

كلية الطب والصيدلة وطب الأسنان  
FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET DE MÉDECINE DENTAIRE



جامعة سيدي محمد بن عبد الله - فاس  
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

Année 2022

Thèse N° 148/22

# LES ASPECTS GÉNÉTIQUE DU SYNDROME DE NOONAN (À propos de 59 cas)

THESE

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30/03/2022

PAR

M. LAHDILI MUSTAPHA

Né le 15 Février 1976 à BENI MELLAL

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE

MOTS-CLÉS :

**Syndrome de Noonan - Gène PTPN11 - Cardiomyopathie - Gène KRAS**

JURY

M. MAHMOUD MUSTAPHA ..... PRÉSIDENT  
Professeur de Microbiologie

Mme. BOUGUENOUGH LAILA..... RAPPORTEUR  
Professeur Agrégée de Génétique

M. AMRANI HASSANI MONCEF .....  
Professeur d'Hématologie

M. OULDIM KARIM.....  
Professeur de Génétique

Mme. BENNIS SANAË.....  
Professeur de Biologie cellulaire

JUGES

# PLAN

|   |           |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS.....   | 5         |
| LISTE DES FIGURES .....   | 8         |
| LISTE DES TABLEAUX .....  | 10        |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>  | <b>14</b> |
| I. Objectifs de l'étude .....   | 15        |
| Objectif principal :.....   | 15        |
| Objectifs secondaires :.....  | 15        |
| II . Type et durée de l'étude :.....  | 15        |
| III. Lieu de l'étude : .....  | 15        |
| IV. Population de l'étude : .....   | 16        |
| 1. Critères d'inclusion :.....  | 16        |
| 2. Critères d'exclusion :.....  | 16        |
| 3. Recueil des données : .....  | 16        |
| 4. Considération éthique :.....   | 17        |
| V – Déroulement de l'étude génétique : .....  | 17        |
| 1. Prélèvement :.....   | 18        |
| 2. Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques: .....        | 18        |
| 2.1 Principe.....   | 18        |
| 2.2. Protocole.....   | 18        |
| 3. Quantification de l'ADN par dosage .....   | 19        |
| 4. Amplification en chaine par polymérase (PCR) .....                               | 21        |
| 4.1 – Protocole :.....  | 21        |
| 5. Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose .....          | 24        |
| 6. Séquençage .....   | 24        |
| a. Purification du produit PCR par ExoSAP .....                                     | 24        |
| b. Réaction de séquençage par BigDye® Terminator V3.1 .....                         | 25        |
| c. Purification des produits de séquençage et détermination<br>de la séquence ..... | 27        |
| d. Outil bioinformatique .....  | 29        |
| <b>RESULTATS .....</b>  | <b>30</b> |
| A. Profil épidémiologique :.....  | 31        |
| 1. Les caractéristiques sociodémographiques :.....                                  | 31        |
| 1.1. L'âge au diagnostic .....  | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.2. Le sexe .....  | 32        |
| 1.3. Cas similaires dans la famille et notion de consanguinité .....    | 33        |
| 2. Données cliniques .....  | 34        |
| 2.1. Dysmorphie faciale .....   | 34        |
| 2.2. Manifestations cardiovasculaires .....                             | 35        |
| 2.3. Malformations associées .....                                      | 36        |
| 3. Résultats de l'analyse génétique.....                                | 37        |
| 3.1. Quantification de l'ADN extrait .....                              | 37        |
| 3.2. Amplification du gène PTPN11 et Kras par PCR .....                 | 37        |
| 3.3 Résultats de l'analyse moléculaire.....                             | 38        |
| 3.4. Résultats du séquençage des produits PCR purifiés du gène Kras ... | 39        |
| 4. Corrélation génotype-phénotype .....                                 | 42        |
| 4.1 Dysmorphie :.....   | 42        |
| 4.2 Atteinte cardiaque .....  | 42        |
| 4.3 Autres anomalies.....   | 43        |
| <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>ASPECTS CLINIQUES DU SYNDROME DE NOONAN .....</b>                    | <b>45</b> |
| <b>I. RAPPEL HISTORIQUE .....</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>II.EPIDEMIOLOGIE .....</b>   | <b>47</b> |
| A. La fréquence .....   | 47        |
| B. Le mode de transmission .....  | 47        |
| C. L'âge au diagnostic .....  | 48        |
| D. Le sexe .....  | 48        |
| E. Répartition géographique .....                                       | 48        |
| <b>III. Caractéristiques cliniques du syndrome de Noonan .....</b>      | <b>49</b> |
| A. Anomalies de la croissance .....                                     | 49        |
| B. Signes dysmorphiques .....   | 50        |
| C. Caractéristiques cardiovasculaires.....                              | 52        |
| D. Manifestations génito-urinaires et rénales.....                      | 53        |
| E. Troubles du développement psychomoteur et du comportement .....      | 53        |
| F. Atteinte ophtalmologique.....  | 54        |
| G. Anomalies musculo-squelettiques .....                                | 54        |
| H. Anomalies immuno-hématologiques et risque de cancers .....           | 55        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| I. Autres caractéristiques .....                       | 55        |
| a. Critères diagnostiques .....                        | 56        |
| b. Diagnostic différentiel .....                       | 57        |
| <b>ASPECTS MOLÉCULAIRES DU SYNDROME DE NOONAN.....</b> | <b>60</b> |
| 1. Physiopathologie et étiologie génétique .....       | 60        |
| 2. Analyse moléculaire :.....                          | 65        |
| <b>PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....</b>              | <b>70</b> |
| <b>CONSEIL GENETIQUE.....</b>                          | <b>72</b> |
| 1- pour les formes dominantes de NS :.....             | 72        |
| 2-pour les formes récessives de NS: .....              | 72        |
| <b>CONCLUSION .....</b>                                | <b>74</b> |
| <b>RESUME .....</b>                                    | <b>76</b> |
| <b>ANNEXE .....</b>                                    | <b>82</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>                              | <b>84</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

|       |   |
|-------|---|
| A     | Adénine   |
| A     | Alanine   |
| ADN   | Acide désoxyribonucléique                               |
| ASN   | Asparagine  |
| ASP   | Acide aspartique  |
| BDT   | Technology big dye terminator                           |
| BLAST | Basic local alignment search tool                       |
| BRAF  | V-raff murine sarcoma viral oncogene homolog b1         |
| C     | Cytosine  |
| C°    | Degre celsius   |
| CBL   | Lymphome de la lignee b de casitase                     |
| CFC   | Cardio-facio-cutane                                     |
| CHD   | Malformations cardiaque congenitales                    |
| CHU   | Centre hospitalier universitaire                        |
| CIA   | Communication inter-auriculaire                         |
| CIV   | Communication inter-ventriculare                        |
| CS    | Syndrome de costello                                    |
| CYS   | Cysteine  |
| DDATP | Didésoxyadenosine triphosphate                          |
| DDCTP | Didésoxycytosine triphosphate                           |
| DDGTP | Didésoxyguanosine triphosphat                           |
| DDTTP | Didésoxythymidine triphosphate                          |
| DNTP  | Didésoxynucléotide triphosphate                         |
| DO    | Densite optique   |
| DS    | Deviation standard                                      |
| ECG   | Electrocardiographie                                    |
| EDTA  | Ethylene diaminetriacetic acid                          |
| ETBR  | Bromure d ethidium                                      |
| G     | : gramme  |
| GABA1 | : Grb2 Adapter Binder 1                                 |
| GBR2  | : Protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance |
| GDP   | : Guanine di phosphate                                  |
| GEF   | : Facteur d'échange de guano sine nucléotide            |
| GLY   | : Glycine   |
| GTP   | : Guanine Triphosphate                                  |

---

|        |   |
|--------|---|
| HCM    | : Cardiomyopathie hypertrophique                      |
| JMML   | : Leucémie myelomonocytaire juvénile                  |
| KRAS   | : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog          |
| LS     | : Syndrome de Léopard                                 |
| Lys    | : Lysine  |
| M      | : Masculin  |
| MAPK   | : Protéine kinase activée par des agents mitogènes    |
| MC     | : Maladie cardiaque                                   |
| MEK    | : MAPK/ERK Kinase                                     |
| MEK1   | : Mitogen -activated protein kinase 1                 |
| MEK2   | : Mitogen -activated protein kinase2                  |
| Met    | : Méthionine  |
| Mg     | : Milligramme   |
| MgCl2  | : Chlorure de magnésium                               |
| MI     | : Millimètre  |
| Mm     | : Mili molaire  |
| Nacl   | : Chlorure de sodium                                  |
| NCBI   | : National center for biotechnology information       |
| NCFCFS | : Syndrome neuro-cardio-facio- cutanés                |
| NF1    | : Neuro-fibromateuse type 1                           |
| Nm     | : Nanomètre   |
| NRAS   | : Neuroblastoma ras viral                             |
| NS     | : Syndrome de noonan                                  |
| OMIM   | : Online Mendelian inheritance in man                 |
| Pb     | : paire de base                                       |
| Pcr    | : Polymérase Chain réaction                           |
| PS     | : sténose pulmonaire                                  |
| PTPN11 | : Protéine-tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 |
| QI     | : Quotient intellectuel                               |
| RAF    | : Fibrosarcome à accélération rapide                  |
| RAF1   | : V-raf-1 murine leucémie viral oncogène homologue 1  |
| Ras    | : Rat sarcoma viral oncogene homolog                  |
| RIT1   | : Ric-like protein without caax motif 1               |
| Rpm    | : Rotation par minute                                 |
| S      | : second  |
| Ser    | : Serine  |
| SHP2   | : Src homology phosphatase 2                          |
| SOS    | : Son of sevenless homolog                            |
| SOS1   | : Son of sevenless homolog 1                          |

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| SOS2 | : Son of sevenless homolog 2  |
| T    | : Thymine                     |
| T°   | : Température                 |
| Taq  | : Thermus aquaticus           |
| TBE  | : Tris borate EDTA buffer     |
| TKR  | : Récepteur à tyrosine kinase |
| TMP  | : Troubles myéloprolifératif  |
| Tyr  | : Tyrosine                    |
| Ug   | : Microgramme                 |
| Ul   | : Microlitre                  |
| Uv   | : Ultraviolet                 |
| Val  | : Valine                      |
| VWD  | : Maladie de Von Willebrand   |

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1** : Spectrophotomètre Nanovue utilisé dans le laboratoire de génétique médicale.

**Figure 2** : Protocole du séquençage des régions codantes des gènes *PTPN11* et *KRAS*  
D'après Applied Biosystems

**Figure 3** : Analyseur génétique AppliedBiosystem 3500Dx (UGMO) de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès.

**Figure 4** : Répartition des patients en fonction de l'âge au diagnostic

**Figure 5** : Répartition des patients en fonction du sexe.

**Figure 6**: Répartition des patients en fonction de la notion de consanguinité

**Figure 7** : Répartition des patients en fonction des signes dysmorphiques de la face

**Figure 8** : Répartition des patients en fonction des manifestations cardiovasculaires

**Figure 9**: Répartition des patients en fonction des malformations associées

**Figure10** : Résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR.

A1–A7 : Echantillons des patients NS : Marqueur de taille, pb : paires de bases, TN : Témoin négatif.

**Figure 11** : Chromatogrammes montrant les variants exoniques (c.182A>G,c.188A>G,c.214C>T,c.923A>G) détectés chez nos patients

**Figure 12** : Electrophorégramme d'un patient ne présentant pas de mutation dans l'exon 2 du gèneKras

**Figure 13** : alignement blast de la séquence obtenue de l'exon 2 du gène *Kras*

**Figure 14** : Electrophorégramme d'un patient ne présentant pas de mutations dans l'exon 3 du gène Kras

**Figure 15** : alignement blast de la séquence obtenue de l'exon 3 du gène *Kras*

**Figure 16** : Corrélation entre les 2 groupes de patients concernant l'atteinte cardiaque

**Figure 17** : Aspects cliniques typiques pour le syndrome de Noonan chez le nouveau né (A,B), l'enfant (C) et l'adulte (D). Les déformations caractéristiques du thorax chez le grand enfant figurent en E

**Figure 18** : Les principaux facteurs de la cascade moléculaire Ras MAP kinase

**Figure 19** : Organisation des gènes et des domaines protéiques impliqués dans le syndrome de Noonan

**Figure 20** : Organisation de *PTPN11* avec les exons et les domaines protéiques ainsi que l'emplacement des différents variants exoniques identifiés.

**Figure 21** : Alignement multiple de la séquence protéique de SHP-2 à travers différentes espèces avec l'emplacement des codons D61, Y63 et A72.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I** : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des exons 2, 3, 4, 7, 8, 12 et 13 du gène *PTPN11*

**Tableau II** : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des exons 2 et 3 du gène *KRAS*

**Tableau III** : Protocole expérimentale de la PCR du gène *PTPN11*

**Tableau IV** : Protocole expérimentale de la PCR du gène *KRAS*

**Tableau V** : Caractéristiques des variants de *PTPN11* identifiés dans la population Noonan

**Tableau VI** : Score de van Der Burgt 1994.

**Tableau VII** : Le diagnostic différentiel du syndrome de Noonan

# INTRODUCTION

Le syndrome de Noonan NS est une maladie génétique à transmission autosomique dominante, qui peut se présenter sous forme sporadique ou familiale. Il a été décrit pour la première fois par la cardiopédiatre Jacqueline NOONAN.

Le NS fait partie d'un groupe de maladies récemment nommé « RASopathies », est causé par des mutations du gène *PTPN11* observées dans 50 % des cas, *SOS1* dans 15 % des cas, et moins fréquemment dans d'autres gènes associés à la voie de signalisation RAS/MAPK. Le spectre clinique du NS peut différer légèrement selon les gènes responsables, et certaines formes ont été décrites comme Noonan-like .

Il peut affecter à des degrés divers presque tous les organes. De nombreuses manifestations de cette maladie sont présentes dès la naissance mais sont discrètes et peu spécifiques, retardant ainsi le diagnostic qui se fait souvent à un âge tardif (entre 5 et 10 ans)

De nombreuses maladies peuvent constituer le diagnostic différentiel de cette maladie, mais le syndrome de léopard reste le diagnostic différentiel le plus proche de ce syndrome. Le traitement reste symptomatique, une échocardiographie et un électrocardiogramme sont indispensables à la naissance pour dépister les anomalies cardiaques nécessitant un traitement ou un suivi spécialisé.

L'analyse génétique permet de confirmer le diagnostic clinique dans 80 à 90% des cas. Ce diagnostic précis reste important pour dépister ou exclure d'éventuelles maladies associées et mettre en route les bons traitements et une prise en charge adéquate. Il permet également de prodiguer un conseil génétique au patient et à sa famille.

Ainsi, nous avons estimé intéressant d'évaluer et de caractériser le taux des mutations du gène *PTNP11* et *Kras* chez les patients admis pour syndrome de NOONAN chez une population marocaine.

Cette étude permettrait de contribuer significativement à la recherche dans le volet de l'étiologie génétique du syndrome de Noonan au Maroc, qui est jusqu'alors très en retard par rapport aux pays développés.

# MATERIELS ET METHODES

## **I- Objectifs de l'étude**

### **Objectif principal :**

Etudier le lien entre le groupe génétique (génotype) retrouvé à l'étude moléculaire et les particularités cliniques (phénotype) chez les patients de notre série atteints du syndrome de Noonan : corrélation génotype-phénotype.

### **Objectifs secondaires :**

- Déterminer le profil épidémiologique, clinique et génétique des patients de notre série atteints du syndrome de Noonan.
- Prodiguer un conseil génétique adéquat à nos patients et leurs familles en fonction du résultat de l'étude moléculaire.

## **II . Type et durée de l'étude :**

Il s'agit d'une étude rétrospective – transversale, descriptive et analytique ; menée sur une durée 5 ans : de Juin 2016 à Juin 2021.

## **III. Lieu de l'étude :**

L'étude a inclut les cas de Noonan suivis au sein du service de pédiatrie du CHU HASSAN II de Fès et adressés au service de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès pour étude génétique.

## **IV. Population de l'étude :**

### **1. Critères d'inclusion :**

Les cas de Noonan diagnostiqués cliniquement et chez qui une confirmation par biologie moléculaire a été établie au niveau de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique ; ayant accepté de participer à notre étude. La sélection des patients a été fondée sur les critères de Van Der Burgt .

### **2. Critères d'exclusion :**

- Le principal critère d'exclusion était un caryotype anormal. Ce critère est particulièrement critique chez les filles, vu le chevauchement des signes de Turner et de Noonan. Ainsi les patientes de sexe féminin avec suspicion de Noonan ont bénéficié d'un caryotype préalable.
- Les dossiers inexploitable – incomplets.
- Les patients ayant refusé de participer à notre étude.

### **3. Recueil des données :**

Le recueil des données épidémiologiques, cliniques et paracliniques a été réalisé au sein des services de génétique médicale du CHU HASSAN II de Fès à partir du système « HOSIX » et des dossiers des patients atteints de Noonan inclus dans l'étude.

Les données recueillies sont :

- ✓ Nom ;
- ✓ Prénom ;
- ✓ Sexe ;
- ✓ Date de naissance ;
- ✓ Origine géographique ;

- ✓ Consanguinité et antécédents familiaux ;
- ✓ Age au diagnostic ;
- ✓ Circonstances de découverte ;
- ✓ Poids et taille ;
- ✓ Développement psycho moteur
- ✓ Dysmorphie faciale ;
- ✓ Manifestations cardiaques ;
- ✓ Malformations associées ;

Une fiche d'exploitation (voir ANNEXE) a été établie pour chaque patient permettant le recueil des données nécessaires à l'analyse statistique afin de répondre aux objectifs de notre étude.

#### **4. Considération éthique :**

Après avoir expliqué à nos patients l'intérêt de l'étude génétique dans leur prise en charge et les objectifs de notre travail ; le consentement libre et éclairé des patients et des parents ou tuteurs légaux pour les mineurs a été obtenu afin de les inclure dans notre étude.

La confidentialité des données a été respectée au cours des différentes étapes de cette étude.

