



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BENABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

Spectre Mutationnel du Syndrome de Noonan

Présenté par : Gharmili Sefrioui Mohammed Ilias

Encadré par : Pr SQALLI.H

Pr Ouldin.K

Soutenu le : **09 juin 2017**

Devant le jury composé de :

- **Pr SQALLI.H**
- **Pr GUISSIS**
- **Pr OULDIM.K**

Stage effectué à : CHU Hassan II fès , Laboratoire centrale de génétique médicale et d'oncogénétique

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.

Principalement : Pr. SQALLI HOUSSAINI HAKIMA, je suis fière et heureux d'avoir été l'un de ses étudiants. Je la remercie d'avoir accepté d'encadrer ce projet et de me faire part de son expérience. Les résultats de ce travail doivent beaucoup aux exigences de sa rigueur scientifique, à ses orientations, et à son talent pédagogique. C'est pour moi, l'opportunité de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour son esprit ouvert et ses conseils précieux.

Pr. OULDIM KARIM, responsable de l'Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique au Centre hospitalier Hassan II (CHU) de Fès, au service de Laboratoire. Je le remercie de m'avoir encouragé et m'avoir accordé toute sa confiance, sa disponibilité, l'aide et les conseils concernant les missions évoquées lors des différents suivis tout au long de ces deux mois. Sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

J'exprime ma gratitude au Docteur Ahakoud M. ainsi que Mme Bouguenouch Laïla (Professeur à l'Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique) pour leur soutien, leur disponibilité et leur aide durant toute la période de stage.

Listes des figures et des tableaux

Figures :

Figure 1 : Patients d'âge différents atteints de syndrome de Noonan

Figure 2: Enchaînement des exons et des introns du gène *PTPN11* avec leurs domaines protéiques correspondant au niveau de la protéine SHP2.

Figure 3 : Mécanismes d'activation de la protéine SHP2

Figure 4 : Structure tridimensionnelle de SHP2 dans sa conformation basale

Figure 5 : Spectrophotomètre Nanodrop

Figure 6 : Schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne.

Figure 7: Analyseur Génétique 3500Dx.

Figure 8: Migration des différents exons sur gel d'agarose.

Figure 9 : Electrophérogramme de l'exon 13 du gène *PTN11* Mutation c.1510A>G à l'état hétérozygote.

Figure 10 : Electrophérogramme de l'exon 4 du gène *PTN11* Mutation c.417G>C à l'état hétérozygote

Figure 11 : Electrophérogramme du gène *PTN11* Mutation c.854-21T>G à l'état hétérozygote

Figure 12 : Electrophérogramme du gène *PTN11* (Profil normal).

Tableaux :

Tableau 1 : Série de patients présentant le syndrome de Noonan

Tableau 2 : Programme spécifique de l'ExoSap

Tableau 3 : Volumes des réactifs du mix de la réaction de la séquence

Tableau 4: Programme de la réaction de séquence

Tableau 5: Répartition des patients selon l'âge.

Tableau 6: Répartition des patients selon le sexe.

Tableau 7 : Concentration d'ADN de patients

Tableau 8: Profil clinique et mutationnel des patients atteints par le syndrome de Noonan

Tableau 9 : Taux de mutation du gène *PTPN11* dans différentes études de patients atteints du syndrome de Noonan.

Sommaire

Sommaire	1
Introduction générale	5
Généralités	7
I- SYNDROME DE NOONAN.....	8
1- DEFINITION	8
2- HISTORIQUE	8
3- PHENOTYPE	9
4- GENE PTPN11	10
5- PROTEINE SHP2.....	11
6- MUTATIONS DE PTPN11.....	12
7- RELATION GENOTYPE-PHENOTYPE.....	13
II- TECHNIQUES DE MARQUAGE MOLECULAIRE	14
Matériel et méthodes	15
I- MATERIEL	16
II- METHODES.....	16
1. PRELEVEMENT SANGUIN.....	16
2. EXTRACTION D'ADN PAR KITS	16
3. DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES.....	17
4. AMPLIFICATION DE L'ADN EXTRAIT PAR PCR	18
5. VISUALISATION DU PRODUIT PCR PAR ELECTROPHORESE.....	20
6. SEQUENÇAGE DES PRODUITS PCR DU GENE PTPN11 :	20
7. CHARGEMENT DE L'ANALYSEUR GENETIQUE	23
8. OUTILS DE BIOINFORMATIQUE	24
Résultats et discussion	25
Conclusion générale.....	33
Références bibliographiques	35
Annexes.....	38

Introduction

générale

Le syndrome de Noonan est une pathologie génétique à symptomatologie clinique très riche dont le traitement nécessite une collaboration multidisciplinaire. Le pronostic est conditionné par l'atteinte des organes vitaux, essentiellement le cœur. . Il résulte des mutations de la protéine-phosphatase, non récepteur de type 11 (PTPN11) dans environ 50% des cas.

Plusieurs gènes ont déjà été mis en cause dans le passé, gènes dont les anomalies apparaissent conjointement responsables de ce syndrome qui semble donc fortement hétérogène sur le plan génétique. En particulier, des mutations des gènes qui codent pour la phosphatase PTPN11, pour K-RAS et H-RAS ont déjà été mises en évidence, toutes ces protéines étant impliquées dans la voie RAS/MAP-kinase qui est une des principales voies de signalisation intracellulaire entre la membrane et les effecteurs nucléaires.

Le dépistage mutationnel de PTPN11 a été mené dans différentes populations. Ainsi ce travail a pour objectif de pouvoir mieux évaluer le rapport génotype phénotype sur une série de patients pour lesquels une étude moléculaire de PTPN11 a été demandée afin de faire le diagnostic de syndrome de Noonan.

Généralités

I- SYNDROME DE NOONAN

1- DEFINITION

Le Syndrome de Noonan (SN) est une affection d'origine génétique associant dysmorphie, retard de croissance, retard mental et syndrome poly-malformatif. Le mode de transmission est autosomique dominant. La fréquence estimée est de 1/2500 à 1/1000 naissances (Nora JJ, 1974).

Il existe une hétérogénéité génétique, un peu moins de la moitié des patients étant porteurs d'une mutation dans le gène PTPN11 et environ 5% dans le gène KRAS.

