hosts more than 50% of known pathogenic variations of Noonan's syndrome, at the genetics and oncogenetics unit of Fez Hassan II Hospital. We also describe the clinical and molecular aspects of this syndrome as well as recommendations for management and genetic counselling.