#### **V – Déroulement de l'étude génétique :**

Pour cette étude, nous avons commencé par une analyse des 7 exons hébergeant les hotspots du gène *PTPN11* par *PCR séquençage* chez l'ensemble des patients recrutés. Par la suite une analyse du gène *KRAS* a été réalisée chez les patients chez qui aucune mutation pathogène n'a été identifiée.

## **1. Prélèvement :**

Le sang prélevé est mis dans deux tubes EDTA de 5 ml chacun, pour l'extraction de l'ADN qui peut se faire par « Kit » ou par « Sel ».

Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou à -20°C pour utilisation ultérieure.

## **2. Techniques de préparation et de purification des acides nucléiques:**

### **2.1 Principe**

Les kits d'ADN génomique PureLink sont basés sur la liaison sélective de l'ADN à la membrane à base de silice en présence de sels chaotropiques. Le lysat est préparé à partir du sang. Les cellules sont digérées avec de la protéinase K à 55°C en utilisant une formulation optimisée de tampon de digestion qui facilite la dénaturation des protéines et renforce l'activité de la protéinase K. Le lysat est mélangé avec de l'éthanol et du tampon de liaison génomique PureLink qui permet une forte liaison de l'ADN à la colonne de rotation. [1]

L'ADN se lie à la membrane à base de silice de la colonne, et les impuretés sont éliminées par un lavage profond avec des tampons de lavage. L'ADN génomique est ensuite élué dans le tampon d'élution à faible teneur en sel.

Cette technique est simple, plus rapide et avantageuse lorsque le volume de sang est faible. [1]

### **2.2 Protocole**

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, 200µl de sang sont mélangés avec 20µl de protéinase k et 200µl de solution de lyse ; ils sont vortexés puis incubés pendant 10min à 60°C. Une série de lavages est effectuée en utilisant d'abord 200µl d'éthanol absolu. Après cela, le mélange est remis dans une colonne PureLink® Spin et centrifugé pendant 1min à 8000rpm. Le tube de collecte fourni dans le kit doit être jeté à chaque fois. Un deuxième lavage est effectué avec 400µl de Wash Buffer1, le

mélange est centrifugé pendant 1 min à 8000rpm. Le dernier lavage est effectué avec 400µl de Wash Buffer2 et centrifugé pendant 3min à 14000rpm.

La colonne est placée dans un tube Eppendorf de 1,5ml, et 70µl de tampon d'élution sont ajoutés. L'incubation est réalisée pendant 1 min à température ambiante. Une centrifugation finale de 1min à 8000rpm est réalisée pour récupérer l'ADN génomique purifié. [1]

### 3. Quantification de l'ADN par dosage

La concentration de l'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie ; en mesurant la densité optique à 260 nm (DO260 nm), dont laquelle les bases puriques et pyrimidiques absorbent, tandis que les protéines absorbent à 280 nm. La densité optique (DO) à 280 nm déterminera une éventuelle contamination protéique. Ainsi, le rapport DO260/DO280 est utilisé pour estimer la pureté de l'ADN. Un ADN extrait est considéré comme pur lorsqu'il présente un rapport DO260/DO280 compris entre 1,8 et 2.

Dans le laboratoire de génétique médicale, le spectrophotomètre NanoVue Plus est l'appareil utilisé pour mesurer la concentration d'ADN. Il suffit de pipeter des échantillons d'ADN de 1 à 2 µl directement sur la plaque d'échantillonnage pour mesurer la concentration d'ADN. [1]



Figure 1 : Spectrophotomètre Nanovue utilisé dans le laboratoire de génétique médicale.

## 4. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

### 4.1 – Protocole :

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la recherche de mutations dans les exon2, 3, 4, 7, 8, 12, et 13 du gène *PTNP11* ainsi que les exons 2 et 3 du gène *Kras*. Les amorces utilisées pour amplifier ces régions sont représentées dans les tableaux 1 et 2. [1]

**Tableau I :** Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des exons 2, 3, 4, 7, 8, 12 et 13 du gène *PTNP11*

| 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  | GAACATTTCTAGGATGAATTCC   | GAACATTTCTAGGATGAATTCC   | 271                       | 97                    |
| Exon 8  | GACATCAGGCAGTGTTCACGTTAC | GACATCAGGCAGTGTTCACGTTAC | 350                       | 80                    |
| Exon 12 | GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC | GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC | 250                       | 68                    |
| Exon 13 | CAACACTGTAGCCATTGCAACA   | ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG | 356                       | 152                   |

**Tableau II :** Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des exons 2 et 3 du gène *KRAS*

| Exon | Amorce F               | Amorce R              | T (°C) | Taille (bp) |
|------|------------------------|-----------------------|--------|-------------|
| 2    | GATACACGTCTGCAGTCAACTG | GGTCCTGCACCAGTAATATGC | 58     | 340         |
| 3    | GTGCACTGTAATAATCCAGACT | CATGGCATTAGCAAAGACTCA | 56     | 300         |

Cette réaction PCR est effectuée en utilisant le kit "DreamTaq Green PCR" qui est une solution prête à l'emploi contenant : ADN polymérase DreamTaq, tampon DreamTaq Green optimisé, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, et eau (Water nuclease-free).

Pour chaque échantillon, un milieu réactionnel est préparé dans un tube Eppendorf. La composition de chaque tube Eppendorf est détaillée dans les tableaux 3 et 4.

Pour chaque essai de PCR, un témoin négatif exempt d'ADN a été associé à l'ensemble des échantillons traités, ce qui permet de contrôler la qualité de la manipulation et s'assurer de l'absence des contaminants d'acides nucléiques.

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1 min, puis déposés dans un thermocycleur (Applied Biosystem) ; l'amplification est réalisée en 35 cycles de température, précédés d'une étape initiale de dénaturation de 3 min à 95°C, et complétés par une étape finale d'élongation de 9 min à 72°. [1]

**Tableau III** : Protocole expérimentale de la PCR du gène *PTPN11*

| Conditions expérimentales*   |                |              | Programme de PCR <i>PTPN11</i> ** |                   |       |                   |      |       |   |
|--|----------------|--------------|-----------------------------------|-------------------|-------|-------------------|------|-------|---|
| Réactifs   | Concentrations | Volumes (µl) | Etapes                            | Températures (°C) | Durée | Nombres de cycles |      |       |   |
| Tampon   | 10 X           | 2.5          | Dénaturation initiale             | 94                | 8 mn  | 1                 |      |       |   |
| MgCl <sub>2</sub>  | 50 mM          | 1            |                                   |                   |       |                   |      |       |   |
| dNTP   | 10 mM          | 1            |                                   |                   |       |                   |      |       |   |
| Amorces:<br>Exon 2,<br>Exon 3,<br>Exon 4,<br>Exon 7,<br>Exon 8,<br>Exon 12,<br>Exon 13 | Sens           | 10 mM        | 1                                 | Hybridation:      | 30 s  | 35                |      |       |   |
|  | Anti-sens      | 10 mM        | 1                                 |                   |       |                   |      |       |   |
| Taq  | 5 u/µl         | 0.2          | Elongation                        |                   |       |                   | 72°C | 40 s  |   |
| ADN  | 60 ng/µl       | 1            |                                   |                   |       |                   |      |       |   |
| H <sub>2</sub> O   | -              | qsp          |                                   |                   |       |                   |      |       |   |
| Volume total   | 25 µl          |              | Elongation finale                 |                   |       |                   | 72°C | 10 mn | 1 |

\* Kit PCR de Invitrogen, \*\*Thermocycleur de type the Veriti 96-well Thermal Cyclers 9902 (Applied Biosystems)

Tableau IV : Protocole expérimentale de la PCR du gène *KRAS*

| Conditions expérimentales*     |                |              | Programme de PCR <i>KRAS</i> ** |                   |       |                   |      |       |   |
|--------------------------------|----------------|--------------|---------------------------------|-------------------|-------|-------------------|------|-------|---|
| Réactifs                       | Concentrations | Volumes (µl) | Etapes                          | Températures (°C) | Durée | Nombres de cycles |      |       |   |
| Tampon                         | 10 X           | 2.5          | Dénaturation initiale           | 94                | 8 mn  | 1                 |      |       |   |
| MgCl <sub>2</sub>              | 50 mM          | 1            |                                 |                   |       |                   |      |       |   |
| dNTP                           | 10 mM          | 1            |                                 |                   |       |                   |      |       |   |
| Amorces:<br>Exon 2,<br>Exon 3, | Sens           | 10 mM        | 1                               | Hybridation:      | 30 s  | 35                |      |       |   |
|                                | Anti-sens      | 10 mM        | 1                               |                   |       |                   |      |       |   |
| Taq                            | 5 u/µl         | 0.2          | Elongation                      |                   |       |                   | 72°C | 40 s  |   |
| ADN                            | 60 ng/µl       | 1            |                                 |                   |       |                   |      |       |   |
| H <sub>2</sub> O               | -              | qsp          |                                 |                   |       |                   |      |       |   |
| Volume total                   | 25 µl          |              | Elongation finale               |                   |       |                   | 72°C | 10 mn | 1 |

\* Kit PCR de Invitrogen, \*\*Thermocycleur de type the Veriti 96-well Thermal Cyclers 9902 (Applied Biosystems)

## 5. Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose à 2% : 2g de gel d'agarose sont pesés et mélangés à 100ml du tampon de gel TBE (45 mM Tris-borate ; 1 mM EDTA). Le mélange agarose/tampon est fondu par chauffage au micro-ondes jusqu'à ébullition et obtention d'un liquide transparent. 4µl de bromure d'éthidium (EtBr) sont ajoutés. Le mélange est versé ensuite dans un plateau de coulée de gel avec un peigne. Les puits formés au sein du gel permettent de déposer les échantillons à tester (produits PCR). Après refroidissement (environ 30min), le gel est ensuite placé dans la boîte à gel remplie du tampon de migration.

Mise en place de l'appareil à gel et séparation des fragments d'ADN : 6 µl du produit PCR sont déposés directement au fond du puits de gel. le cathode (fils noirs) étant plus proche des puits que l'anode (fils rouges).

Visualisation des produits PCR par lumière ultraviolette : Après que les produits PCR ont migré, le gel est retiré du plateau de coulée du gel et exposé à la lumière UV. Les bandes d'ADN doivent apparaître sous forme de bandes fluorescentes orange.

Si les résultats de la PCR sont concluants, un séquençage est effectué pour détecter les mutations génétiques.

## 6. Séquençage

### a. Purification du produit PCR par ExoSAP

Avant de séquencer l'ADN, le produit d'amplification à séquencer doit être purifié. Pour notre étude, nous avons utilisé le kit ExoSAP pour purifier notre ADN préalablement amplifié.

l'exoSAP (Exonuclease and Shrimp alkaline phosphatase) qui utilise deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. L'exonucléase I supprime les amorces simples brin résiduelles et tous les ADNs simple brin étrangers produits dans la PCR. La phosphatase alcaline supprime les dNTPs restant dans le mélange de

la PCR. Pour la purification de nos produits PCR, 2,5µl d'exoSAP étaient ajoutés directement à 5.5µl de produit PCR et le tout était incubé à 37°C pendant 5 min. Le réactif ExoSAP était ensuite inactivé par un simple chauffage à 80°C pendant 1 min.

[1]

#### **b. Réaction de séquençage par BigDye® Terminator V3.1**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer la séquence des nucléotides (A, C, G et T) qui composent une molécule d'ADN donnée. Actuellement, c'est devenu une technique de routine dans les laboratoires de biologie moléculaire. Dans notre étude, nous nous sommes basés sur la méthode SANGER pour le séquençage.

Le principe du séquençage SANGER est d'effectuer une réaction PCR spécifique (réaction de séquence) contenant, en plus des réactifs habituels, quatre types de didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) marqués par différents fluorochromes qui bloquent la réaction PCR et conduisent à la libération de fragments de tailles différentes qui contiennent tous un des ddNTP à la fin de leurs séquences respectives. La fluorescence émise par les différents ddNTP sera captée et transformée en un pic de différentes couleurs correspondant à la séquence de bases relative à chaque patient.

La technologie BigDyeTerminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés au même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est la fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelée fluorochrome donneur, commune aux quatre ddNTP. Le second est la dichloroRhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. De plus, le spectre d'émission de la dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP ce qui rend le spectre de la fluorescence émise, spécifique de chaque type de ddNTP.

La composition du mélange réactionnel de la PCR séquencée ainsi que les conditions de programmation sont résumées dans le tableau 5. [1]

## Purification du produit PCR

### Protocole expérimental

| Réactifs    | Volumes (µl) |
|-------------|--------------|
| Produit PCR | 4            |
| ExoSap      | 1,5          |

### Programme du thermocycleur

| Température | Durée (mn) | cycles |
|-------------|------------|--------|
| 37°C        | 30         | 1      |
| 80°C        | 15         | 1      |

## Réaction de séquence

### Protocole expérimental

| Réactifs                      | Volumes (µl) |
|-------------------------------|--------------|
| Tampon                        | 2            |
| Eau pure                      | 1            |
| Amorce (sens<br>Ou anti-sens) | 1            |
| BigDye                        | 2            |
| Produit PCR<br>purifié        | 4            |

### Programme du thermocycleur

| Température | Durée | cycles |
|-------------|-------|--------|
| 96°C        | 10 s  |        |
| 50°C        | 5 s   | 25     |
| 60°C        | 3 mn  |        |

## Purification du produit de la réaction de séquence

### Protocole expérimental

| Réactifs                              | Volumes (µl) |
|---------------------------------------|--------------|
| X-Terminator                          | 10           |
| Sam (Tampon)                          | 45           |
| Produit de<br>réaction<br>de séquence | 10           |

### Programme

| Programme      | Vitesse (RPM) | Durée (mn) |
|----------------|---------------|------------|
| Vortexe        | 8 000         | 30         |
| Centrifugation | 13 000        | 3          |

## Electrophorèse automatisée

Déposer 20 µl du surnageant des différents échantillons dans les puits de la plaque du séquenceur. Lancer le programme du séquenceur. Le logiciel convertit au fur et à mesure les signaux captés en succession de pics de couleurs correspondant aux nucléotides détectés.

**Figure 2** : Protocole du séquençage des régions codantes des gènes *PTPN11* et *KRAS* D'après Applied Biosystems

**c. Purification des produits de séquençage et détermination de la séquence**

Une fois la réaction de séquençage terminée, il est nécessaire de purifier les produits séquencés. Pour cette purification, le kit BigDye® Xterminator™ a été utilisé. Ce kit est composé de deux réactifs : l'un contenant " SAM Solution " (à conserver à température ambiante ou 4°C) et l'autre " XTerminator Solution " (à conserver à 4°C). Ce kit permet la capture de colorants non incorporés dans la réaction de séquence, de sels et d'autres molécules chargées qui peuvent interférer avec la détection des bases par électrophorèse capillaire.

Pour cette étude, 45µl de la solution de SAM et 10µl de la solution de XTerminator ont été ajoutés aux produits de réaction de séquence. Ce mélange est vortexé pendant 30 min à 1800rpm, puis centrifugé pendant 3 min à 10000rpm. Après cela, 10 µl du surnageant de chaque tube sont pipetés et placés sur une plaque ( MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate).

Cette plaque de réaction est placée dans l'analyseur d'ADN Applied Biosystems disponible au laboratoire (Figure 2). Les électrophérogrammes sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Sequencing Analyzing et comparés aux bases de données.



**Figure 3** : Analyseur génétique AppliedBiosystem 3500Dx (UGMO) de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès.

#### **d. Outil bioinformatique**

La bioinformatique devient un outil indispensable pour le traitement des données dans les laboratoires de biologie moléculaire. Cependant, les résultats de la biologie moléculaire sont toujours mis en avant par les outils bioinformatiques.

Dans cette étude, nous avons utilisé les sites et bases de données suivants :

- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) :

Les séquences des différents patients ont été alignées avec celles de la base de données du NCBI via l'outil BLAST. En résumé, le principe de cet outil est d'identifier les séquences homologues en effectuant une recherche dans une ou plusieurs bases de données habituellement hébergées par le NCBI sur la séquence d'intérêt recherchée. Après cette analyse, BLAST présente l'information de la séquence la plus homologue avec le pourcentage d'identité correspondant. Il affiche également l'alignement détaillé des séquences homologues.

- Logiciel NCBI (CCDS database) :

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

- Logiciel NCBI (CCDS variation viewer) :

Dès que la mutation est localisée, ce logiciel permet d'évaluer l'impact clinique de celle-ci (pathogénique ou pas), son origine (germinale ou somatique), son positionnement sur le génome entier et si elle a déjà été rapportée dans la littérature.

# RESULTATS

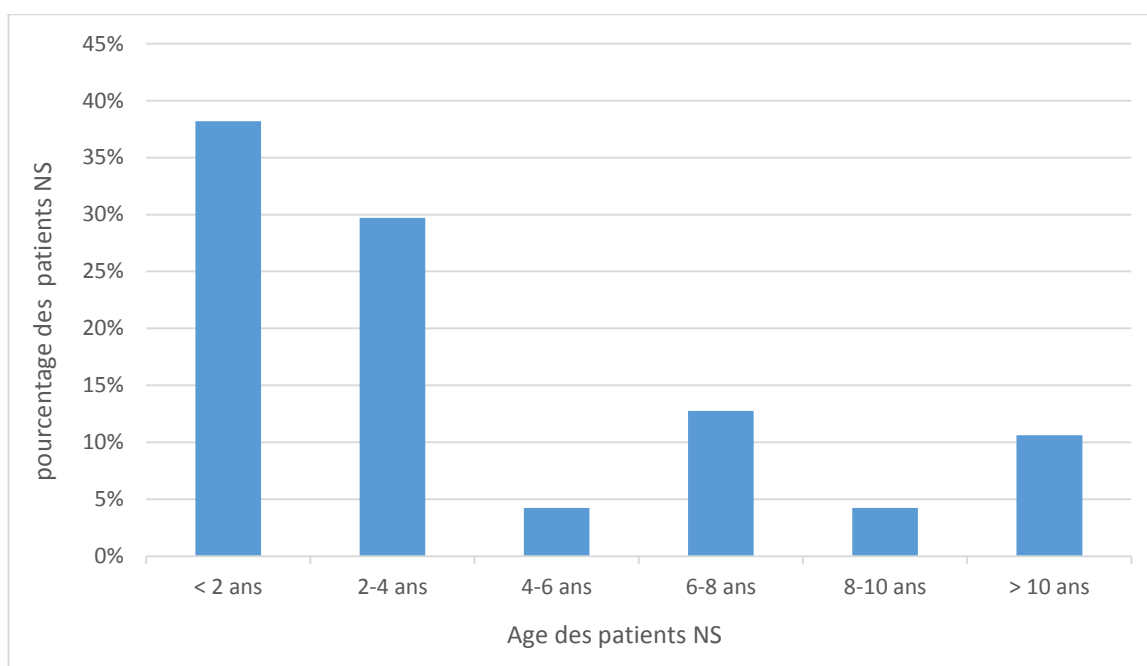
Notre étude a été menée sur un échantillon de 59 patients non apparentés, adressés pour suspicion clinique d'un syndrome de Noonan.