2- HISTORIQUE

Le premier patient publié suspect de SN est un patient décrit par Koblinsky en 1883. Ullrich en 1930 décrivit une série de plusieurs patients, garçons et filles qui présentaient un retard de croissance et un pterygiumcolli.

Indépendamment, Turner en 1938 décrivit une fille présentant les mêmes symptômes ainsi qu'une absence de développement des caractères sexuels secondaires.

En 1959, les progrès de la cytogénétique permirent de démontrer que parmi les patientes atteintes de ce syndrome, certaines étaient porteuses d'une aneuploïdie : 45, X.

Le terme «Syndrome de Noonan» fut utilisé pour la première fois par Opitz en 1965 pour un patient présentant ce phénotype.

En 1968, Noonan publia une série de 19 patients présentant des particularités morphologiques communes et une malformation cardiaque. Parmi eux 17 étaient porteurs d'une sténose valvulaire pulmonaire et deux d'un canal artériel persistant. Les traits morphologiques étaient proches de ceux rencontrés dans le Syndrome de Turner, lié à l'aneuploïdie 45, X. Le caryotype était normal et les deux sexes étaient atteints.

Le SN fut inclus en 1972 dans la référence Mendélien inheritance in Man (MIM) de Victor McKusick. Un chevauchement phénotypique avec d'autres syndromes poly malformatif comme le syndrome de Watson (neurofibromatose et sténose valvulaire pulmonaire), le syndrome cardio-facio-cutané et le Syndrome de Costello (Leichtman, 1996).

Le locus majeur (NS1) et le gène responsable PTPN11 sont identifiés respectivement par Jamieson et al. en 1994 et par Tartaglia et al en 2001. 40% des patients sont concernés. En 2006,

Schubbert et al. découvrent un second gène responsable de SN : KRAS, impliqué chez moins de 5% des patients (Schubbert, 2006).

3- PHENOTYPE

Le diagnostic du SN est avant tout un diagnostic clinique. Le phénotype est très variable d'un patient à l'autre, aucun signe n'étant constant. La période anténatale peut être silencieuse. Les paramètres de naissance sont le plus souvent normaux. La période néonatale est le plus souvent marquée par des troubles de l'alimentation qui disparaîtront après quelques mois.

Le syndrome dysmorphique est d'abord discret puis s'accroît pendant l'enfance. Il est caractérisé par un visage triangulaire, un front haut et large, un épicanthus, un ptosis asymétrique, un hypertélorisme, des fentes palpébrales orientées en bas et en dehors, un nez avec une racine déprimée et une pointe bulbeuse, des oreilles basses implantées, en rotation postérieure avec un hélix épais, un philtrum profond, un micrognathisme. Le palais est ogival, les dents souvent mal implantées, pouvant provoquer une mal occlusion. Avec l'âge, le visage devient plus triangulaire et la dysmorphie peut devenir plus discrète (Allanson, 1985), les cheveux sont souvent bouclés et bas implantés, le cou est court avec un pterygiumcolli. Au niveau thoracique, le sternum est déformé (pectus carinatum en haut et excavatum en bas), le thorax est large et les mamelons écartés (figure 1). D'autres déformations squelettiques sont fréquentes: scoliose, cubitus valgus. Il existe un retard de croissance post-natal modéré inconstant en effet des patients adultes ont une taille dans les limites de la normale (Noonan, 2003), sans microcéphalie associée, avec un retard d'âge osseux ainsi la puberté peut également être retardée (Sharland, 1992).

L'atteinte viscérale la plus fréquente et la plus sévère est l'atteinte cardiaque touchant 50 à 80% des patients (Allanson, 1987).

Au niveau génito-urinaire, l'anomalie la plus fréquemment retrouvée est une cryptorchidie (60 à 80% des garçons), pouvant entraîner une stérilité si elle n'est pas traitée.

Des troubles de la coagulation peuvent être présent (environ 50 % des patients).

Le trouble neurosensoriel le plus fréquent est une surdité de perception, et des problèmes ophtalmologiques (strabisme, myopie, hypermétropie, astigmatisme) sont présents chez près de 9 patients sur 10 (Lee, 1992).



Figure 1 : Patients d'âge différents atteints de syndrome de Noonan

4- GENE PTPN11

PTPN11 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11), localisé en 12q24.13 est le principal gène responsable du syndrome de Noonan.

La région responsable (locus NS1) est identifiée par analyse de liaison à partir de diverses familles (Jamieson et al, 1998). Ces premières études ont également démontré l'hétérogénéité génétique du SN, certaines familles n'étant pas liées à ce locus.

En 2001, Tartaglia et al. mettent en évidence des mutations 'faux sens' dans le gène PTPN11 situé dans le locus NS1 chez des patients atteints. Les séries de patients atteints ont montré un taux de mutation allant de 33% à 60% (Kosaki *et al.* 2002 ; 2004).

Au niveau génomique, PTPN11 s'étend sur 91 kb, et est formé de 16 exons. L'exon 16 est le plus étendu et n'est pas traduit. Le transcrit est composé de 6282 pb et code pour la protéine SHP2.

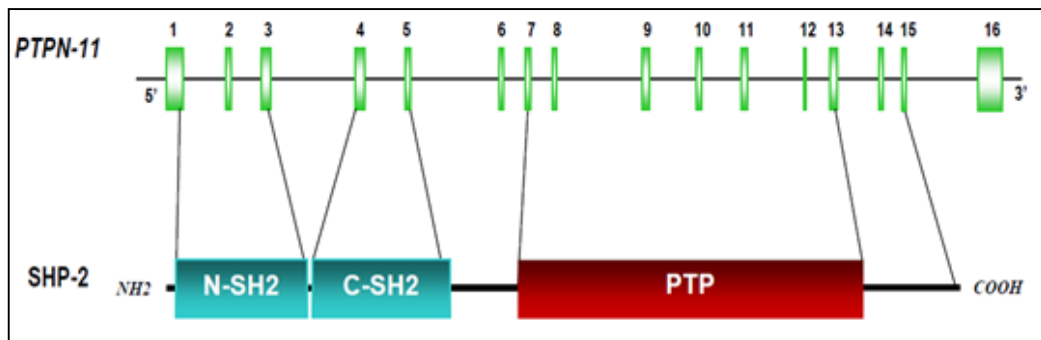


Figure 2: Enchaînement des exons et des introns du gène PTPN11 avec leurs domaines protéiques correspondant au niveau de la protéine SHP2.