## A. Profil épidémiologique :

### 1. Les caractéristiques sociodémographiques :

#### 1.1. L'âge au diagnostic

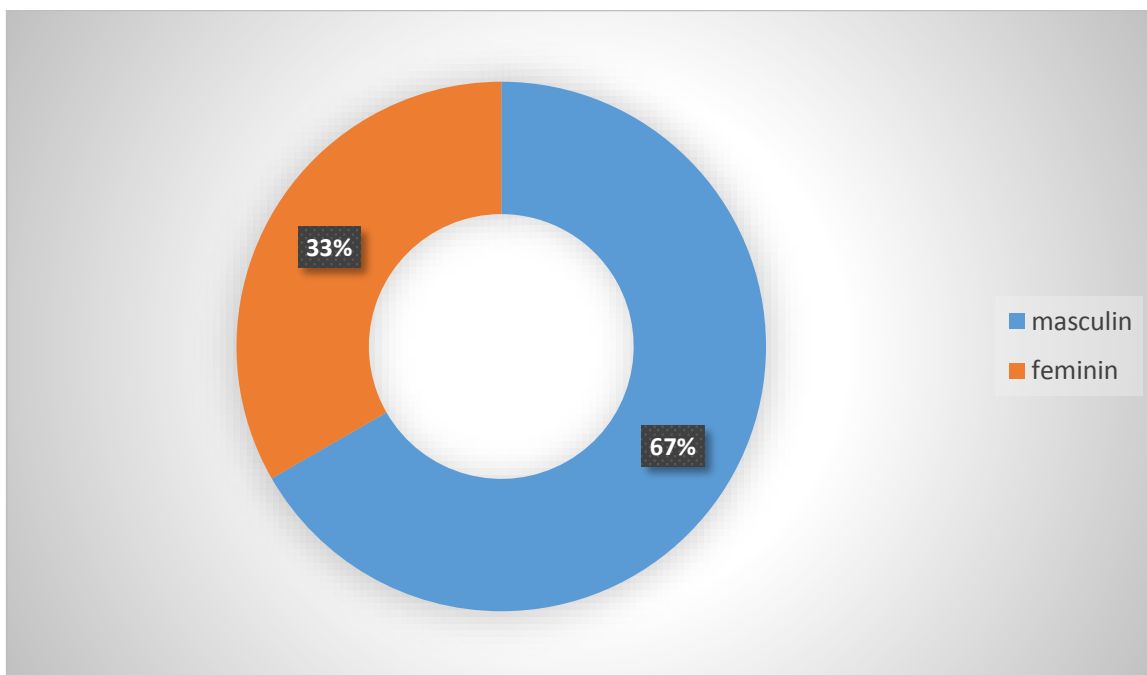
Les caractéristiques phénotypiques du SN peuvent varier en fonction de l'âge du patient. En outre, la fourchette d'âge des patients de notre série allait de 2 jours à 14 ans, avec un âge médian de 4 ans.



**Figure 4 :** Répartition des patients en fonction de l'âge au diagnostic

## 1.2. Le sexe

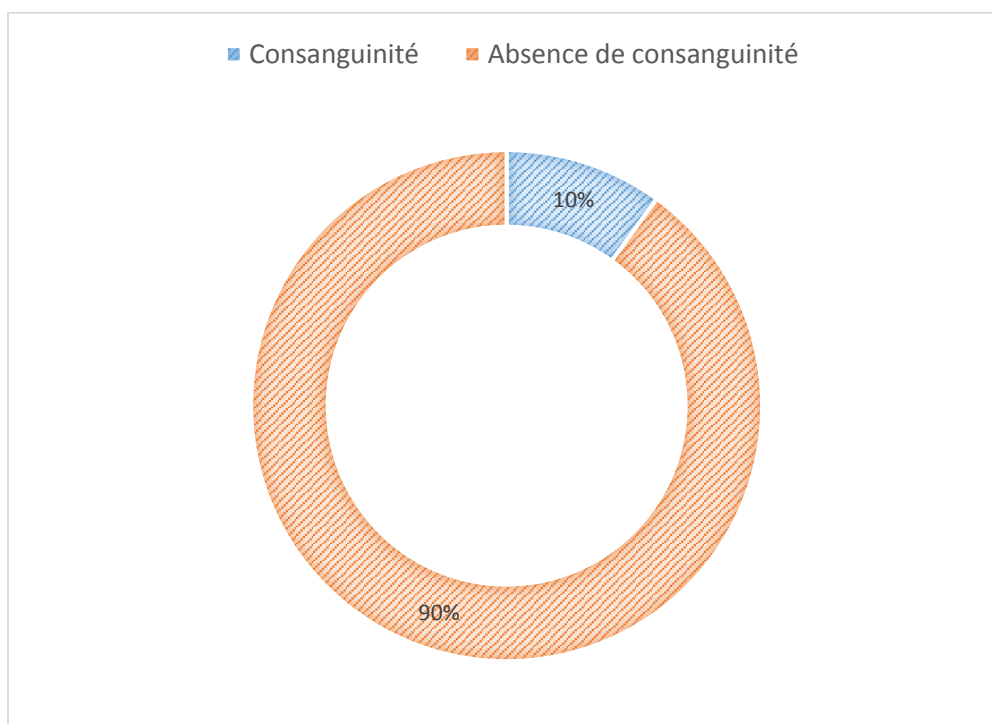
Le SN affecte les deux sexes de manière égale mais peut être plus reconnaissable chez les garçons car ils peuvent présenter une cryptorchidie. Dans cette étude, nous avons noté une prédominance masculine présentant 66.7% des cas avec un sex-ratio de 2 (39M/20F).



**Figure 5** : Répartition des patients en fonction du sexe.

### 1.3. Cas similaires dans la famille et notion de consanguinité

La totalité de nos patients étaient des cas sporadiques. 10% avait des antécédents de consanguinité.

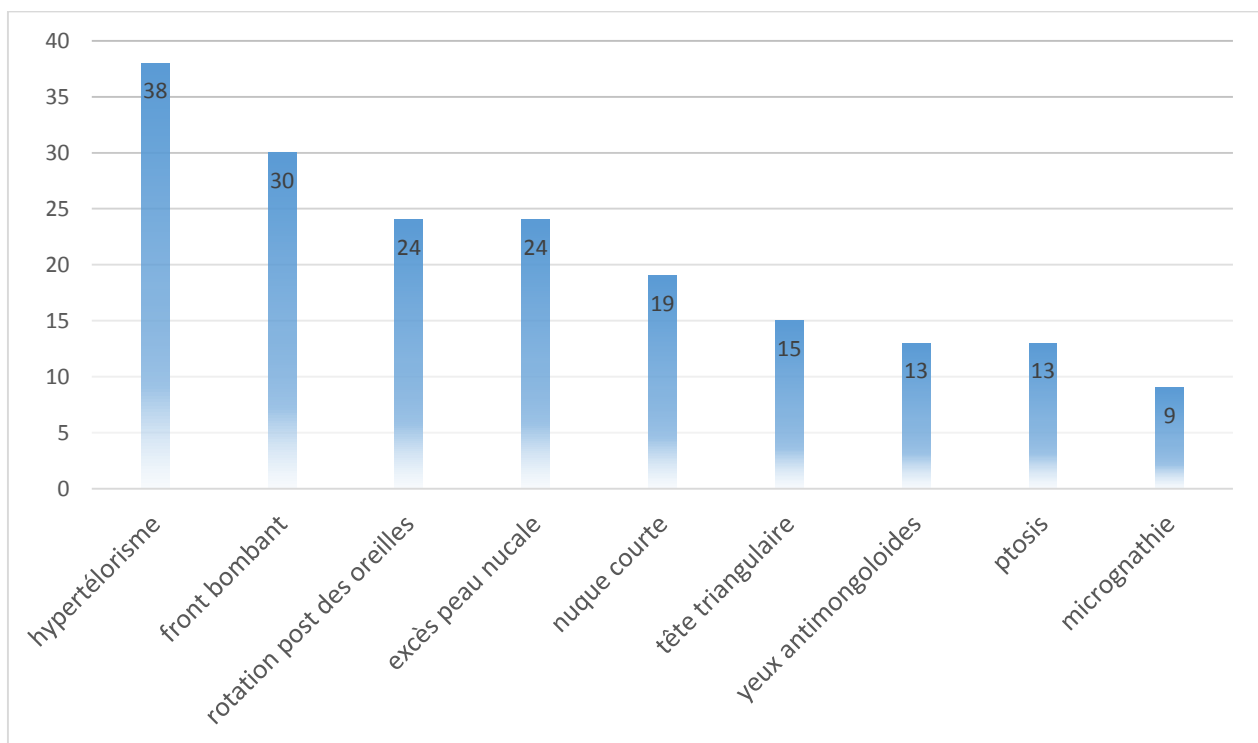


**Figure 6:** Répartition des patients en fonction de la notion de consanguinité

## 2. Données cliniques

### 2.1. Dismorphie faciale

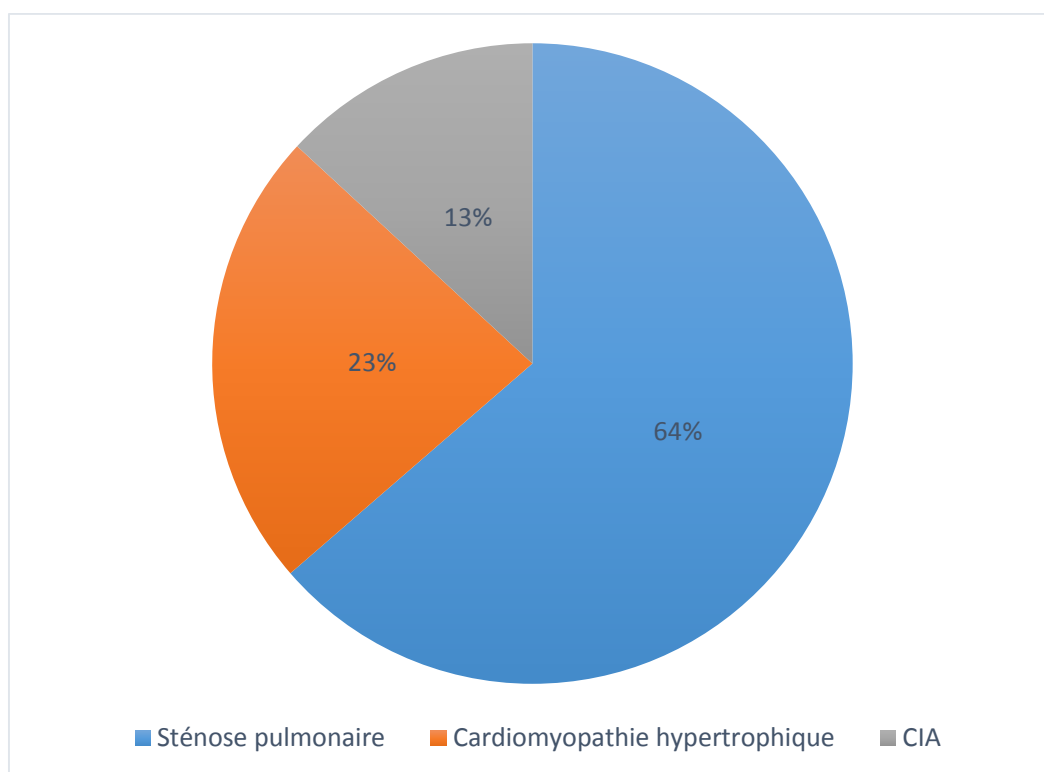
L'examen clinique de notre cohorte a objectivé un syndrome dysmorphique chez 60%de nos patients, il est fait de dysmorphies faciales (hypertélorisme, ptosis, front haut, cou court, inclinaison antimongoloïde des yeux, micrognathie, oreilles en rotation postérieure).



**Figure 7 :** Répartition des patients en fonction des signes dysmorphiques de la face

## 2.2. Manifestations cardiovasculaires

Les manifestations cardiovasculaires sont souvent le principal signe évoquant le diagnostic avant la dysmorphie ou le retard de croissance. Dans notre cohorte, la sténose pulmonaire a été détectée chez 24 cas (64%) et était généralement due à une valve pulmonaire dysplasique. La cardiomyopathie hypertrophique a été détectée chez 7 cas (23%), et une communication inter auriculaire chez 5 cas (13%), dont un cas avait une association avec une sténose pulmonaire.



**Figure 8** : Répartition des patients en fonction des manifestations cardiovasculaires

### 2.3. Malformations associées

Un retard statural à  $-2DS$  a été observé chez 38% des cas de notre cohorte.

L'examen dermatologique a objectivé des anomalies de la pigmentation de type taches Café au-lait chez 9% des cas. Une prévalence plus faible de cryptorchidie (6%) a été observée chez les garçons, alors que les données neurologiques obtenues ont montré la présence d'un retard mental chez 30% des cas.

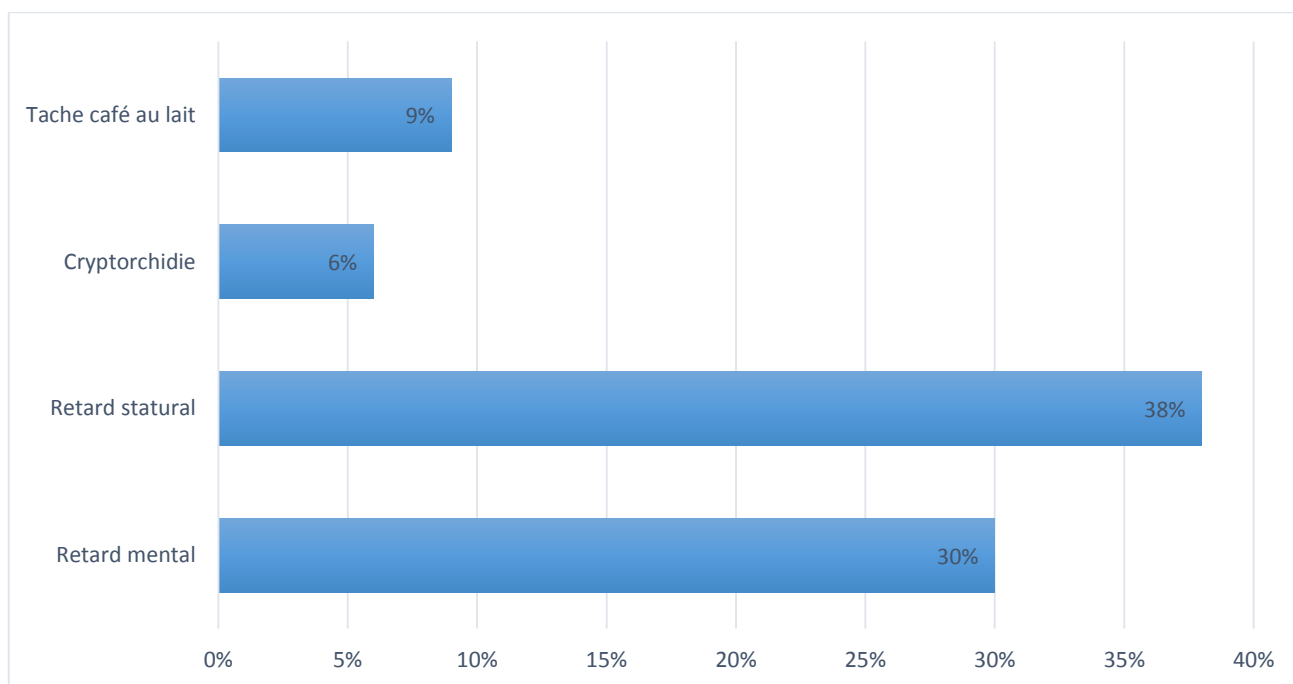


Figure 9: Répartition des patients en fonction des malformations associées

### 3. Résultats de l'analyse génétique

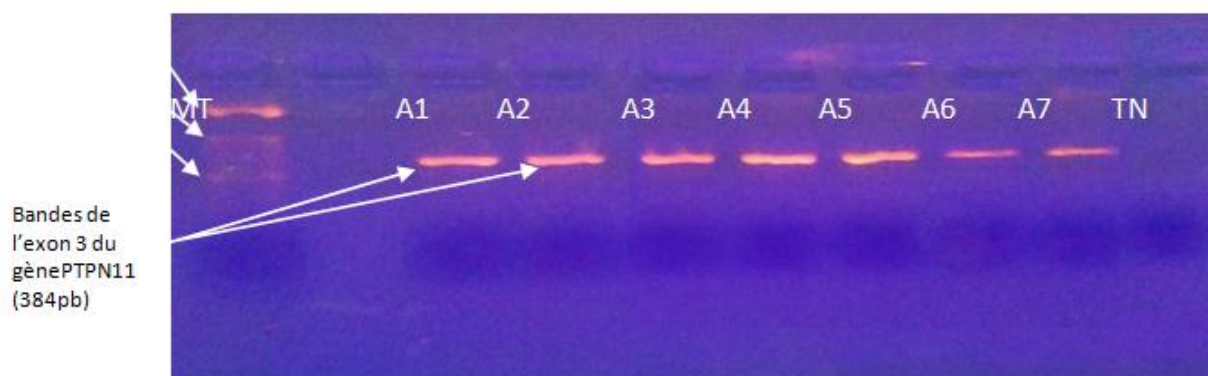
#### 3.1. Quantification de l'ADN extrait

Le résultat de la concentration de l'ADN extrait dans notre série variait de 38,3 ng/ $\mu$ l à 156 ng/ $\mu$ l, les rapports DO 260/280 variaient de 1,84 à 1,98.

Par conséquent, tous les échantillons d'ADN extraits étaient de bonne qualité.

#### 3.2. Amplification du gène PTPN11 et Kras par PCR

Dans le cadre de la recherche des mutations du gène *PTNP11* et *Kras*, une amplification des exons a été réalisée par la technique PCR après extraction de l'ADN par le KIT "DreamTaq Green PCR". La qualité du produit PCR a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un contrôle négatif. La visualisation des fragments d'ADN se fait après exposition du gel à une lumière ultraviolette.

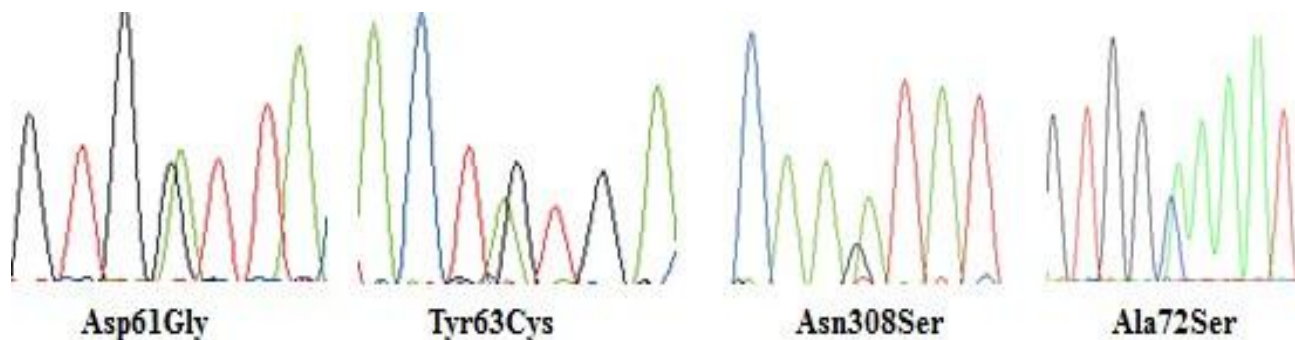


**Figure 10** : Résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR.

A1–A7 : Echantillons des patients NS : Marqueur de taille, pb : paires de bases, TN : Témoin négatif.

### 3.3 Résultats de l'analyse moléculaire

L'exploration moléculaire des exons hot-Spot du gène PTPN11 chez l'ensemble de nos patients (59 patients) nous a permis d'identifier huit variants faux-sens identifiés chez 21 patients.



**Figure 11** : Chromatogrammes montrant les variants exoniques

(c.182A>G,c.188A>G,c.214C>T,c.923A>G) détectés chez nos patients

Le variant c.124A>G situé dans l'exon 2 entraîne la substitution de la tryptophane en alanine en position 42 de la protéine, Ce variant n'a été identifié que chez un seul cas.

Le variant faux sens c.182A>G, situé dans l'exon 3 entraîne la substitution de l'acide aminé aspartate par la glycine à la position 61 de la séquence protéique. Ce variant a été détecté chez 3 patients.

Le variant faux sens c.188A>G provoque la substitution de l'acide aminé tyrosine par la cystéine à la position 63. Ce variant situé dans l'exon 3 a été détecté chez 2 patients.

Le variant faux sens c.214 G>T, localisé dans l'exon 3 aboutit à la substitution de l'alanine par la sérine à la position 72 de la protéine. Il a été détecté chez 3 patients.

Le variant c.328G>A localisé sur l'exon 3 a été retrouvé chez un seul patient. Il entraîne le changement de la glutamine en lysine en position 110.

Le variant c.417G>C entraînant la substitution de la glutamine en acide

aspartique en position 139, localisé sur l'exon 4 a été identifié chez 3 cas. Le variant faux sens c.923A>G provoque la substitution de l'asparagine par la sérine à la position 308 de la séquence protéique. Ce variant situé dans l'exon 8 a été rapporté chez 3 patients, alors que le variant c.1529A<G situé dans l'exon 13, a été rapporté chez 6 cas. Il entraîne à son tour un changement de la glycine en arginine en position 510 de la séquence protéique. Tous ces variants ont été rapportés dans les bases de données.

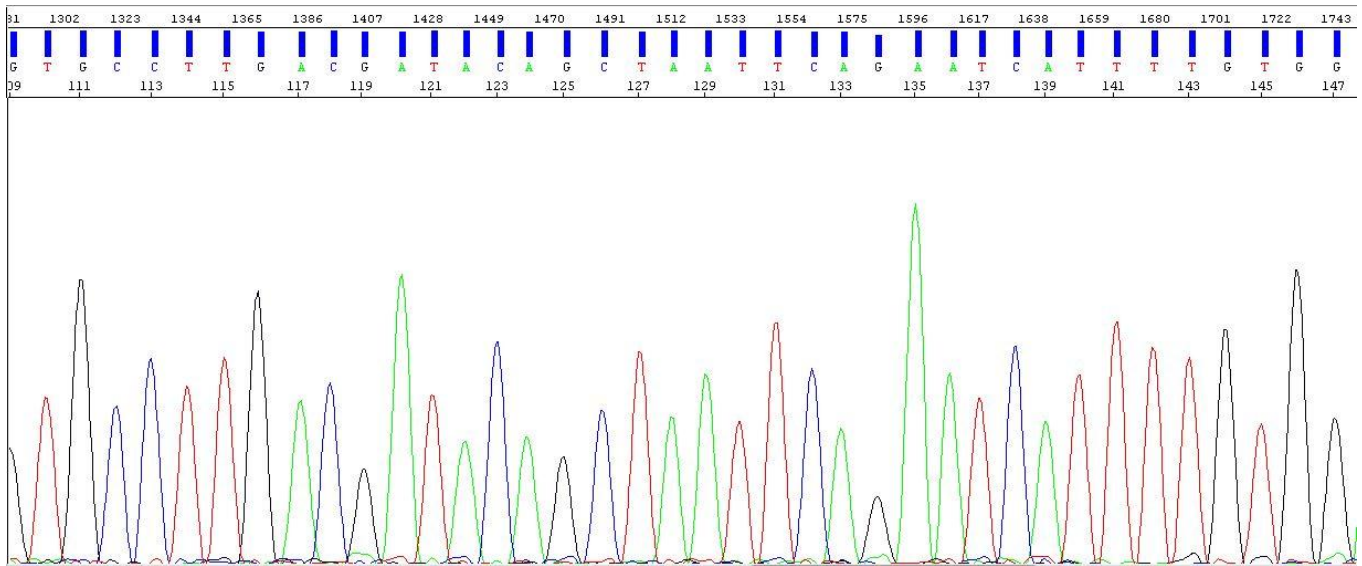
**Tableau V** : Caractéristiques des variants de *PTPN11* identifiés dans la population Noonan

| Identifiant du variant | Variant nucléotidique | Variant protéique | Exon/ Intron | Type du changement | Nombre de patients affectés |
|------------------------|-----------------------|-------------------|--------------|--------------------|-----------------------------|
| rs397507501            | c.124A>G              | T42A              | Exon 2       | Faux sens          | 1                           |
| rs121918461            | c.182A>G              | D61G              | Exon 3       | Faux sens          | 3                           |
| rs121918459            | c.188A>G              | Y63C              | Exon 3       | Faux sens          | 2                           |
| rs121918453            | c.214G>T              | A72S              | Exon 3       | Faux sens          | 3                           |
| rs397507518            | c.328G>A              | E110K             | Exon 3       | Faux sens          | 1                           |
| rs397507520            | c.417G>C              | E139D             | Exon 4       | Faux sens          | 2                           |
| rs121918455            | c.923A>G              | N308S             | Exon 8       | Faux sens          | 3                           |
| rs121918470            | c.1529A>G             | Q510R             | Exon 13      | Faux sens          | 6                           |

### **3.4. Résultats du séquençage des produits PCR purifiés du gène *Kras***

Le séquençage des exons 2 et 3 du gène *Kras* a été réalisé chez les patients chez qui aucune mutation pathogène du gène *PTPN11* n'a été identifiée.

Cette analyse a porté sur 38 patients et aucune mutation pathogène n'a été identifiée chez l'ensemble des cas analysés.



**Figure 12 :** Electrophorégramme d'un patient ne présentant pas de mutation dans l'exon 2 du gèneKras

L'alignement avec une séquence de la base de données BLAST a confirmé le résultat obtenu.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

**Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly**  
 Sequence ID: [NC\\_000012.12](#) Length: 133275309 Number of Matches: 1

Range 1: 25227195 to 25227400 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score         | Expect | Identities    | Gaps      | Strand     |
|---------------|--------|---------------|-----------|------------|
| 381 bits(206) | 1e-103 | 206/206(100%) | 0/206(0%) | Plus/Minus |

Features: [gtpase kras isoform b](#)  
[gtpase kras isoform b](#)

```

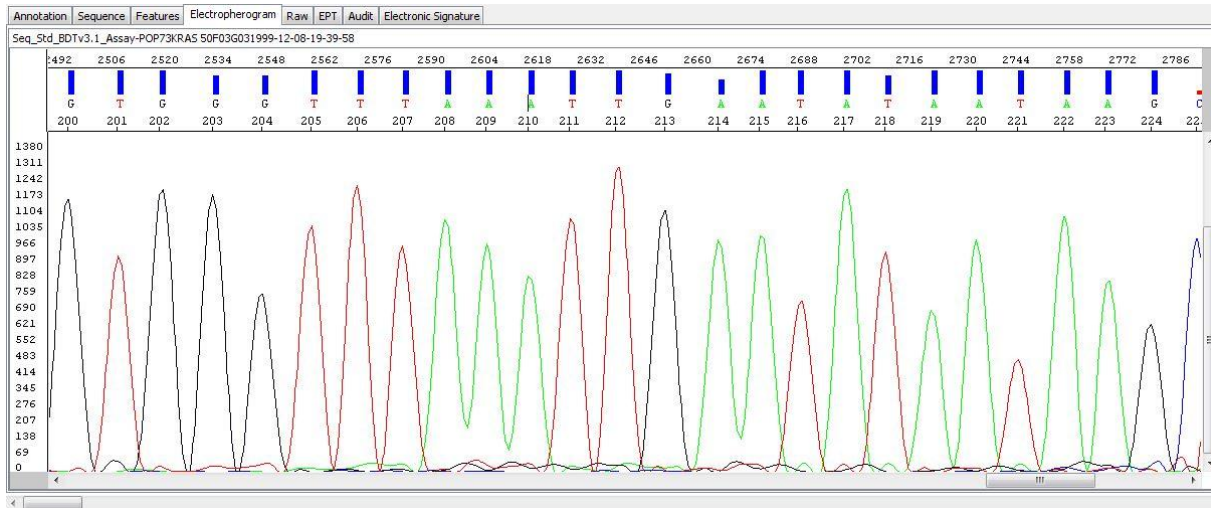
Query 1      AAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAA 60
Sbjct 25227400 AAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAA 25227341

Query 61     GAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA 120
Sbjct 25227340 GAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA 25227281

Query 121    TTTGCCATAAATAACTAAATCAATTTGAAGATATTCACCATTATAGGTGGGTTTAAATT 180
Sbjct 25227280 TTTGCCATAAATAACTAAATCAATTTGAAGATATTCACCATTATAGGTGGGTTTAAATT 25227221

Query 181    GAATATAATAAGCTGACATTAAGGAG 206
Sbjct 25227220 GAATATAATAAGCTGACATTAAGGAG 25227195
    
```

**Figure 13 :** alignement blast de la séquence obtenue de l'exon 2 du gène *Kras*



**Figure 14** : Electrophorégramme d'un patient ne présentant pas de mutations dans l'exon 3 du gène *Kras*

L'alignement avec une séquence de la base de données BLAST a également confirmé le résultat obtenu.

Homo sapiens *KRAS* proto-oncogene, GTPase (*KRAS*), RefSeqGene (LRG\_344) on chromosome 12  
 Sequence ID: [NG\\_007524.2](#) Length: 53215 Number of Matches: 1

Range 1: 28610 to 28795 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score         | Expect  | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|---|---------------|-----------|-----------|
| 344 bits(186) | 1e-90   | 186/186(100%) | 0/186(0%) | Plus/Plus |
| Query 1       | GTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCGACACAGCAGGTCAAGAGGAG  | 60            |           |           |
| Sbjct 28610   | GTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCGACACAGCAGGTCAAGAGGAG  | 28669         |           |           |
| Query 61      | TACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGATTTGCC | 120           |           |           |
| Sbjct 28670   | TACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGATTTGCC | 28729         |           |           |
| Query 121     | ATAAATAAATACTAAATCATTTGAAGATATTCACCATATAGGTGGGTTAAATTGAATAT | 180           |           |           |
| Sbjct 28730   | ATAAATAAATACTAAATCATTTGAAGATATTCACCATATAGGTGGGTTAAATTGAATAT | 28789         |           |           |
| Query 181     | AATAAG 186  |               |           |           |
| Sbjct 28790   | AATAAG 28795  |               |           |           |

**Figure 15** : alignement blast de la séquence obtenue de l'exon 3 du gène *Kras*

## 4. Corrélation génotype-phénotype:

Nous avons établi une étude comparative de plusieurs critères entre le groupe des patients avec mutation *PTNP11* et le deuxième groupe des patients non mutés *PTNP11*.

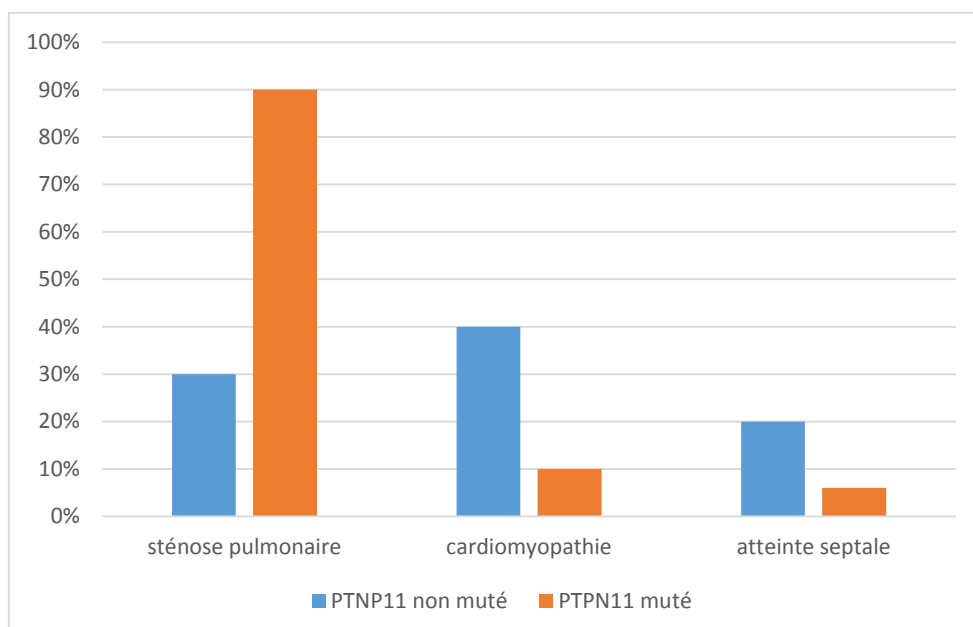
### 4.1 Dismorphie :

La dysmorphie était présente chez les 2 groupes. On n'avait pas constaté une différence significative. Seulement 3 patients, non mutés *PTNP11* n'avait pas des critères dysmorphiques majeurs.

### 4.2 Atteinte cardiaque

Chez les patients Noonan, l'atteinte cardiaque est dominée par la sténose de la valve pulmonaire, et la communication inter auriculaire.

Nous avons comparé la fréquence des deux lésions chez les 2 groupes.



**Figure 16** : Corrélation entre les 2 groupes de patients concernant l'atteinte cardiaque

La sténose pulmonaire était présente chez 90% des patients chez qui une mutation *PTNP11* a été décelée ( $p=0.0001$ ). Contre seulement 30 % des patients non mutés *PTNP11* ( $p=0.0005$ ).

Par contre la cardiomyopathie hypertrophique était plus fréquente chez les patients non mutés *PTNP11*.

L'association entre deux types d'atteinte cardiaque chez le même patient était présente chez les 2 groupes. Avec soit une association de sténose pulmonaire et cardiomyopathie, ou atteinte septale et communication inter auriculaire.

#### **4.3 Autres anomalies**

Aucune différence significative entre les deux groupes n'a été détectée pour les autres critères notamment le retard staturo-pondéral, les lésions dermatologiques ou la cryptorchidie.