5- PROTEINE SHP2

PTPN11 code pour SHP2 (SH2 domain containing protein), protéine de 593 résidus de la petite famille des tyrosines phosphatases contenant des domaines SH2, ayant pour fonction la transduction de messages intracellulaires. La SHP2 est exprimée de façon ubiquitaire et joue un rôle important lors du développement embryonnaire, lors de la phase initiale de la gastrulation (Saxton, 1999), de la formation des membres, et de la formation des valves cardiaques semi lunaires (Chen, 2000).

La structure de la protéine est composée de deux domaines SH2 en position amino-terminale (N-SH2 et C-SH2), d'un domaine catalytique (PTP), et d'une queue carboxy-terminale riche en proline contenant deux sites de phosphorylation de tyrosine. Les études cristallographiques montrent une interaction physique entre les domaines N-SH2 et PTP ce qui permet la liaison aux cibles contenant les phospho-tyrosines. Une fois cette liaison effectuée, le domaine N-SH2 effectuerait un changement conformationnel mettant fin à l'interaction avec le domaine PTP et permettant la libération du site catalytique (Hof P, 1998). Les domaines SH2 sont connus pour se lier aux récepteurs membranaires de type tyrosine kinase, spécifiques de certains facteurs de croissance.

Le rôle précis de SHP2 est encore mal compris. Il joue un rôle de régulation dans les voies de transduction du signal intracellulaire : activation de la voie, RAS/MAPK induite par les intégrines et les facteurs de croissance EGF (dont l'activation du récepteur EGFR est nécessaire au développement des valves semi-lunaires), IGF1, PDGF, FGF (Chen *et al.*, 2000), activation des kinases de la famille Src jouant un rôle dans la motilité et l'adhésion cellulaire, inhibition de la voie JAK/STAT induite par les cytokines (Chen, 2003) et régulation de la concentration du Calcium intracellulaire permettant l'activation de la voie calcine urine/NFAT nécessaire au développement cardiaque après stimulation par FGF et PDGF (Uhlen, 2006)

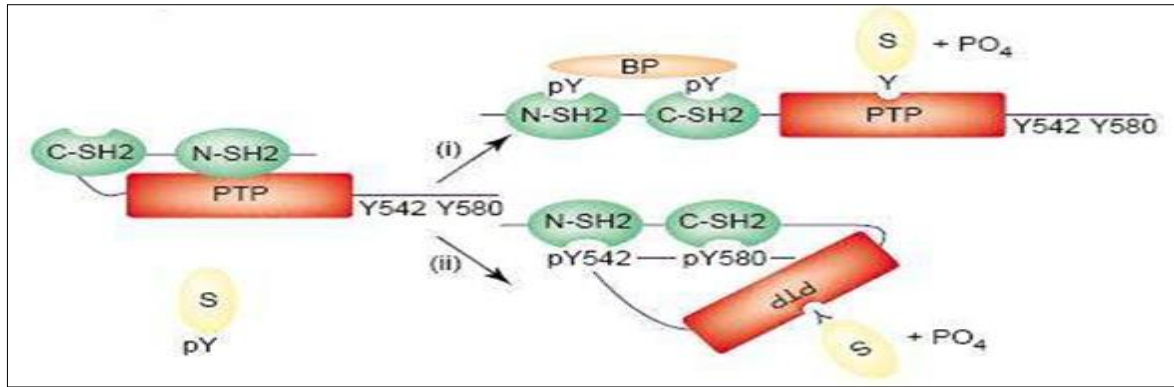


Figure 3 : Mécanismes d'activation de la protéine SHP2

A l'état basal le domaine N-SH2 masque le site catalytique et SHP2 est inactif. Il existe 2 mécanismes d'activation (Neel, 2003) :

- i. une protéine activatrice se lie aux domaines SH2 par l'intermédiaire de ses résidus phosphotyrosyl. Le site catalytique est libéré et SHP2 peut déphosphoryler son substrat.
- ii. Les deux tyrosines du domaine C-terminal sont phosphorylées et se lient aux domaines SH2. Le site catalytique est libéré et SHP2 peut déphosphoryler son substrat.

6- MUTATIONS DE PTPN11

Les mutations de PTPN11 responsables de SN sont des substitutions nucléotidiques de type faux sens. 76 mutations différentes ont été décrites (Tartaglia, 2005). Elles surviennent dans plus de 95% des cas dans les exons 3, 7, 8 et 13.

La mutation c.A922G responsable de la substitution amino-acidique p.N308D est la plus fréquente des mutations (20%). Ces mutations ne sont pas réparties de façon homogène le long du gène mais sont le plus souvent situées au niveau des domaines N-SH2 ou PTP, en particulier au niveau des résidus directement impliqués dans l'interaction de ces domaines. Une mutation du résidu D106, A317C, situé au niveau de la liaison entre les domaines N-SH2 et C-SH2, altérerait la flexibilité du domaine N-SH2 et empêcherait en conséquence l'interaction avec le domaine PTP (Tartaglia, 2002). Une mutation ne correspondant pas à une substitution nucléotidique mais à une délétion de 3 nucléotides, sans changement de phase : 179-181 del GTG a été décrite chez un enfant présentant un phénotype sévère (Yoshida, 2004). Ces mutations ont un effet activateur sur SHP2. Au niveau basal, les domaines PTP et N-SH2 interagissent l'un avec l'autre et la fonction catalytique est inhibée. Les mutations impliquées dans le SN provoquent la perte de cette interaction et donc un maintien de la forme activée et par conséquent une augmentation de l'activité phosphatase (Tartaglia, 2001).

La majorité des cas de SN sont sporadiques (> 80 %), donc dus à des néomutations.

En 2004, Tartaglia *et al.*, ont démontré dans une série de 14 patients que toutes les néomutations apparaissent sur l'allèle paternel. Par ailleurs, l'âge paternel était significativement plus élevé que dans la population générale.