# DISCUSSION

## ASPECTS CLINIQUES DU SYNDROME DE NOONAN

Le syndrome de Noonan (NS) (OMIM 163950) est une maladie génétique autosomique dominante courante dont l'incidence est estimée à 1/1000–2500 naissances vivantes. Ce syndrome se caractérise par des traits faciaux distinctifs, une petite taille, des anomalies cardiaques congénitales, un retard de développement avec difficultés d'apprentissage légers à modérés, des anomalies squelettiques, une cryptorchidie et une prédisposition aux troubles myéloprolifératifs. Après le syndrome de Down, le SN est la cause syndromique la plus fréquente de cardiopathie congénitale. De nombreuses caractéristiques du SN sont similaires à celles observées dans le syndrome de Turner, et ce trouble a parfois été appelé à tort "syndrome de Turner masculin". Ce terme est trompeur, incorrect et ne devrait pas être utilisé. Cependant, le SN se produit aussi bien chez les hommes que chez les femmes et l'âge moyen au moment du diagnostic est de 9 ans. [2]

En outre, il existe un certain nombre d'affections qui partagent des caractéristiques cliniques communes avec le SN, notamment le syndrome de LEOPARD, le syndrome cardiofacio-cutané, le syndrome de Noonan like et le syndrome de Costello. Des recherches récentes ont montré qu'il s'agit bien de troubles biologiquement apparentés, tous étant dus à des mutations germinales dans des gènes impliqués dans la voie RAS–MAPK (protéine kinase activée par des agents mitogènes). Ces troubles ont été classés en une seule famille, les syndromes neuro-cardio-faciaux-cutanés (NCFCS), sur la base de mécanismes pathogéniques communs et de chevauchements cliniques. [2]

Environ 50 % des patients atteints de SN présentent une mutation faux-sens dans le gène de la protéine tyrosine phosphatase non réceptrice de type 11 (*PTPN11*) codant pour la protéine-tyrosine phosphatase-2 d'homologie Src (SHP-2). *PTPN11* a

été le premier gène identifié dans le SN, depuis plus de huit gènes sont identifiés actuellement (*PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *RRAS*, *RASA2*, *A2ML1*, *SOS2*, *LZTR1*) Kruszka et al, 2017 ; Yart & Edouard, 2018). Les mutations des gènes *SOS1*, *RAF1*, et *KRAS*, sont respectivement responsable de 10, 10, et moins de 2% des cas.[4]

## I. RAPPEL HISTORIQUE

L'histoire du SN est longue et complexe. La première publication connue d'un cas de SN remonte à 1883, date à laquelle Kobylinski a décrit un homme de 20 ans présentant des caractéristiques cliniques compatibles avec le SN (cou plissé et plusieurs autres caractéristiques). En 1930, Ullrich a décrit plusieurs individus, hommes et femmes, présentant une petite stature et un cou voilé. Certains d'entre eux représentaient le syndrome de Turner et, sans doute, certains NS. En raison de possibles similitudes avec une souche de souris que Bonnevie avait décrite, cette entité fut appelée phénotype Bonnevie–Ullrich sur le continent européen et fut utilisée pour décrire des enfants, dont certains seraient plus tard diagnostiqués comme atteints de NS. En 1938, Turner a décrit des patients atteints d'infantilisme sexuel qui présentaient également un cou palmé et une petite taille. Le syndrome de Turner ou d'Ullrich–Turner a été reconnu plus tard comme une anomalie des chromosomes sexuels avec soit l'absence, soit une anomalie de l'un des chromosomes X. Cependant, Ullrich avait décrit des hommes atteints de ce trouble ainsi que certaines patientes, qui présentaient des caractéristiques ressemblant au phénotype Ullrich–Turner, et qui avaient deux chromosomes X apparemment normaux. Cela a conduit à l'utilisation de termes prêtant à confusion tels que « syndrome de Turner masculin». [2]

En 1963, le SN a été décrit par deux cardiologues pédiatres, Noonan et Ehmke, dans une présentation orale, puis publié par Noonan seule. Neuf patients ont été

signalés (six hommes et trois femmes) présentant des faciès remarquablement similaires et un syndrome de sténose pulmonaire valvulaire et de multiples anomalies extra-cardiaques jusqu'alors non reconnus. En 1968, le Dr Noonan a publié une série de cas avec ces 9 patients et 10 autres (12 hommes et 7 femmes). Tous partagent un faciès similaire assez caractéristique (hypertélorisme, cou relativement court et oreilles apparemment basses. Micrognathie, légère inclinaison antimongoloïde des paupières,...).

En l'honneur du Dr Noonan, l'éponyme "syndrome de Noonan" a été créé. Parce qu'elle a été la première à prouver que ce syndrome existait chez les deux sexes, qu'il était lié à des gènes normaux, qu'il comportait des malformations cardiaques congénitales et qu'il pouvait être héréditaire. [1]

## **II.EPIDEMIOLOGIE**

### **A. La fréquence**

L'incidence est estimée entre 1/1000 et 1/2500 naissance vivantes [1-6]. Cependant, ces données ne reposent pas sur des études de population précises.

### **B. Le mode de transmission**

Le SN survient de façon sporadique dans 60% des cas ou selon une transmission autosomique dominante avec une prédominante transmission maternelle [1, 5,6]. Cependant L'étude de l'origine parentale des mutations de novo montre une origine paternelle dans la grande majorité des cas avec une augmentation de l'âge paternel à la conception. Tous nos patients étaient des cas sporadiques avec absence de cas similaires dans la famille.

### **C. L'âge au diagnostic**

Les caractéristiques de SN s'atténuent avec l'âge et présentent une grande hétérogénéité phénotypique, et il n'est pas rare qu'un parent soit diagnostiqué seulement après la naissance d'un enfant plus gravement atteint [6]. L'âge au diagnostic de nos patients variait entre 2 mois et 14 ans avec une moyenne d'âge de 4 ans.

### **D. Le sexe**

Le SN affecte les deux sexes de manière égale mais peut être plus reconnaissable chez les garçons car ils peuvent présenter une cryptorchidie. Dans cette étude, nous avons noté une prédominance masculine présentant 66.7% des cas avec un sex-ratio de 2. [7].

### **E. Répartition géographique**

Le SN se rencontre dans tous les groupes ethniques Sans aucune répartition géographique prédominante. [6 .7]

Au Maroc A notre connaissance, jusqu'à ce jour, aucune étude épidémiologique déterminant la fréquence du syndrome de Noonan n'a été réalisée. Il n'existe pas encore de registre exhaustif regroupant les patients atteints de SN. On ne retrouve que quelques séries publiées de cas la plus grande étant celle de, EL Bouchikhi et al [1].

### **III. Caractéristiques cliniques du syndrome de Noonan**

#### **A. Anomalies de la croissance**

La petite taille proportionnelle postnatale, rapportée chez plus de 80% des patients, est l'une des principales caractéristiques du syndrome de Noonan et peut conduire au diagnostic. Bien que le poids et la taille à la naissance soient généralement normaux, dans certains cas, une perte de poids marquée se produit au cours de la première semaine de vie. Les œdèmes sous cutané, parfois présents à la naissance, pourraient masquer des anomalies du poids de naissance.

L'évolution postnatale de la croissance staturale est identique dans les deux sexes avec une taille moyenne qui suit le troisième percentile jusqu'à 10 ans chez les filles et 12 ans chez les garçons. L'âge osseux est souvent retardé par rapport à l'âge chronologique d'environ deux ans et s'accompagne d'un retard pubertaire responsable d'un ralentissement de la vitesse de croissance dans les 2 sexes. Ainsi le pic de croissance pubertaire apparaît avec un retard de deux ans. La taille finale est atteinte à la fin de la deuxième décennie et se situe à -2 DS par rapport à la population générale, entre 145 et 162,5 cm chez les hommes et 135 et 151 cm chez les femmes.

Le traitement par l'hormone de croissance (GH) peut être utilisé pour accélérer la croissance pendant les premières années de la vie. Les premiers rapports sur les effets à long terme de ce traitement montrent un effet bénéfique. Les patients NS présentant une mutation du gène *PTPN11* répondent moins efficacement à la GH que les patients NS ne présentant pas de mutation de ce gène.

Dans notre série, tous les cas présentaient un retard statural, 38% avaient un retard de -2DS. Ces données rejoignent celles rapportées dans plusieurs études. [6]

Dans l'étude de Ranke et al, très souvent citée, la taille moyenne observée à l'âge adulte est de 162,5 cm chez l'homme et 152,7 cm chez la femme. Ces valeurs

sont inférieures au 3ème percentile . Sharland et al, ont estimé que 70 % des SN ont une taille < (-2 DS), 20 % ont une taille comprise entre -2 et 0 DS et ont 10 % une taille supérieure à la moyenne[7].

## **B. Signes dysmorphiques**

La dysmorphie faciale est le signe pathognomonique. Cependant, elle est plus caractéristique dans la petite et moyenne enfance et devient plus discrète à l'âge adulte.

Le diagnostic clinique est difficile chez le nouveau-né. Il repose sur la combinaison d'une dysmorphie faciale (front haut, hypertélorisme, oreilles basses implantées) d'un cou court associé à un excès de peau dans la nuque et d'une cardiopathie évocatrice (sténose pulmonaire) et/ou d'une cardiomyopathie hypertrophique. Un aspect de lymphoedème prédominant sur les extrémités est évocateur, mais peu fréquent. En pratique, ces manifestations peuvent être discrètes, comme en témoigne l'âge moyen tardif au diagnostic. [8]

Chez l'enfant atteint du SN les principales caractéristiques sont l'hypertélorisme avec des fentes palpébrales inclinées vers le bas (95 %), un nez court et large avec une racine déprimée et une pointe pleine, un philtrum profondément rainuré avec des pics hauts et larges du bord vermillon de la lèvre supérieure (95 %), un palais fortement arqué (45 %), une micrognathie (25 %) et un excès de peau nucale avec une ligne de cheveux postérieure bas implantée (55 %). [7]

Dans l'enfance, l'apparence du visage manque souvent d'expression et ressemble à celle d'un individu atteint d'une myopathie.

Chez l'adolescent et le jeune adulte, la forme du visage devient plus triangulaire. Les yeux sont moins proéminents. Les traits sont plus nets. La racine du nez est étroite

et l'arête est fine. Le cou est plus long, accentuant le plissement de la peau ou la proéminence du muscle trapèze.

Certains adultes présentent des plis nasogéniens proéminents, une implantation haute des cheveux et une peau transparente et ridée.

Les cheveux de l'enfant en bas âge peuvent être crépus, alors qu'ils sont souvent bouclés ou laineux chez l'enfant plus âgé et l'adolescent. Indépendamment de l'âge, les caractéristiques souvent présentes sont des yeux bleu-pâle ou bleu-vert, des sourcils arqués en forme de diamant et des oreilles bas implantées, en rotation postérieure avec une hélice épaisse.

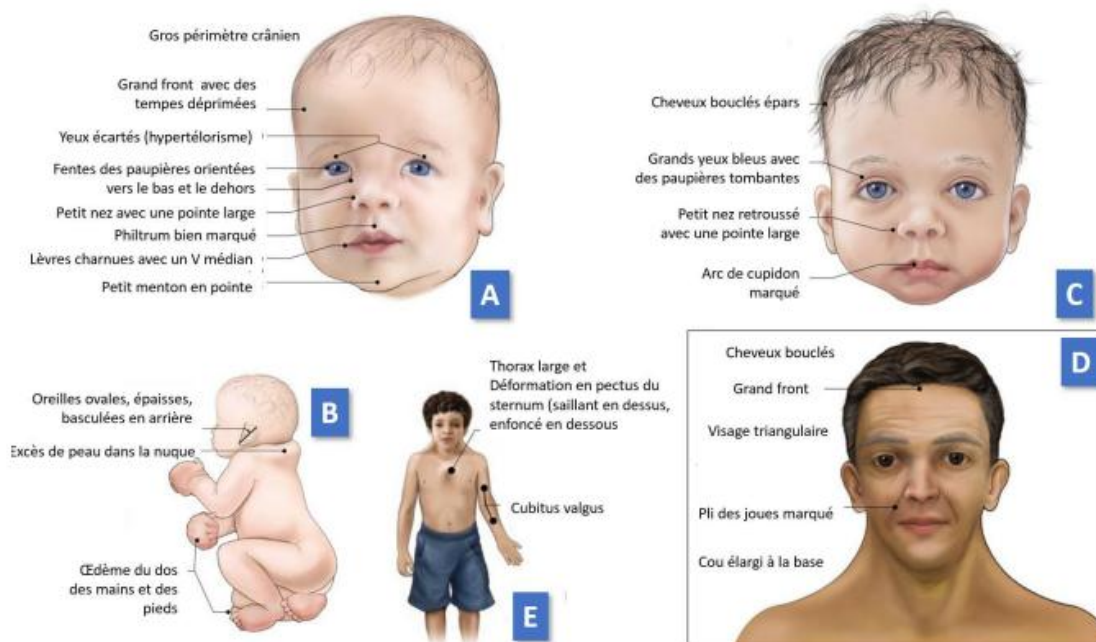


Figure 1. Aspects cliniques typiques pour le syndrome de Noonan chez le nouveau-né (A, B), l'enfant (C) et l'adulte (D). Les déformations caractéristiques du thorax chez un grand enfant figurent en E (Adapté de : V Bhambhani, M Muenke. "Noonan syndrome". *Am Fam Physician* 2014, 89:37-43, avec l'autorisation de l'éditeur.)

**Figure 17 :** Aspects cliniques typiques pour le syndrome de Noonan chez le nouveau né (A,B), l'enfant (C) et l'adulte (D). Les déformations caractéristiques du thorax chez le grand enfant figurent en E [25].

Dans notre cohorte, plus de 60% des cas présentent des caractéristiques morphologiques classiquement décrites dans la littérature avec des anomalies de l'oreille (rotation postérieure, oreilles épaisses et lobes larges), un visage triangulaire, des anomalies oculaires (hypertélorisme, fente palpébrale inclinée vers le bas et ptosis), une implantation basse des cheveux, un cou court, un excès de peau sur la nuque, et une micrognathie.

### **C. Caractéristiques cardiovasculaires**

Les malformations cardiaques congénitales sont l'une des principales caractéristiques cliniques du SN. Elles sont présentes chez environ 70 à 80 % des cas. Le type le plus fréquent des cardiopathies congénitales est la sténose pulmonaire valvulaire avec une prévalence estimée entre 50 à 60% suivie de la cardiomyopathie HCM (20%), tandis que la communication inter-auriculaire CIA est présente chez uniquement 6 à 10% des patients SN [10].

Si l'on regarde l'ordre de fréquence des 3 principales cardiopathies dans notre série, on retrouve, par ordre décroissant, la sténose de la valve pulmonaire qui est la cardiopathie la plus fréquente, suivie de la HCM puis de la CIA (63% > 23% > 13%). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. [11.12]

Les autres manifestations cardiaques, telles que la communication interventriculaire, la communication du canal atrio-ventriculaire et la coarctation aortique, sont observées moins fréquemment. [12]

Les électrocardiogrammes (ECG) chez certains de nos patients ont également décrit des anomalies électrocardiographiques (50% des cas). Des intervalles QRS larges avec un schéma principalement négatif dans les dérivations précordiales gauches et une déviation de l'axe gauche avec des ondes Q géantes. [10]

## **D. Manifestations génito-urinaires et rénales**

La puberté est généralement retardée chez les patients des deux sexes atteints du syndrome de Noonan. L'âge moyen d'apparition de la puberté est de 14,5 ans chez les hommes et de 14 ans chez les femmes. La majorité des femmes sont fertiles. Chez les hommes atteints, un dysfonctionnement gonadique avec altération de la spermatogenèse a été signalé. Ceci peut expliquer la transmission prédominante par la mère dans les cas familiaux. La cryptorchidie, qui touche 60 à 80 % des hommes NS, peut être liée à une baisse de la fertilité. On a noté une prévalence plus faible de la cryptorchidie chez les hommes de notre cohorte avec une incidence d'environ 6 %. Le résultat de notre série est en désaccord avec les données de la littérature. Cette discordance peut être liée à l'insuffisance des données cliniques obtenues

Des anomalies du tractus urinaire sont présentes dans 10% des cas, le plus souvent à type de sténose pyélo-urétérale et/ou d'hydronéphrose. Des malformations rénales (ectopie, fusion rein en fer à cheval), mais habituellement sans conséquences cliniques. [12]

## **E. Troubles du développement psychomoteur et du comportement**

Les enfants atteints de NS présentent un léger retard psychomoteur, l'âge moyen pour s'asseoir étant de 10 mois, la première marche non soutenue de 21 mois et les phrases de base de deux mots de 31 mois. Le retard mental est présent dans 15 à 35 % des cas et est généralement léger ; de plus, la plupart des enfants peuvent se débrouiller dans un environnement scolaire typique, bien que 10 à 40 % d'entre eux aient besoin d'une assistance supplémentaire.

Le retard mental est caractérisé surtout par des problèmes de construction visuelle et un décalage des performances verbales. Nos résultats sont cohérents avec

ceux de la littérature, en effet un retard mental léger a été observé chez 30% des cas de notre série.

Une légère perte d'audition (12 %) ou des anomalies d'articulation (72 %) sont aussi fréquentes. [11].

La maladresse, les problèmes d'alimentation, les crises d'agitation ou de stupeur, l'écholalie et l'irritabilité sont des problèmes de comportement courants. Des problèmes sociaux et une perte d'attention ont également été identifiés. [10.11]

## **F. Atteinte ophtalmologique**

Les anomalies visuelles sont fréquentes : strabisme (48%–63%), erreurs de réfraction (61%) et amblyopie (33%), modifications du segment antérieur (63 %). Les anomalies du fond de l'œil et le nystagmus peuvent être présents chez (20 %) et (10 %) des patients NS respectivement. [9 .10]

## **G. Anomalies musculo-squelettiques**

On observe des déformations thoraciques avec un pectus carinatum en haut et un pectus excavatum en bas. Ces anomalies sternales sont présentes dans 70 à 95 % des cas. Le thorax est large avec des mamelons bien espacés.

Les épaules sont souvent arrondies et la partie supérieure de la poitrine semble longue, avec des mamelons peu espacés et une sangle axillaire . Les caractéristiques orthopédiques courantes sont le cubitus valgus (50 %), les anomalies de la main, notamment la clinobrachydactylie et les bouts de doigts émoussés (30 %), la synostose radio-ulnaire (2 %), l'hyperextensibilité des articulations (50 %) et le talipes équino-varus (12 %). [10]

## **H. Anomalies immuno-hématologiques et risque de cancers**

Des troubles de la coagulation ont été identifiés chez 30 à 65 % des patients atteints de NS . Il s'agit notamment d'un déficit en facteur XI, d'un déficit en facteur XII, d'un déficit en facteur VIII, de la maladie de von Willebrand (vWD) et d'un dysfonctionnement plaquettaire, qui peut être associé à une triméthylaminurie ou à un déficit en acycloxygénase. Dans de nombreux cas, il n'y a pas de corrélation entre les résultats des tests de coagulation et la diathèse hémorragique.

Des manifestations auto-immunes seraient fréquentes (30 % d'autoanticorps antithyroïdiens dans une série), avec ou sans hypothyroïdie biologique. La fréquence de l'hypothyroïdie vraie est évaluée à 5 % . Des maladies auto-immunes ont été rapportées, en particulier un lupus érythémateux disséminé, mais leur incidence n'est pas connue .

Comme pour toutes les RASopathies, le NS présente une incidence élevée de cancers du sang et de tumeurs solides, estimée à 8,1 fois plus élevée que dans la population générale . Plusieurs patients ont présenté un diagnostic de leucémie aiguë et de syndromes myéloprolifératifs (TMP). Dans de rares cas, les personnes atteintes de NS peuvent développer une leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML)(Van Der Burgt, 2007).

Une mutation spécifique de *PTPN11*, The731le, est présente chez près de la moitié des enfants atteints de NS associé à un syndrome myéloprolifératif.

Dans notre série, on n'a pas noté de manifestations hémorragiques ni de cancers. [13]

## **I. Autres caractéristiques**

D'autres caractéristiques ont également été identifiées, notamment une dysplasie, une hypoplasie ou une aplasie des vaisseaux lymphatiques (20 %), une

hépatosplénomégalie souvent présente dans la petite enfance (26 %–51 %) et des anomalies de la pigmentation, notamment des naevi pigmentés (25 %), des taches café au lait (10 %) et des lentigines (3 %).

### **a. Critères diagnostiques**

Malgré les progrès des tests moléculaires qui peuvent fournir une confirmation dans 70% des cas. Le diagnostic du SN est basé sur les caractéristiques cliniques . Van der Burgt a créé les critères de diagnostic qui sont maintenant universellement acceptés en 1994 et révisés en 2007. Ces critères prennent en compte la dysmorphie faciale, les anomalies de croissance, la déformation thoracique et les anomalies cardiaques. Dans ce système de notation proposé par van der Burgt, les patients sont d'abord classés selon les traits du visage comme ayant des caractéristiques NS typiques ou suggestives. Un visage typique et tout autre signe majeur ou deux signes mineurs établissent le diagnostic de NS, tandis que les patients présentant un visage NS suggestif ont besoin de deux critères majeurs ou trois mineurs pour confirmer le diagnostic de NS [13].

**Tableau VI : Score de van Der Burgt 1994**

| Signe                 | A = majeur  | B = mineur  |
|-----------------------|---|---|
| 1. Forme du visage    | Dysmorphologie typique du visage  | Dysmorphologie suggestive du visage                                     |
| 2. Cœur               | Sténose de la valve pulmonaire, cardiopathie hypertrophique et/ou ECG typique | Autre malformation  |
| 3. Taille             | < Percentile 3  | < Percentile 10   |
| 4. Thorax             | Thorax en carène/entonnoir  | Thorax large  |
| 5. Anamnèse familiale | Parents de 1 <sup>er</sup> degré avec un syndrome de Noonan évident           | Parents de 1 <sup>er</sup> degré avec suspicion d'un syndrome de Noonan |
| 6. Autres             | Retard mental, cryptorchidie et dysplasie lymphatique                         | Retard mental, cryptorchidie ou dysplasie lymphatique                   |

**b. Diagnostic différentiel**

Le diagnostic différentiel doit inclure d'autres RASopathies ainsi que d'autres syndromes non liés à la voie RAS–MAPK, et qui sont caractérisés par une dysmorphie faciale, une petite taille et des anomalies cardiaques, comme le syndrome d'Aarskog, le syndrome de Baraitser–Winter, le syndrome d'alcoolisme fœtal et le syndrome de Williams [14]. (Carcavilla et al., 2020 ; Romano et al., 2010 ; Van Der Burgt, 2007

**Tableau VII : Le diagnostic différentiel du syndrome de Noonan [28]**

| Caractéristique                | Noonan  | CFC   | Costello   |
|--------------------------------|---|---|--|
| Génétique                      | PTPN11 : 40 %<br>SOS1 : 15 %<br>KRAS : 3 %<br>MEK1, MEK2 : 0 %  | BRAF<br>KRAS<br>MEK1<br>MEK2  | HRAS : > 95 %  |
| Développement psychomoteur     | Difficultés d'apprentissage : 30 %<br>Retard mental : < 10 %  | Retard mental > 90 %  | Retard mental : 100 %  |
| Troubles alimentaires précoces | Modérés et inconstants  | Fréquent, parfois sévères (gavage)  | Fréquents, souvent très sévères (gavage)   |
| Dysmorphie                     | Hypertélorisme<br>Ptosis<br>Visage triangulaire<br>Piliers du philtrum marqués                              | Hypertélorisme<br>Visage large  | Traits épais<br>Lèvres épaisses  |
| Cœur                           | Sténose pulmonaire, CAV,<br>coarctation aortique, CIA, CIV<br>CMH : < 20 %                                  | Idem<br><br>CMH : > 20 %  | Sténose pulmonaire, CIA, CIV<br><br>CMH : 40 %<br>Arythmie auriculaire : 40 %                      |
| Peau                           | Normale ou peau sèche   | Plis palmaires profonds (parfois)<br>Hyperkératose palmoplantaire<br>Ichtyose | Plis palmaires profonds. Peau redondante, élastique<br>Hyperpigmentation généralisée<br>Papillomes |
| Cheveux                        | Souvent bouclés<br>Épilation latérale des sourcils  | Souvent bouclés, épars<br>Sourcils souvent absents                            | Cheveux frisés<br>Pas d'hypotrichose   |
| Croissance                     | Retard statural fréquent<br>Retard pubertaire<br>Taille adulte > p3 dans 50 % des cas<br>Résistance à la GH | Retard statural fréquent  | Retard statural très fréquent  |

Le diagnostic différentiel des autres RASopathies comprend:

Le syndrome de LEOPARD (LS) (OMIM 151100) est une maladie autosomique dominante rare qui chevauche phénotypiquement avec le NS. Il est également allélique avec le NS causé par différentes mutations faux sens du gène *PTPN11* retrouvées chez presque 90 % des patients atteints. Les mutations du gène *RAF1* sont retrouvées chez les 10 % des cas restants.

Le LS se caractérise par de multiples lentigines et taches café-au-lait ainsi que par une surdité. On retrouve plus fréquemment une cardiomyopathie hypertrophique et une prévalence plus faible de la sténose pulmonaire.

Le syndrome cardio-facio-cutané (CFC) (OMIM 115150) est un syndrome rare, sporadique, regroupant des anomalies multiples avec un retard mental profond. Le visage dans le syndrome CFC partage de nombreuses caractéristiques faciales avec le SN. Cependant, l'atteinte cutanée est généralement importante et consiste en une peau sèche hyperkératosique et squameuse, des sourcils clairsemés ou absents, et des cheveux clairsemés, bouclés et à croissance lente. La majorité des personnes atteintes ont des problèmes cardiaques, qui comprennent le plus souvent une sténose pulmonaire, une cardiomyopathie hypertrophique et des malformations septales. Le gène *BRAF* semble être le gène le plus souvent muté dans le CFC, suivi de *MEK1* et *MEK2*, et occasionnellement le gène *KRAS*. En revanche, les personnes présentant des mutations de *PTPN11* et *SOS1* n'ont pas été identifiées comme présentant un syndrome CFC clair et net.

Le syndrome de Costello (CS) (OMIM 218040) est un trouble rare, caractérisé par un poids élevé à la naissance et un retard de croissance, un retard de développement, des traits faciaux grossiers, une large arête nasale, une peau lâche et molle, une pigmentation accrue avec le temps, des plis palmaires et plantaires profonds, des papillomes faciaux ou périanaux, un vieillissement prématuré, une perte de cheveux, une déficience intellectuelle modérée, une flexion ou une déviation ulnaire du poignet et des doigts, et des anomalies cardiaques (PS dans environ 40 % des cas et HCM dans 40 % des cas). Les enfants et les jeunes adultes atteints de CS présenteraient certaines tumeurs malignes (rhabdomyosarcome, le plus souvent), qui surviennent chez environ 15 % des cas. Le CS est causé par des mutations germinales du gène *HRAS* qui sont à l'origine d'environ 85 % des cas. [15.16].

La neurofibromatose de type 1 (NF1) (OMIM 162200) est une maladie autosomique dominante.

Elle se caractérise par des neurofibromes sous-cutanés et/ou plexiformes, des taches café-au-lait, des taches de rousseur axillaires et/ou inguinales, des nodules de Lisch dans l'iris, des déformations du squelette, des anomalies vasculaires, des difficultés d'apprentissage et des troubles du comportement.

La NF1 est causée par des mutations ou des délétions du gène de la neurofibromine-1 (*NF1*). Elle agit comme un régulateur négatif de la voie de transduction du signal médiée par la voie RAS. Cependant, l'étiologie de la NF-NS est indistincte. On a rapporté le cas d'un patient présentant les caractéristiques des deux syndromes et chez qui on a découvert deux mutations, une mutation *PTPN11* héritée du père et une mutation *NF1* de novo. Il s'agit du seul cas rapporté à ce jour sur la présence moléculaire des deux maladies chez le même patient.

# **ASPECTS MOLÉCULAIRES DU SYNDROME DE NOONAN**

## **1. Physiopathologie et étiologie génétique**

L'étiologie génétique du syndrome de Noonan s'est établie progressivement depuis sa première mise en évidence en 2001, actuellement elle explique environ 80% des cas. [26]

Le syndrome de Noonan est dû principalement à l'altération de la voie de signalisation RAS/MAP Kinase (Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog/Mitogen-Activated Protein kinases) par des mutations affectant les protéines qui constituent cette cascade moléculaire (Figure 18). Ces mutations sont principalement des mutations de gain-de-fonction qui génèrent le signal intracellulaire continuellement même en absence du ligand en amont de la voie de signalisation. [18]

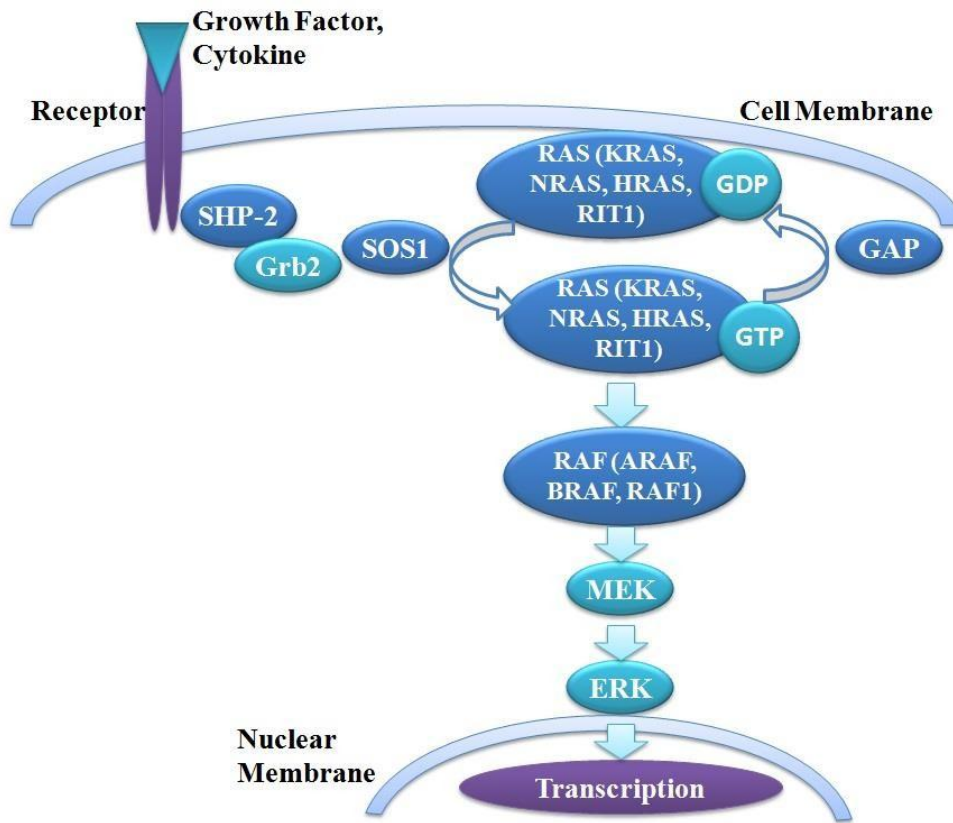


Figure 18 : Les principaux facteurs de la cascade moléculaire Ras MAP kinase ;

[19, 27]

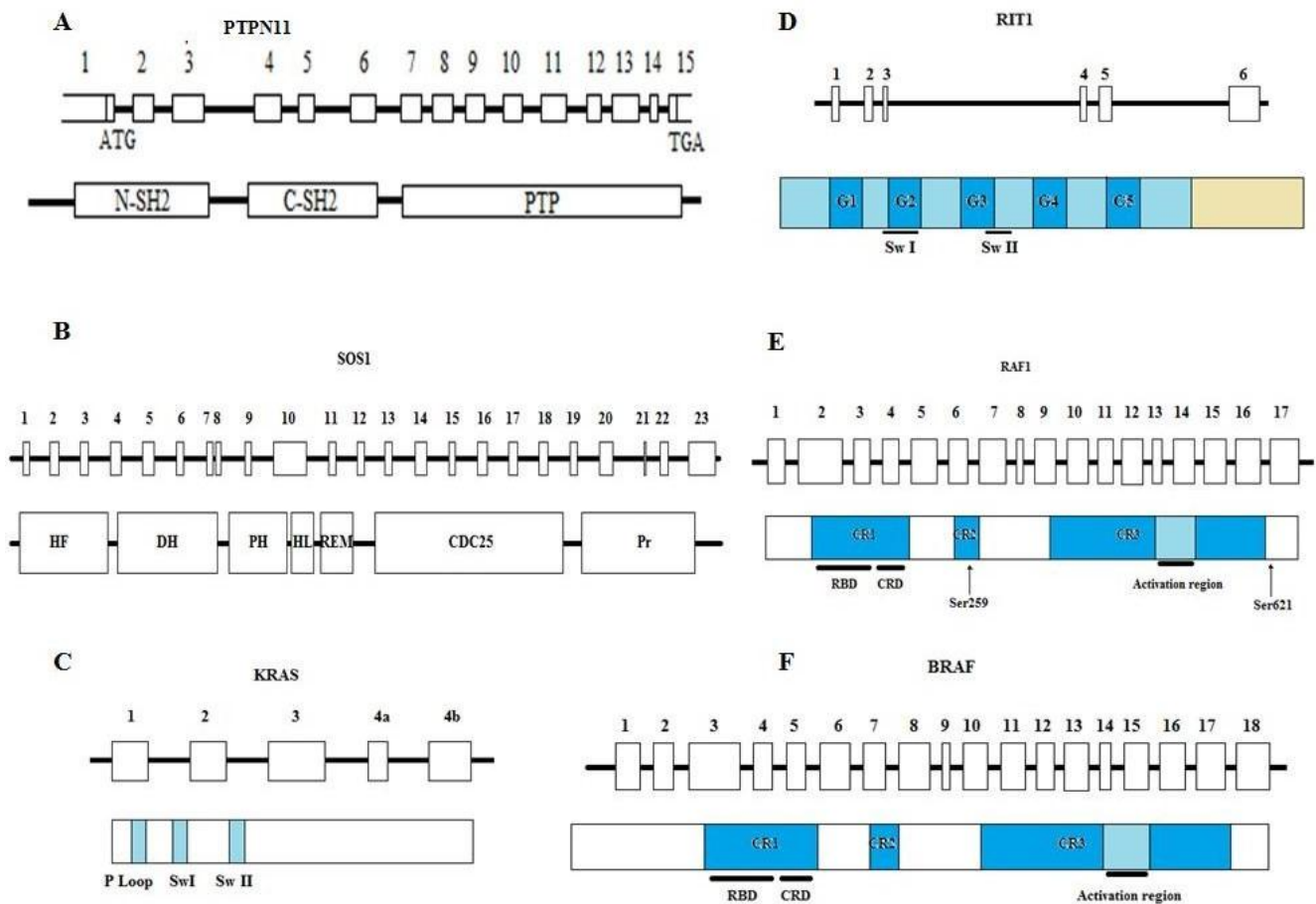
ARAF : V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog A1, BRAF : V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1, ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases, GAP : GTPase Activating Protein, GDP : Guanosine- DiPhosphate, GRB2 : Growth factor Receptor-Bound 2, GTP : Guanosine-TriPhosphate, HRAS : Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, MEK : Mitogen- activated protein kinase kinase, NRAS : Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog, RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, RAF1 : V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1, RAS : Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, RIT1 : Ric-Like Protein Without Caax Motif 1, SHP2 : Src homology Phosphatase 2, SOS1 : Son of Sevenless homolog 1; [19, 27]

RAS/MAP kinase est une voie de signalisation intracellulaire, elle permet la transmission des signaux depuis la membrane cellulaire jusqu'au noyau pour induire différentes réponses cellulaires. En effet, une fois un facteur de croissance ou un ligand se lie au récepteur tyrosine kinase membranaire, il induit la dimérisation du récepteur. Cette modification de conformation déclenche toute une série de réactions moléculaires en aval du récepteur, jusqu'à atteindre le noyau. [28]

Le caractère polymalformatif du syndrome de Noonan est justifié principalement par le fait que la voie de signalisation RAS/MAPK est ubiquiste. En effet, les études ont montré que cette voie est primordiale pour la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que pour le processus de migration cellulaire aux stades précoces d'embryogénèse dans la plupart des tissus [29, 30]. Ceci explique l'évidence de l'impact systémique d'une mutation germinale dans cette voie de signalisation.

Différents gènes ont été associés au syndrome de Noonan, notamment, *PTPN11*, *SOS1*, et des gènes appartenant aux familles RAS et RAF. [20]

Le gène *PTPN11* (Protein-Tyrosine Phosphatase, Non-receptor Type 11) [OMIM 176876] qui code pour la protéine SHP2, est le premier élément de la voie RAS/MAP kinase ayant été identifié comme cause génétique pour ce syndrome. Ce gène est constitué de 15 exons codant pour trois domaines : N-SH2 (N- amino terminal src-homology 2), C-SH2 (C- amino terminal src-homology 2) et un domaine central PTP avec une activité phospho- tyrosine phosphatase (Figure 19A).[21]



**Figure 19 :** Organisation des gènes et des domaines protéiques

impliqués dans le syndrome de Noonan. [31, 32]

**A:** exons du gène *PTPN11* avec domaines de SHP-2, **B:** exons et domaines de *SOS1*, **C:** exons codants et domaines de *KRAS*, **D:** exons codants et domaines de *RIT1*, **E:** exons codants et domaines de *RAF1* avec localisation des résidus S259 et S621 qui sont cruciales pour l’auto-inhibition de *RAF1*, **F:** exons codants et domaines de *BRAF*. **C-SH2:** C-amino-terminal src-homology 2, **CR:** Conserved Region, **CRD:** Cysteine-Rich Domain, **DH:** Dbl Homology, **HF:** Histone-like Fold, **HL:** Helical Linker, **N-SH2:** N- amino-terminal src- homology 2, **PH:** Pleckstrin Homology, **Pr:** Proline-riche motif, **PTP:** protein-tyrosine phosphatase, **RBD:** RAS binding domain, **REM:** RAS Exchange Motif, **Sw:** Switch.