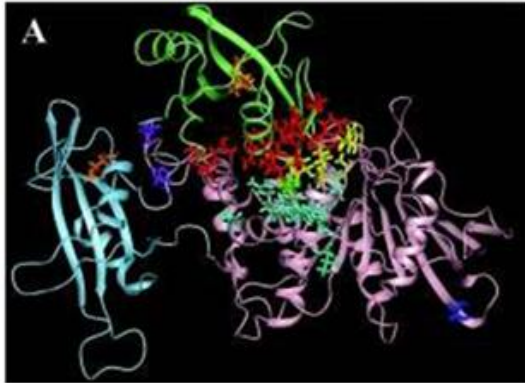


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de SHP2 dans sa conformation basale (vert : NSH2, cyan : C-SH2, rose : PTP) et localisation des résidus mutés dans le syndrome de Noonan (chaîne latérale colorée), en grande majorité au niveau de la zone d'interaction entre N-SH2 et PTP..

7- RELATION GENOTYPE-PHENOTYPE

Plusieurs études ont été réalisées afin de mettre en évidence des différences phénotypiques entre les patients mutés dans le gène PTPN11 et les patients non-mutés. Aucun signe n'apparaît comme spécifique ni chez les patients mutés, ni chez les patients non mutés.

La sténose valvulaire semble être le signe le plus corrélé à la présence de mutation du gène PTPN11. Trois études ont montré une différence de prévalence significative entre le groupe des patients mutés et le groupe des patients non mutés pour ce symptôme (Tartaglia & Zenker, 2004). D'autres signes ont été rapportés comme plus fréquent chez les patients mutés : dysmorphie typique, hématomes fréquents, petite taille. La cardiomyopathie hypertrophique semble à l'inverse plus souvent retrouvée chez les patients non mutés (Tartaglia M, 2002).

Récemment plusieurs études ont comparé le résultat du traitement par hormone de croissance entre les patients mutés et les patients non mutés. Les patients non mutés semblent mieux répondre au traitement et leur taux d'IGF1 augmente significativement plus que chez les patients mutés (Binder G, 2005).

Il existe donc une résistance partielle au traitement par GH chez les patients mutés.

Par ailleurs, une étude (Tartaglia, 2002) suggère que les patients SN ayant la mutation c.A922G ne présenteraient pas le déficit intellectuel du SN. Cette donnée n'a pas été confirmée dans 2 autres études postérieures (Jongmans, Sarkozy, 2003)

II- TECHNIQUES DE MARQUAGE MOLECULAIRE

La technique RFLP repose sur la digestion d'un DNA cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par le DNA. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un DNA sonde, provenant souvent de banques de DNA génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier (sonde hétérologue).

La technique RAPD est basée sur la méthode PCR. L'amplification du DNA génomique est, cette fois ci, réalisée à partir d'amorces de séquences aléatoires (10 bases, environ), utilisées seules ou par couples. Lorsqu'une seule amorce aléatoire est utilisée, l'amplification a lieu une fois celle ci se fixe sur 2 sites complémentaires peu distants (maximum théorique de la PCR : 3000 pb).

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une méthode d'analyse hautement sensible utilisée fréquemment dans l'analyse de la diversité génétique. Elle combine les techniques RFLP et l'amplification du DNA par PCR. La technique est aussi appelée ' Amplification sélective des fragments de restriction de DNA

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée in vitro. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure.

Matériel et méthodes

I- MATERIEL

Il s'agit d'une étude rétrospective portée sur une série de 5 patients présentant le syndrome de Noonan, dont 2 du sexe féminin et 3 du sexe masculin. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire d'oncologie et biologie moléculaire de CHU de Fès, dans une période de 5 mois à compter du 1^{er} janvier 2017, afin d'étudier les mutations du gène PTPN11 qui est responsable du syndrome de Noonan.

Tableau 1 : Série de patients présentant le syndrome de Noonan

N°	Sexe	Age	Dysmorphie faciale	RSP	Cardiopathie
P1	Masculin	2 ans	+	-	+
P2	Féminin	9 ans	+	+	+
P3	Féminin	10 ans	+	-	+
P4	Masculin	20 ans	+	-	-
P5	Masculin	11 mois	+	-	+

II- METHODES

Chaque échantillon de sang est traité afin de déterminer les natures des mutations de l'ensemble du gène PTPN11 au niveau des exons 2, 3, 4, 7, 8, 12 et 13.

Ce traitement débute d'abord dans une salle de consultation génétique, par un examen du patient par un médecin spécialiste et une préparation du dossier cytogénétique (Annexe 5), un prélèvement du sang par la suite est nécessaire suivi de plusieurs étapes et techniques génétiques.

1. PRELEVEMENT SANGUIN

Le prélèvement sanguin est effectué dans des conditions stériles. Dans un tube hépariné, 5 ml de sang veineux périphérique sont prélevés. Le prélèvement sanguin ne peut être conservé plus de trois jours à + 4°C.

2. EXTRACTION D'ADN PAR KITS

2-1- Principe

Ce kit permet une purification rapide d'environ 6 µg d'ADN total à partir de 200 µl de sang total, tube EDTA. Les échantillons peuvent être frais ou congelés.

- Lyse des cellules avec la protéinase K et le tampon de lyse
- Absorption de l'ADN sur la membrane

Les conditions en sel et de pH font que, après une brève centrifugation, l'ADN se fixe sur la membrane de silice et que les protéines et autres contaminants ne sont pas retenus.

- Elimination des contaminants résiduels
- L'ADN fixé est lavé par 2 étapes de centrifugation
- Elution de l'ADN

L'ADN est élué avec du tampon Pure Link™ Genomic Elution Buffer à température ambiante.