Différentes études ont mis en évidence les mutations du gène *PTPN11* chez des patients atteints du syndrome de Noonan. [31, 32]

Le gène *SOS1* (Son of Sevenless homolog 1) [OMIM 182530] est considéré comme la deuxième cause génétique de ce syndrome. Ce gène se situe dans la région 2p22–p21 et renferme 23 exons qui codent pour sept domaines (Figure 19B). D'après des études précédentes, ce gène serait responsable d'environ 20% des cas de Noonan en absence des mutations de *PTPN11*. [22, 24, 33, 34].

*SOS1* code pour un facteur échangeur de guanine GEF (guanine exchange factor). En effet dans la cascade moléculaire RAS/MAP kinase les protéines RAS deviennent inactives par l'hydrolyse de GTP en GDP via la protéine GAP (GTPase Activating Protein). Pour regagner leur activité, c'est la protéine SOS1 qui se charge de substituer les GDP des protéines RAS par les GTP (Figure 19). [35]

Des études précédentes montrent que les mutations au niveau des domaines potentiels entraînent la perturbation de l'auto-inhibition de l'activité RAS-GEF de SOS1, entraînant un gain de fonction anormal. [33, 36]

La famille RAS (Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) est une famille de gènes qui codent pour des protéines sous-membranaires à activité GTPase. Elles sont responsables de la propagation du signal par activation de différentes voies de signalisation en aval, dont la voie MAP kinase (Figure 19). Les protéines GTPases jouent le rôle d'un commutateur moléculaire oscillant entre la conformation active RAS-GTP et celle inactive RAS-GDP. Elles disposent également d'une activité GTPase intrinsèque qui, à l'aide des RAS-GAP (GTPase Activating Protein) entraîne l'auto-inhibition de la protéine RAS elle-même par substitution de son GTP en GDP. [18, 20, 37, 38]

Les principaux gènes de cette famille impliqués dans le syndrome de Noonan sont : *KRAS*, *RIT1* et *NRAS* (Figure 19C ). Elles causent respectivement 5%, 9% et 1% des cas de Noonan [22, 31, 39, 40].

En cas de mutation au niveau des domaines potentiels de ces gènes, l'activité

GTPase intrinsèque s'altère et cause d'une part la déficience du système de l'auto-inhibition, et d'autre part l'insensibilité aux molécules RAS-GAP. [39, 41]

La famille RAF (-raf-1 murine leukemia viral oncogene) joue le rôle principal de l'activation des molécules MEK-ERK de la voie RAS/MAP kinase (Figure 18). Les principaux gènes de cette famille impliqués dans le syndrome de Noonan sont *RAF1* et *BRAF* (Figure 19E). Leurs fréquences de mutation respectives dans les cas de Noonan est de 3-17% et 1.7-1.9 % [23, 31, 42, 43].

Des études ont montré que la conformation inactive de RAF1 est maintenue via des dimères de protéines qui se lient aux motifs *S259* et *S621* phosphorylés (Figure 19E), ce qui maintient le site catalytique séquestré. Cependant, si ces motifs conservés ou ceux adjacents subissent une mutation, la conformation qui maintient l'auto-inhibition se perturbe et entraîne l'activation en continu de la voie RAS/MAP kinase. [42, 44]

## 2. Analyse moléculaire :

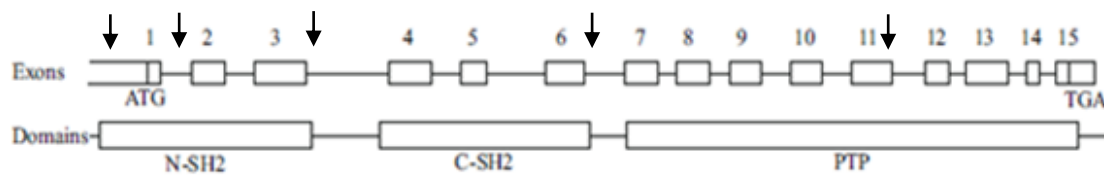
L'exploration moléculaire des exons hot-Spot du gène *PTPN11* chez 59 patients atteints du syndrome de Noonan nous a permis d'identifier huit variants faux-sens identifiés chez 21 patients. Ces différents variants ont été détectés à l'état hétérozygote.

Les variants faux sens D61G, Y63C, A72S et E110K sont regroupés au niveau du domaine N-SH2. Ce domaine est impliqué, d'une part, dans l'interaction avec les protéines en amont, et d'autre part, dans l'auto-inhibition de la protéine SHP-2, via l'interaction avec le domaine PTP. [45]

Le variant E139D se situe au niveau du domaine C-SH2 qui est exprimé de manière ubiquitaire et intervient dans la transduction du signal en aval de diverses récepteurs tyrosine kinases (RTK), il est nécessaire pour une activation complète et

soutenue de la voie RAS/MAP kinase et module également la signalisation via PI3K-AKT et JAK-STAT. Alors que les variants faux sens N308S et Q510R se situent au niveau du domaine catalytique PTP. Ce domaine assure la fonction principale de SHP-2, qui consiste à déphosphoryler les résidus phospho-tyrosines des protéines cibles, et contribue également à l'auto-inhibition de SHP-2 en interagissant avec N-SH2.

**PTPN11**



**Figure 20 :** Organisation de *PTPN11* avec les exons et les domaines protéiques ainsi que l'emplacement des différents variants exoniques identifiés.

C-SH2: Carboxy-terminal src homology 2, N-SH2: Amino-terminal src homology 2, PTP: protein-tyrosine phosphatase.

L'alignement multiple des homologues de SHP-2 de différentes espèces (Figures 21) montre que les résidus faux sens détectés dans notre population Noonan sont très conservés. Ceci suggérerait un rôle majeur de ces résidus dans la fonction de la protéine.

|                |     |  |     |                                |
|----------------|-----|--|-----|--------------------------------|
| H.sapiens      | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">NP_002825.3</a>    |
| P.troglodytes  | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">XP_522535.3</a>    |
| M.mulatta      | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">XP_001110117.1</a> |
| C.lupus        | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">XP_005636307.1</a> |
| B.taurus       | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">XP_002694636.2</a> |
| M.musculus     | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">NP_035332.1</a>    |
| R.norvegicus   | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">NP_001171064.1</a> |
| G.gallus       | 48  | TGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">NP_990299.1</a>    |
| D.rerio        | 48  | NGAVTHIKIQNTGDYDLYGGEKEFTLAELVQYYMEHHGQLKEKNGDVIE  | 97  | <a href="#">NP_956140.1</a>    |
| D.melanogaster | 101 | GNEVTHIKIQNNGDFDLYGGEKEFTLPELVQYYMENGE-LKEKNGQAIE  | 149 | <a href="#">NP_001259174.1</a> |
| A.gambiae      | 50  | GQEVTHIKIQNNGDFDLYGGEKEFTLSELVQYYMENGDQLKEKNGQIIIE | 99  | <a href="#">XP_563746.4</a>    |

**Figure 21 :** Alignement multiple de la séquence protéique de SHP-2 à travers différentes espèces avec l'emplacement des codons D61, Y63 et A72.

La pathogénicité des variants détectés dans notre population s'explique, en fait, par l'extrême importance de l'interaction N-SH2-PTP dans la régulation de l'activité phospho-tyrosine phosphatase de SHP-2. En effet, en absence d'un signal extracellulaire, les domaines N-SH2 et PTP interagissent pour cacher le site catalytique et maintenir la protéine SHP-2 à l'état inactif. Alors qu'en cas de recrutement d'un ligand au niveau de la membrane cellulaire, la protéine en amont de SHP-2, qui peut être directement le récepteur ou autre protéine médiatrice (docking protein), sera activée par la phosphorylation de ses résidus tyrosines. Après phosphorylation, ces résidus se lient au domaine N-SH2 de la protéine SHP-2, celui-ci change alors de conformation libérant ainsi le site catalytique PTP. La protéine SHP-2 ainsi activée déphosphoryle, via l'activité phosphatase de son domaine PTP, les résidus phospho-tyrosines des protéines en aval. Ce qui déclenche une cascade d'activation à travers la voie RAF-MEK-ERK qui se termine par la phosphorylation de la protéine ERK qui, ainsi activée, rejoint le noyau où elle remplit différentes fonctions, selon le signal cellulaire initial. [46]

Par contre, en présence d'une mutation au niveau de la surface d'interaction entre N-SH2 et PTP, la conformation inactive est perturbée et SHP-2 passe, ainsi, d'une façon permanente à la conformation active, où elle déphosphoryle continuellement les résidus phospho-tyrosines des protéines en aval, même en absence du signal cellulaire. Ce qui entraîne l'activation continue de la voie de signalisation Ras-MAPK. Ce type de mutation qui génère une activation permanente de la protéine s'appelle alors une mutation à gain de fonction. [45, 47]

Ces différentes données nous mènent, alors, à conclure que les mutations détectées constituent des mutations pathogènes à gain de fonction, qui entraînent l'activation anormale et permanente de la protéine SHP-2, via la perturbation de son mécanisme d'auto-inhibition.

Pour la population Noonan étudiée, le taux mutationnel des principaux exons du gène *PTPN11* s'avère de l'ordre de 35% (21/59). Nous avons procédé à la comparaison de ce taux avec ses homologues observés dans différentes populations du monde. Notamment, celles provenant de l'Afrique du nord, de l'Europe, de l'Amérique et de l'Asie. Suite à cette comparaison, nous avons constaté que le taux détecté dans notre population est significativement différent des taux identifiés dans toutes les études américaines, ainsi que des taux de la plupart des études asiatiques. Par contre, aucune différence significative n'a été détectée par rapport aux populations nord-africaines et dans la plupart des études européennes.

Nous avons constaté, en effet, que les taux mutationnels les plus faibles se situent au niveau de l'Afrique, avec des valeurs entre 4.7% et 31.6%. Pour l'Europe et l'Asie, les taux mutationnels sont plus élevés, respectivement 23% à 59.6%, et 27.1% à 55.6%. Alors que le taux le plus élevé concerne le continent de l'Amérique avec des valeurs situées entre 42% et 50.7%.

En comparant d'abord les taux combinés de *PTPN11* des différents continents, nous avons constaté qu'à part l'Europe et l'Asie dont les taux mutationnels sont très rapprochés, respectivement 35.2 et 37.8 ( $p = 0.45$ ), les taux mutationnels des autres continents sont significativement différents les uns des autres (Europe vs Amérique  $p = 0.002$ , Europe vs Afrique  $p = 0.02$ , Asie vs Amérique  $p = 0.04$ , Asie vs Afrique  $p = 0.01$ , Afrique vs Amérique :  $p = 0.0005$ ).

D'un autre côté, en comparant les taux mutationnels des populations d'un même continent, nous avons constaté qu'il existe très peu de différences significatives. Ainsi, au niveau de l'Amérique et de l'Afrique du nord, aucune différence significative n'a été notée ; au niveau de l'Asie, nous avons noté une seule différence significative, entre deux études coréennes, qui représentent respectivement le taux le plus élevé et le plus faible, 55.6% vs 27.1%,  $p=0.04$  ; alors qu'au niveau de l'Europe, les taux des

deux études Allemandes, qui sont les plus élevés (59.6% et 55%), se sont avérés significativement différents des taux mutationnels des populations turque et hollandaise.

Ces différentes comparaisons montrent qu'il existe généralement un rapprochement entre les taux mutationnels des populations Noonan provenant d'un même continent, tandis que les comparaisons réalisées entre les études provenant de continents différents montrent la présence de différences, qui sont, dans la plupart des cas, significatives.

Ainsi, ces différents résultats nous mènent à suggérer que l'implication des mutations de *PTPN11* dans la survenue du syndrome de Noonan est probablement associée à d'autres facteurs ethniques ou environnementaux.

La seconde partie présentée dans ce projet a donc consisté à rechercher les mutations du gène *Kras* responsables du SN dans notre cohorte. Ce présent travail constitue la première expérience au Maroc concernant l'étude moléculaire d'une population présentant le SN pour le gène *Kras*.

Jusqu'à présent, le dépistage des mutations des exons 2 et 3 du gène *KRAS* a révélé la présence d'une nouvelle mutation hétérozygote dans l'exon 3 du gène *KRAS* (c.214A>C) chez une mère et deux frères et sœurs inclus dans une étude de cohorte du SN au Brésil. Une autre étude réalisée sur une cohorte de 59 patients coréens a montré une mutation (V14I) dans l'exon 2 du gène *Kras* chez un patient.

Cependant, les résultats de notre étude ont montré l'absence de mutations au niveau des exons 2 et 3 pour le gène *Kras* chez les 39 patients étudiés. Ce résultat confirme la contribution mineure de ce gène dans le SN.

## **PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE**

Le traitement nécessite une approche multidisciplinaire et le pronostic est variable puisque les symptômes oscillent entre des manifestations légères/non reconnues à l'âge adulte et un trouble sévère qui s'accompagne d'une maladie cardiaque mortelle ou d'une malignité dans la petite enfance. Une cardiomyopathie grave peut entraîner une mort prématurée.

Les traitements sont dits symptomatiques, ils dépendent des anomalies et de l'organe impliqué et ne sont pas spécifiques du syndrome de Noonan. Des examens cardiologiques comprenant une échocardiographie et un électrocardiogramme (ECG) et sont indispensables dès la naissance. Une correction chirurgicale de la malformation est souvent possible et devra être discutée avec un chirurgien cardiopédiatre. Même s'il n'y a pas de malformation, le cœur doit être surveillé à intervalles réguliers, car l'épaississement du muscle cardiaque peut se constituer au cours du temps et entraîner des troubles du rythme du cœur (arythmie). Une consultation avec un orthopédiste sera indispensable en cas de déformation de la colonne ou d'autre anomalie des os. La déformation du thorax est difficile à corriger. Avant toute intervention chirurgicale, un bilan de coagulation sera réalisé, et des précautions supplémentaires doivent être prises pour éviter, voire traiter rapidement toute hémorragie pendant ou après l'intervention. Si le retard de croissance est important, un traitement par hormone de croissance peut être discuté. Cependant, dans le cadre d'essais thérapeutiques, il a été montré que le traitement par hormone de croissance est souvent décevant, car elle n'entraîne pas toujours une accélération de la croissance. Actuellement, l'indication de ce traitement reste donc discutée. Une consultation avec un endocrinologue est conseillée en cas de retard pubertaire. Une thérapie hormonale (stéroïdes sexuels) est souvent prescrite.

Il est indispensable de suivre le développement psychomoteur des jeunes enfants, de dépister une éventuelle surdité, et d'orienter le plus rapidement les enfants présentant des difficultés vers une structure de rééducation.

En cas de trouble du langage, une rééducation orthophonique soutenue peut être très bénéfique. Les performances scolaires et les capacités intellectuelles devraient être évaluées avant l'entrée en Classe Préparatoire (CP). Des examens complets de l'audition et de la vue sont aussi recommandés

## CONSEIL GENETIQUE

Le syndrome de Noonan est maladie autosomique dominante, mais l'expression phénotypique est très variable car certains patient porteurs peuvent avoir des signes très atténués à telle sorte que ne sont pas diagnostiqués.

La transmission récessive de NS est possible si le gène impliqué est LZTR1 ; donc devant un patient sporadique la confirmation de la transmission dominante doit être faite par diagnostic génétique.

### 1 – pour les formes dominantes de NS :

Le génotype des parent est indispensable si une mutation dominante est identifiée chez l'enfant porteur ; si une l'un des parents porte une mutation; le risque de transmission de cette dernière sera de 50°/° à chaque grossesse (sans prédire la sévérité de l'expression phénotypique), si les deux parents d'un enfant porteur d'une mutation dominante sont indemnes de la mutation ; le risque d'avoir un enfant atteint est inférieur à 1% (ce qui correspond au risque résiduel de mosaïque chez l'un des parents)

### 2–pour les formes récessives de NS:

Cette forme ne concerne que certains patients présentant une mutation dans le gène *LZTR1*(régulateur transcriptionnel leucine–zipper–like1) ;si les deux mutations récessives sont identifiés chez l'enfant atteint ;les parents devront être génotypés pour vérifier la ségrégation des mutations .

Pour le 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.

Tous les patients diagnostiqués dans notre série étaient des cas sporadiques, le risque de récurrence a été estimé dans ce cas à 1%. Un conseil génétique a été prodigué à l'ensemble des familles.

# CONCLUSION

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'exploration moléculaire d'une population Marocaine atteinte du syndrome de Noonan, vu que ce dernier renferme particulièrement des taux élevés de cardiopathies congénitales, allant de 78% jusqu'à 100% dans certaines études.

Les principaux constituants de l'étiologie génétique sont les gènes PTPN11, SOS1, RAF1 et RIT1 qui renferment 93% des mutations identifiées dans le syndrome de Noonan. Ces gènes méritent d'être explorés systématiquement chez tous les patients atteints du syndrome de Noonan.

Nos résultats ont montré que les mutations de PTPN11 seules expliquent 35% des cas. Par contre aucune mutation pathogène n'a été identifiée sur le gène KRAS.

En comparant nos taux mutationnels et ceux des différentes populations du monde, les uns contre les autres, nous avons constaté qu'il existe des différences significatives assez fréquentes concernant les taux mutationnels du gène PTPN11 dans les populations Noonan. Ces résultats suggèrent que les mutations du gène PTPN11 pourraient être affectées par des facteurs d'ordre ethnique ou environnemental qui aboutissent à la variation de ces taux mutationnels.