2-2- Techniques

Dans un tube Eppendorf de 1.5ml 200 µl de sang, 20 µl de Protéinase K, et 20 µl de RNase A sont ajoutés, vortexés pendant 15 secondes, et incubés 2 minutes à température ambiante. Par la suite 200 µl de Pure Link™ Genomic Lysis /Binding Buffer est ajouté, vortexé environ 15 secondes et incubé 10 minutes à 55°C, après il faut mettre 200 µl d'éthanol absolu, mélanger dans la colonne Pure Link™ et centrifuger 1 minute à 8000 rpm. Il faut mettre la colonne dans un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le kit) et éliminer le tube contenant le filtrat. Cette fois ci 500 µl de tampon Wash Buffer est ajouté et centrifugé 1 minute à 8000 rpm. La colonne est mise dans un tube collecteur de 2 ml (fourni dans le kit) et le tube contenant le filtrat est jeté. Encore une fois 500 µl de tampon Wash Buffer 2 est ajouté avec centrifugation de 3 minutes à 14000 rpm. Il faut placer par la suite la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, auquel il faut ajouter 50 ou 100 µl de tampon Pure Link™ Genomic Elution Buffer et incubé 1 à 5 minutes à température ambiante. Une centrifugation ensuite pendant 1 minute à 8000 rpm est nécessaire. Une deuxième élution est nécessaire dans laquelle les 50 µl sont remis dans la colonne et centrifugé 1 minutes à 8000 rpm. Et Pour finir il faut conserver l'ADN extrait à +4°C ou -20°C. (Annexe 3)

3. DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

3-1- But

La concentration de l'ADN extrait est dosée par le Spectrophotomètre Nanodrop (figure5). Afin d'amplifier le gène recherché par PCR, il est nécessaire que les solutions d'ADN extraits aient la même concentration (100 ng /µl). Il faut donc estimer la quantité d'ADN et diluer à la concentration recherchée.



Figure 5 : Spectrophotomètre Nanodrop

3-2- Principe

Pour la quantification de l'ADN, on utilise la longueur d'onde 260 nm correspondant à la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques dans l'ultraviolet. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Pour une solution d'ADN purifiée, le rapport $R=A(260)/A(280)$ permet d'évaluer la pureté de l'ADN. Il doit être entre 1,8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Si le rapport est supérieur à 2, cette valeur indique une probable contamination par des ARN.

4. AMPLIFICATION DE L'ADN EXTRAIT PAR PCR

4-1- Principe

La réaction PCR (Polymérase Chain Réaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Pour ce faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

4-2- Acteurs de la PCR

L'ADN : généralement sous forme de double-brin, il contient le fragment à amplifier.

Deux amorces, sens et anti-sens, qui sont des petits brins d'ADN d'environ 20 bases, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.

Une enzyme : la Taq Polymérase, une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie (*Thermus aquaticus*). Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Les Nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, sont les éléments de base utilisés par la Taq Polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

4-3- Réaction

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes : 1 : dénaturation, 2 : hybridation, 3 : élongation. (Figure 6).

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis à différentes températures. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur, La PCR a été effectuée et optimisée sur l'ADN génomique (10 ng/μl), en utilisant des amorces spécifiques pour le gène étudié (exon 2, 3, 4, 7, 8, 12, 13 et 14 du gène PTPN11) (annexe 1).

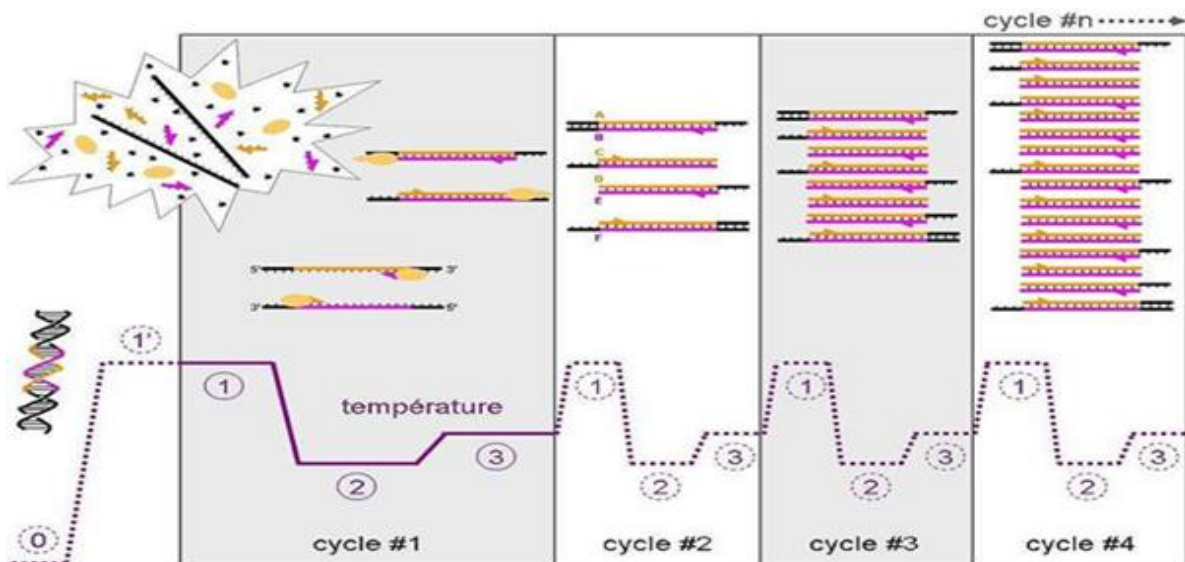


Figure 6 : Schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne.

5. VISUALISATION DU PRODUIT PCR PAR ELECTROPHORESE

5-1- Principe

Le contrôle des produits amplifiés se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est une macromolécule chargée négativement, de ce fait, elle peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration TAE (Tris-Acétate-EDTA).

Les échantillons sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant qui possède une masse moléculaire faible et qui permet de détecter le front de migration.

Lors de la préparation du gel d'agarose, le BET (Bromure d'éthidium), agent intercalant, se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur du double hélice, est ajouté. Cette molécule est fluorescente sous UV et permet de détecter les fragments d'acides nucléiques.

5-2- Protocole expérimental

Dans un premier temps, le gel d'agarose 2% est préparé. Pour ceci, dans un récipient, 1g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X sont mélangés. On porte à ébullition puis on ajoute 2 µl de BET. On coule le gel dans le moule à électrophorèse. On y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN.

Après refroidissement, on installe le moule dans la cuve qui est remplie du tampon de migration (TAE 1X). On dépose dans chaque puits un mélange de 6 µl de produit PCR et de 2 µl de solution de charge qui a pour rôle de stabiliser l'ADN au fond du puits et la migration est lancée à 100 V.