Par ailleurs, sur le plan du conseil génétique et de la prise en charge, la détermination des causes moléculaires responsables, du syndrome de Noonan au sein d'une famille donnée, permettrait la précision du risque de récurrence, ainsi que la prévention de nouvelles récurrences au sein de la même famille. Ceci est valable pour les futures grossesses et pour la progéniture du patient lui-même. Cette prévention sera facilitée principalement par le diagnostic préimplantatoire, qui a connu récemment des progrès intéressants sur le plan international, et qui sera installé prochainement au Maroc.

A la fin de ce travail, nous proposons d'étudier l'ensemble des gènes impliqués dans le syndrome de Noonan chez les patients non mutés PTPN11 par une approche génomique en utilisant le séquençage de nouvelle génération.

# RESUME

## RESUME

Le syndrome de Noonan NS est une maladie génétique à transmission autosomique dominante, qui peut se présenter sous forme sporadique ou familiale. Il a été décrit pour la première fois par la cardiopédiatre Jacqueline NOONAN.

Le NS fait partie d'un groupe de maladies récemment nommé « RASopathies », est causé par des mutations du gène PTPN11 observées dans 50 % des cas, SOS1 dans 15 % des cas, et moins fréquemment dans d'autres gènes associés à la voie de signalisation RAS/MAPK. Le spectre clinique du SN peut différer légèrement selon les gènes responsables, et certaines formes ont été décrites comme Noonan-like.

Il peut affecter à des degrés divers presque tous les organes. De nombreuses manifestations de cette maladie sont présentes dès la naissance mais sont discrètes et peu spécifiques, retardant ainsi le diagnostic qui se fait souvent à un âge tardif (entre 5 et 10 ans).

L'objectif de notre étude est d'étudier le lien entre le groupe génétique (génotype) retrouvé à l'étude moléculaire et les particularités cliniques (phénotype) chez les patients de notre série atteints du syndrome de Noonan : corrélation génotype-phénotype. Cette étude permettrait de contribuer significativement à la recherche dans le volet de l'étiologie génétique du syndrome de Noonan au Maroc, qui est jusqu'alors très en retard par rapport aux pays développés.

Il s'agit d'une étude rétrospective – transversale, descriptive et analytique ; menée sur une durée 5 ans : de Juin 2016 à Juin 2021. Incluant les cas de Noonan suivis au sein du service de pédiatrie du CHU HASSAN II de Fès et adressés au service de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès pour étude génétique.

Le recueil des données épidémiologiques, cliniques et paracliniques a été réalisé au sein des services de génétique médicale du CHU HASSAN II de Fès à partir du système « HOSIX » et des dossiers des patients atteints de Noonan inclus dans l'étude

La population d'étude a inclus 59 patients. Pour cette étude, nous avons commencé par une analyse des 7 exons hébergeant les hotspots du gène PTPN11 par PCR séquençage chez l'ensemble des patients recrutés. Par la suite une analyse du gène KRAS a été réalisée chez les patients chez qui aucune mutation pathogène n'a été identifiée.

## **ABSTRACT**

Noonan syndrome NS is a genetic disorder with autosomal dominant transmission, which can present in sporadic or familial form. It was first described by cardiopediatrician Jacqueline NOONAN.

NS is part of a group of diseases recently named "RASopathies", is caused by mutations in the PTPN11 gene observed in 50% of cases, SOS1 in 15% of cases, and less frequently in other genes associated with the pathway. RAS/MAPK signaling. The clinical spectrum of NS may differ slightly depending on the causative genes, and some forms have been described as Noonan-like.

It can affect almost every organ to varying degrees. Many manifestations of this disease are present from birth but are discreet and not very specific, thus delaying the diagnosis which is often made at a late age (between 5 and 10 years).

The objective of our study is to study the link between the genetic group (genotype) found in the molecular study and the clinical particularities (phenotype) in patients in our series with Noonan syndrome: genotype-phenotype correlation. This study would make it possible to contribute significantly to research in the aspect of the genetic etiology of Noonan syndrome in Morocco, which until now is very late compared to developed countries.

This is a retrospective study - cross-sectional, descriptive and analytical; conducted over a period of 5 years: from June 2016 to June 2021. Including the cases of Noonan followed in the pediatric department of the CHU HASSAN II in Fez and sent to the medical genetics and oncogenetics department of the CHU HASSAN II in Fez for genetic study.

The collection of epidemiological, clinical and paraclinical data was carried out within the medical genetics departments of the CHU HASSAN II in Fez from the "HOSIX" system and the files of patients with Noonan included in the study.

The study population included 59 patients. For this study, we started with an analysis of the 7 exons hosting the hotspots of the PTPN11 gene by PCR sequencing in all the patients recruited. Subsequently, an analysis of the KRAS gene was carried out in patients in whom no pathogenic mutation was identified.

## ملخص

متلازمة Noonan NS هي مرض وراثي جسدي سائد ، يمكن أن يظهر بشكل متقطع أو عائلي. تم وصفه لأول مرة من قبل أخصائية أمراض القلب جاكلين نونان. تعد متلازمة Noonan جزءاً من مجموعة من الأمراض التي أُطلق عليها مؤخراً اسم "RASopathies" ، وهي ناتجة عن طفرات في جين PTPN11 لوحظ في 50٪ من الحالات ، و SOS1 في 15٪ من الحالات ، و تتواتر أقل في الجينات الأخرى المرتبطة بالمسار. RAS / MAPK. قد يختلف الطيف السريري اختلافاً طفيفاً اعتماداً على الجينات المسببة ، وقد تم وصف بعض الأشكال على أنها تشبه Noonan.

يمكن أن يؤثر على كل أعضاء الجسم تقريباً بدرجات متفاوتة. توجد العديد من مظاهر هذا المرض منذ الولادة ولكنها خفية وغير محددة للغاية، مما يؤخر التشخيص الذي يحدث غالباً في سن متأخرة (بين 5 و 10 سنوات).

الهدف من دراستنا هو دراسة الارتباط بين النمط الوراثي و المظهر الخارجي بخصوص عينة من المرضى المصابين بمتلازمة Noonan: و ارتباط النمط الوراثي و المظهر الخارجي. سيجعل من هذه الدراسة المساهمة بشكل كبير في البحث في مجال المسببات الوراثية لمتلازمة Noonan في المغرب ، والتي تعد حتى الآن متأخرة جداً مقارنة بالدول المتقدمة.

أجريت هذه الدراسة على مدى 5 سنوات: من يونيو 2016 إلى يونيو 2021. بما في ذلك حالات Noonan التي تمت متابعتها في قسم الأطفال في مستشفى الجامعي الحسن الثاني في فاس وإرسالها إلى قسم الوراثة الطبية وعلم الوراثة في مستشفى الجامعي الحسن الثاني في فاس من أجل تحليل الجينات.

تم جمع البيانات الويائية والسريرية وشبه السريرية داخل قسم الوراثة الطبية للمستشفى الجامعي الحسن الثاني في فاس من ملفات المرضى المصابين بمتلازمة Noonan. تشمل الدراسة 59 مريضا. حيث بدأنا بتحليل الإكسونات السبعة التي تتركز داخل النقاط الساخنة لجين PTPN11 عن طريق تتابع تفاعل البوليميراز المتسلسل لجميع المرضى المعينين. بعد ذلك ، تم إجراء تحليل لجين KRAS عند المرضى الذين لم يتم تحديد لديهم طفرة مسببة للمرض لجين PTPN11.

# ANNEXE



ETUDE DU GENE

(Noonan)



Prescription et renseignements clinico-biologiques

| PATIENT                 | MEDECIN PRESCRIPTEUR |
|-------------------------|----------------------|
| Nom .....               | SIGNATURE :          |
| Prénom.....             |                      |
| Date de naissance ..... |                      |
| Adresse.....            |                      |
| .....                   |                      |
| .....                   |                      |

| RENSEIGNEMENTS CLINIQUES  |
|---|
| Retard staturo-pondéral : Taille: ..... (.....DS)      Poids:..... (..... DS)   |
| Période prénatal : <input type="checkbox"/> hydramnios <input type="checkbox"/> clarté nucale augmentée   |
| Dysmorphie faciale :    front haut    hypertélorisme    oreilles bas implantées    ptosis    micrognathie    narines antéversées<br><input type="checkbox"/> cou court <input type="checkbox"/> pterygium coli <input type="checkbox"/> excès de peau nucale <input type="checkbox"/> constriction bitemporale <input type="checkbox"/><br><input type="checkbox"/> Macrocéphalie relative <input type="checkbox"/> Microcéphalie <input type="checkbox"/> Face triangulaire <input type="checkbox"/> FP anti mongoloïdes<br><input type="checkbox"/> Epicanthus <input type="checkbox"/> Rotation post des oreilles <input type="checkbox"/> Lèvres épaisses <input type="checkbox"/> Traits épais<br><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| Cardiovasculaire : <input type="checkbox"/> sténose valve pulmonaire <input type="checkbox"/> sténose artère pulmonaire<br>coarctation de l'aorte <input type="checkbox"/> canal atrio-ventriculaire <input type="checkbox"/> cardiomyopathie hypertrophique  |
| Peau et phanères : <input type="checkbox"/> hyperkératose <input type="checkbox"/> taches café au lait  |
| Neurologie :                      Retard mental <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui : <input type="checkbox"/> léger <input type="checkbox"/> modéré <input type="checkbox"/> sévère<br>Retard de langage <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui<br>Retard à la marche <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui<br>Traits autistiques <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui   |
| Divers : <input type="checkbox"/> pectus excavatum/carinatum <input type="checkbox"/> scoliose <input type="checkbox"/> cubitus valgus <input type="checkbox"/> clinodactylie <input type="checkbox"/> hyperlaxité des doigts<br>cryptorchidie <input type="checkbox"/> troubles oculaires <input type="checkbox"/> surdité <input type="checkbox"/> lymphoedème <input type="checkbox"/> hépato-splénomégalie <input type="checkbox"/> troubles de l'hémostase   |
| Autres signes et informations (précisez) :<br>.....<br>.....  |

Arbre généalogique     Consanguinité                      Père symptomatique :  oui     non                      Mère symptomatique : oui  non

Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique. Laboratoire Central d'Analyses Médicales.

CHU HASSAN II, B.P.1835, Fès – Tél: 0 5 53 08 70 03 Fax: 0 5 35 61 37 44

# **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 – El Bouchikhi, I., Belhassan, K., Moufid, F. Z., Iraqui Houssaini, M., Bouguenouch, L., Samri, I., ... Ouldim, K. (2016). Noonan syndrome– causing genes: Molecular update and an assessment of the mutation rate. *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 3(4),
- 2 – Allanson, J. E. (1987). Noonan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, Vol. 24, pp. 9-13.
- 3– Allanson, J. E. (2009). The clinical phenotype of Noonan syndrome. *Monographs in Human Genetics*, 17, 9-19.
- 4– Yart, A., & Edouard, T. (2018, February 1). Noonan syndrome: An update on growth and development. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, Vol. 25, pp. 67-73.
- 5– Zadeh, N. (2019). Noonan syndrome: Phenotypic variations and molecular genetics. In *Noonan Syndrome: Characteristics and Interventions* (pp. 1-14).
- 6 –Turner, A. M. (2014, October 1). Noonan syndrome. *Journal of Paediatrics and Child Health*, Vol. 50, pp. E14-E20.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2010.01970.x>
- 7 – Shaw, A. C., Kalidas, K., Crosby, A. H., Jeffery, S., & Patton, M. A. (2007). The natural history of Noonan syndrome: A long-term follow-up study. *Archives of Disease in Childhood*, 92(2), 128-132.
- 8– Sharland, M., Burch, M., McKenna, W. M., & Paton, M. A. (1992). A clinical study of Noonan syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 67(2), 178-183.
- 9 – V Bhambhani, M Muenke. Noonan syndrome. *Am Fam Physician* 2014, 89 :37-43
- 10– Roberts, A. E., Allanson, J. E., Tartaglia, M., & Gelb, B. D. (2013). Noonansyndrome. *The Lancet*, Vol. 381, pp. 333-342.

- 11– Rohrer, T. (2009). Noonan syndrome: Introduction and basic clinical features. *Hormone Research*, 72(SUPPL. 2), 3–7.
- 12– Romano, A. A., Allanson, J. E., Dahlgren, J., Gelb, B. D., Hall, B., Pierpont, M.E., ... Noonan, J. A. (2010, October). Noonan syndrome: Clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*, Vol. 126, pp. 746–759.
- 13– Jafry, M., & Sidbury, R. (2020). RASopathies. *Clinics in Dermatology*, 38(4), 455–461.
- 14– Jorge, A. A. L., Malaquias, A. C., Arnhold, I. J. P., & Mendonca, B. B. (2009, April). Noonan syndrome and related disorders: A review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway. *Hormone Research*, Vol. 71, pp. 185–193.
- 15– Tartaglia, Marco, Gelb, B. D., & Zenker, M. (2011, February). Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 25, pp. 161–179.
- 16 – Roberts AE. Noonan Syndrome. 2001 Nov 15 [Updated 2022 Feb 17]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.
- 17– Malaquias, A. C., & Jorge, A. A. L. (2021, January 1). Activation of the MAPK pathway (RASopathies) and partial growth hormone insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 519.
- 18– Gelb, B. D., & Tartaglia, M. (2006). Noonan syndrome and related disorders: Dysregulated RAS–mitogen activated protein kinase signal transduction. *Human Molecular Genetics*, 15(SUPPL. 2).
- 19– El Bouchikhi, I., Samri, I., Iraqui Houssaini, M., Trhanint, S., Bouguenouch, L., Sayel, H., ... Ouldin, K. (2015). The first PTPN11 mutations in hotspot exons reported in Moroccan children with

- Noonan syndrome and comparison of mutation rate to previous studies. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(2), 306–312.
- 20– Jongmans, M. C. J., Hoogerbrugge, P. M., Hilkens, L., Flucke, U., Van Der Burgt, I., Noordam, K., ... Hoogerbrugge, N. (2010). Noonan syndrome, the *SOS1* gene and embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes and Cancer*, 49(7), 635–641.
- 21– Jorge, A. A. L., Malaquias, A. C., Arnhold, I. J. P., & Mendonca, B. B. (2009, April). Noonan syndrome and related disorders: A review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway. *Hormone Research*, Vol. 71, pp. 185–193.
- 22– Ko, J. M., Kim, J. M., Kim, G. H., & Yoo, H. W. (2008). *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, and *RAF1* gene analysis, and genotype–phenotype correlation in Korean patients with Noonan syndrome. *Journal of Human Genetics*, 53(11–12), 999–1006.
- 23– Kobayashi, T., Aoki, Y., Niihori, T., Cavé, H., Verloes, A., Okamoto, N., ... Matsubara, Y. (2010). Molecular and clinical analysis of *RAF1* in Noonan syndrome and related disorders: Dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Human Mutation*, 31(3), 284–294.
- 24– Lepri, F., De Luca, A., Stella, L., Rossi, C., Baldassarre, G., Pantaleoni, F., ... Tartaglia, M. (2011). *SOS1* mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype–phenotype correlations. *Human Mutation*, 32(7), 760–772.
- 25– adapté de V Bhambhani, M Muenke. Noonan syndrome. *Am Fam Physician* 2014, 89:37–43

- 26 – Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Mol Syndromol*. 2010;1:2–26.
- 28– Verloes A, Cavé H. La voie de signalisation de RAS et ses syndromes (Noonan, LEOPARD, CFC, Costello). *Arch Ped*. 2007;14(6):586–9.
- 29– Tamir I, Dal Porto JM, Cambier JC. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatase SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:307–15.
- 30– Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res*. 1999;253:47–54.
- 31– Lee BH, Kim JM, Jin HY, Kim GH, Choi JH, Yoo HW. Spectrum of Mutations in Noonan Syndrome and Their Correlation with Phenotypes. *J Pediatr*. 2011;159:1029–35.
- 33– Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2007;39:70–4.
- 34– Webb GC, Jenkins NA, Largaespada DA, Copeland NG, Fernandez CS, Bowtell DD. Mammalian homologues of the Drosophila Son of sevenless gene map to murine chromosomes 17 and 12 and to human chromosomes 2 and 14. *Genomics*. 1993;18:14–9.
- 35 – Nimnual A, Bar-Sagi D. The two hats of SOS. *Sci STKE*. 2002;145:36.
- 36– Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mut*. 2011;32:760–72.
- 37 – Donovan S, Shannon KM, Bollag G. GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1602:23–45.
- 38– Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294:1299–1304.

- 39– Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2006;38:331–36.
- 42– Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2007; 39:1007–12.
- 43– Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mut.* 2009;30:695–702.
- 44– Fischer A, Baljuls A, Reinders J, Nekhoroshkova E, Sibilski C, Metz R, et al. Regulation of RAF activity by 14–3–3 proteins: RAF kinases associate functionally with both homo- and heterodimeric forms of 14–3–3 proteins. *J Biol Chem.* 2009;284(5):3183–94.
- 45– Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP–2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2001; 29:465–8.
- 46 – Hof P, Pluskey S, Dhe–Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase ,SHP–2. *Cell.* 1998;92:441–50.
- 47– O’Reilly AM, Pluskey S, Shoelson SE, Neel BG. Activated mutants of SHP–2 preferentially induce elongation of *Xenopus* animal caps. *Mol Cell Biol.* 2000;20:299–311.



# المظاهر الجينية لمتلازمة نونان ( بصدد 59 حالة )

## الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2022/03/30

من طرف

السيد المصطفى لهديلي

المزداد في 1976/02/15 ببني ملال

## لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية

متلازمة نونان - جين PTPN11 - اعتلال عضلة القلب - جين KRAS

## اللجنة

السيد مصطفى محمود ..... الرئيس  
أستاذ في علم الجراثيم

السيدة ليلى بوكوش ..... المشرف  
أستاذة مبرزة في علم الوراثة

السيد منصف عمراني حسني .....  
أستاذ في علم الدم

السيد كريم اولديم .....  
أستاذ في علم الوراثة

السيدة سناء بنيس .....  
أستاذة في بيولوجيا الخلية