Finalement, les bandes d'ADN fluorescentes sont visualisées sous UV.(Annexe 3)

6. SEQUENÇAGE DES PRODUITS PCR DU GENE PTPN11 :

6-1- Principe

Le séquençage est un procédé qui permet d'obtenir la séquence nucléotidique exacte d'un fragment d'ADN. Cette technique a reconnu depuis, un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, marquage par quatre types de fluorochromes, automatisation du processus..., Avant de procéder au séquençage proprement dit, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquencer afin d'obtenir un résultat optimal.

Cette condition nécessite trois étapes :

A- Purification par l'ExoSap ;

B- Réaction de séquence par BigDyeR. Terminator ;

C- 2ème Purification de produit de PCR.

6-2- Purification de produit PCR

6-2-1- Principe

La purification du produit PCR consiste à éliminer les traces des constituants de la réaction de PCR, à savoir, les amorces, les résidus, les dNTP... et ne garder que l'ADN à séquencer pour ne pas gêner les réactions en aval.

6-2-2- Réactifs nécessaires

- Produit PCR ;
- L'ExoSap-IT® qui est constitué principalement de deux enzymes:
 - ❖ L'exonucléase S1 qui dégrade tous les brins monocaténaire et donc toutes les amorces.
 - ❖ La phosphatase alcaline qui va déphosphoryler tous les dNTP qui n'étaient pas incorporés dans la réaction précédente.

6-2-3- Protocole expérimental

Dans un tube Eppendorf de 0.2 ml, on met 1 µl de la solution ExoSap en présence de 5 µl du produit PCR. On met le mélange réactionnel dans le ThermoCycleur (8000 tr/min) et on lance le programme spécifique de l'ExoSap :

Tableau 2 : Programme spécifique de l'ExoSap

Stade	Température	Temps
1	37°C	30 min
2	80°C	15 min
3	10°C	Infini

6-3- Réaction de séquence

6-3-1- Principe

Cette technique comme la PCR, est basée sur la copie d'un fragment d'ADN que l'on désire séquencer par une Taq polymérase. Sauf que dans cette réaction on ajoute en plus des 4 dNTP une faible quantité des 4 ddNTP (didésoxyribonucléotides) dont le groupement OH du carbone 3' du désoxyribose est remplacé par un atome d'hydrogène de façon à bloquer la réaction d'élongation chaque fois incorporé. Chaque type de ddNTP est marqué par un fluorochrome différent qui servira à la détection des bases au niveau du séquenceur.

6-3-2- Réactifs nécessaires

- Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator, Kit qui contient principalement : Taq polymérase ; dNTP et ddNTP marqués ;

- tampon ;
- MgCL2.
- Produit PCR purifié
- Amorces spécifiques
- Eau stérile.

6-3-3- Protocole expérimental

Le mix préparé est illustré dans le tableau ci-dessous.

Après une centrifugation rapide à 8000 tr/min pendant 2min, le tube est incubé dans le Thermocycleur et le programme suivant est démarré.

Tableau 3 : Volumes des réactifs du mix de la réaction de la séquence

Tube de Réaction	BigDye (µl)	Tampon (µl)	Amorces 10mM (µl)	Pr.PCR Purifié (µl)	Eau stérile (µl)	Volume finale (µl)
Tube F (contenant les amorces F)	1	3	1	4	1	10

Tableau 4: Programme de la réaction de séquence

Stade	Température	Temps	Cycles
1	96°C	10 secs	25
2	50	5 secs	
3	60	3 min	

A la fin de la réaction, les tubes sont récupérés, et on passe à la purification du produit de la réaction de séquence.

6-4- Purification du produit de la réaction de séquence

6-4-1- Principe

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence. Cette purification consiste à éliminer l'excès des réactifs pour ne pas gêner le séquençage.

6-4-2- Réactifs nécessaires

- ✚ Kit "BigDye® Xterminator™ purification Kit" contenant:
 - SAM™Solution (tampon) ;

- BigDye®Xterminator™Solution (résines).

6-4-3- Protocole expérimental

45µl du produit SAM™Solution et 10 µl du produit BigDye®XTerminator™Solution préalablement vortexés pour suspendre les résines et 10 µl du produit de la réaction de séquençage sont déposés dans les puits de la plaque. La plaque est mise ensuite sous agitation légère pendant 30 min, puis une centrifugation à 1000 tr/min pendant 2 minutes est réalisée. Le surnageant contenant les fragments à séquencer est transféré dans les puits de la plaque du séquenceur.

7. CHARGEMENT DE L'ANALYSEUR GENETIQUE

La plaque est placée dans le séquenceur, qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



Figure 7: Analyseur Génétique 3500Dx.

On obtient après l'analyse des séquences un enregistrement qui montre qu'il n'y a qu'une seule réaction de séquençage en présence des 4 ddNTP.

ADN matrice + dNTP + ddCTP fluorescent bleu + ddATP fluorescent vert + ddGTP fluorescent **noir** + ddTTP fluorescent rouge. (Annexe 2).

8. OUTILS DE BIOINFORMATIQUE

8.1. Logiciel BLAST (nucléotide BLAST)

Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin+) et son complémentaire inversé (brin-) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

8.2. Logiciel NCBI (CCDS data base)

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 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

8.3. ClinVar : (NCBI)

Option de NCBI, agrège des informations sur la variation génomique et sa relation avec la santé humaine (pathogénique, non pathogénique) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>

Résultats et discussion

I. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE

1. REPARTITION DES PATIENTS SELON L'AGE

Tableau 5: Répartition des patients selon l'âge.

Patients	Age
P1	2 ans
P2	9 ans
P3	10 ans
P4	20 ans
P5	11 mois

D'après le tableau, on peut définir l'âge moyen des patients et qui est de : 8 ans et demi

2. REPARTITION DES PATIENTS SELON LE SEXE

Tableau 6: Répartition des patients selon le sexe.

Sexe	Nombre de Patients
Femme	2
Homme	3

Parmi les 5 cas explorés, figurent 3 hommes et 2 femmes, avec un sexe ration H/F de 1,5

II. ETUDE MOLECULAIRE

1-RESULTATS DU DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

Tableau 7 : Concentration d'ADN de patients

Patient	Concentration d'ADN (ng/ml)
1	141
2	129,5
3	124,5
4	178,5
5	170,5

Après extraction d'ADN, une amplification par PCR du gène PTPN11 est réalisée.

2 EXEMPLE DE RESULTATS D'AMPLIFICATION



Figure 8: Electrophorèse des produits d'amplification des différents exons sur gel d'agarose

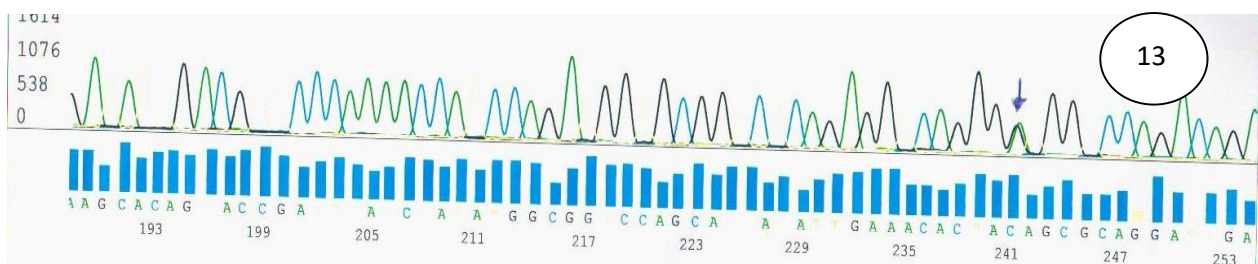
Les produits amplifiés ont été l'objet d'un séquençage. Les résultats obtenus sont détaillés ci-dessous (description des patients + profil clinique + mutation)

3. RESULTATS DU SEQUENÇAGE DES PRODUITS PCR DU GENE

a. Patient 1

De petite taille, poids à 7Kg qui présente une dysmorphie faciale faite d'un hypertélorisme, avec des oreilles décalées, un épicanthus, un rétrognathisme. Des anomalies cardiovasculaires associées à type de sténose pulmonaire modérée. Le patient présente aussi une déformation de la cage thoracique, une déficience intellectuelle légère, une cryptorchidie ainsi qu'une microcéphalie.

Chez ce patient on a réalisé une PCR- séquençage du gène PTPN11 :



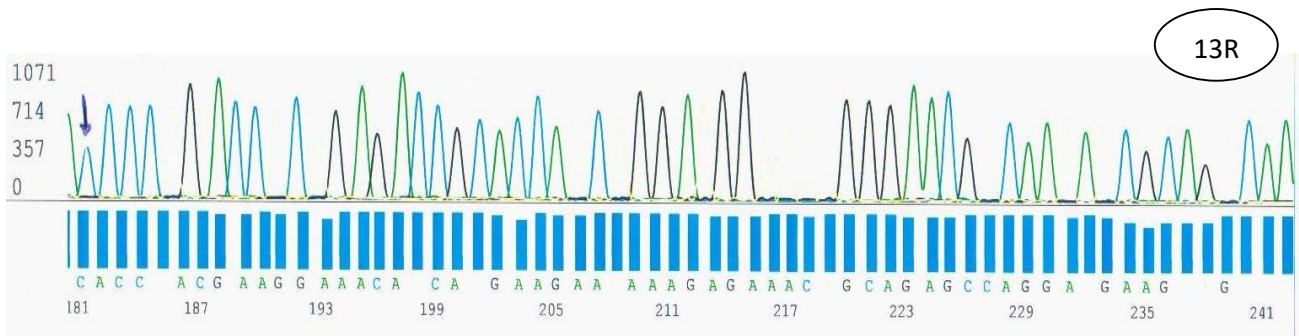


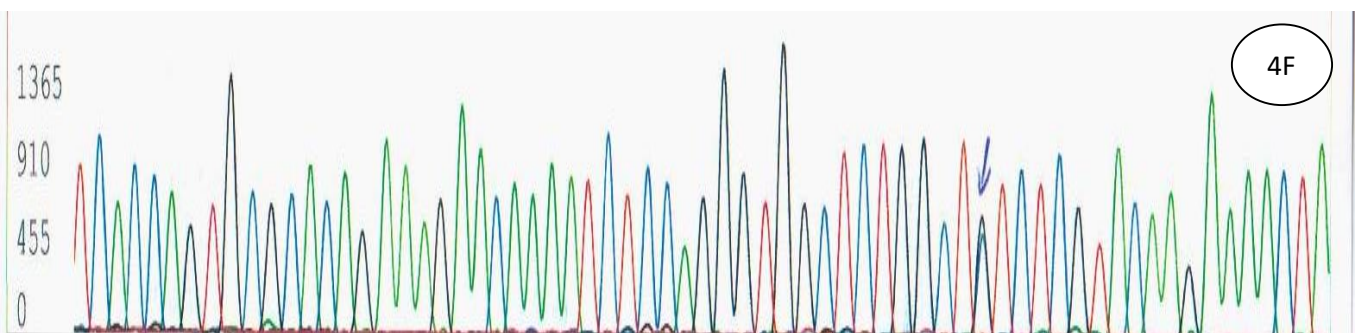
Figure 9 : Electrophérogramme de l'exon 13 du gène *PTN11* Mutation c.1510A>G à l'état hétérozygote.

Une mutation c.1510A>G a été retrouvée. Elle est localisée sur l'exon 13 du domaine PTP. Elle a comme conséquence une mutation faux sens p.Met505Val.

b. Patient 2

De petite taille (115cm), poids à 20kg qui présente une dysmorphie faciale faite d'un faciès triangulaire, micrognathisme, hypertélorisme, des oreilles bas implantées en rotation postérieure avec un hélix épais, un épicanthus, un pterygium coli. Des anomalies cardiovasculaires associées à type de sténose congénitale de l'artère pulmonaire. Le patient présente aussi un cou palmé court, une déformation de la cage thoracique, une déficience intellectuelle légère et un retard staturo ponderal. Des anomalies squelettiques à type de cubitus valgus, brachydactylie et cyphoscoliose. Des anomalies hématologiques telles qu'une tendance aux saignements.

Chez ce patient on a réalisé une PCR- séquençage du gène PTPN11. Une mutation c.417G>C est retrouvée. Elle est localisée sur l'exon 4 du domaine C-SH2. La conséquence est une mutation faux sens p.Glu139Asp.



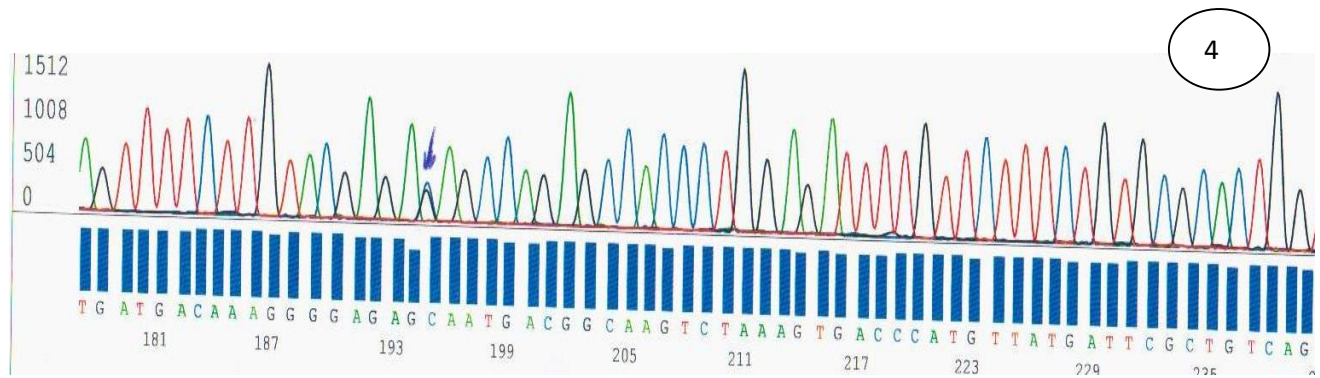


Figure 10 : Electrophérogamme de l'exon 4 du gène *PTN11* Mutation c.417G>C à l'état hétérozygote

c. Patient 3

De petite taille (127 cm -2.5 DS), poids à 27Kg qui présente une dysmorphie faciale faite d'un facies triangulaire, hypertélorisme. Le patient présente aussi un cou palmé court, une déformation de la cage thoracique type thorax en entonnoir, une déficience intellectuelle légère, une cryptorchidie. Des anomalies squelettiques à type de cubitus valgus. Sans anomalies cardiovasculaires décelés.

Chez ce patient on a réalisé une PCR- séquençage du gène *PTPN11* : Une mutation c.328G>A a été retrouvée. Mutation localisé sur l'exon 3 du domaine N-SH2. Elle la comme conséquence une mutation faux sens p.Glu110Lys.

d. Patient 4

De taille normale, poids à 55Kg qui présente une dysmorphie faciale faite d'un facies triangulaire, micrognathisme, des oreilles en rotation postérieure avec un hélix épais, des anomalies de dentition.

Chez ce patient on a réalisé une PCR- séquençage du gène *PTPN11*. Une mutation intronique c.854-21 T>G est retrouvé chez lui et décrite comme bénigne.

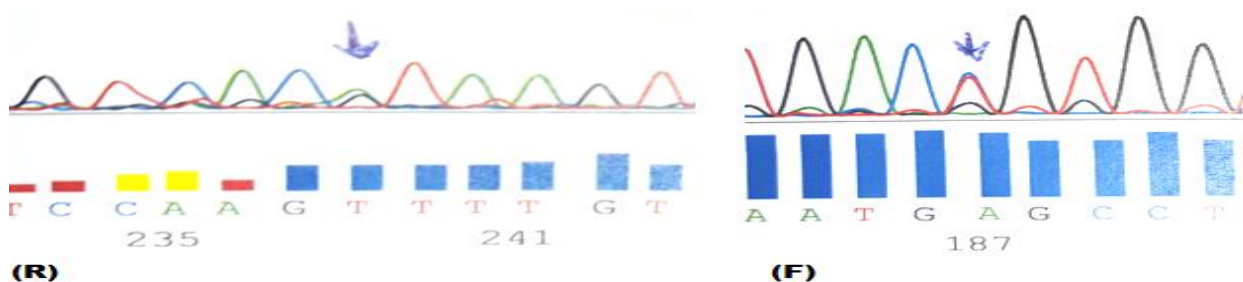


Figure 11 : Electrophèrogramme du gène *PTN11* Mutation c.854-21T>G à l'état hétérozygote

e. Patient 5

Présentant une dysmorphie faciale faite d'un facies triangulaire, des cheveux bas implantés. Des anomalies cardiovasculaires associées à type desténose congénitale de l'artère pulmonaire.

Chez ce patient on a réalisé une PCR- séquençage du gène *PTN11*. Absence de mutations recherchées dans les exons 3 et 8



Figure 12 : Electrophèrogramme du gène *PTN11* (Profil normal).

Tableau 8: Profil clinique et mutationnel des patients atteints par le syndrome de Noonan

Patient	1	2	3	4	5
Substitution nucléotide	c.1510A>G	c.417G>C	c.328G>A	c.854-21 T>G	En cours
Substitution acide amine	p.Met505val	p.Glu139Asp	p.Glu110Lys	-	ND
Exon/domaine	13/PTP	4/C-SH2	3/N-SH2	-	NM(3,8)
Age	2 ans	9 ans	10 ans	20 ans	11 mois
Sexe	M	F	F	M	M
Taille	Petite taille	Petite taille	127 cm -2.5 DS	Normal	Normal
Poids (kg)	7	20	27	55	ND
Cardiopathie	+	+	+	-	+
Dysmorphie faciale	+	+	+	+	+
Trouble de langage	ND	+	ND	-	ND
Anomalie thoracique	+	+	+	-	-
Anomalie squelettique	-	brachydactylie et cyphoscoliose	Cubitus valgus	-	-
Anomalie hématologique	ND	tendance aux saignements	-	-	-
Anomalie génitale	Cryptorchidie	ND	Cryptorchidie	-	-

Dans cette étude, cinq individus sont identifiés comme étant affectés par le syndrome de Noonan. Parmi eux, quatre sujets sont sélectionnés pour les mutations PTPN11, alors que le résultat de l'individu restant est en cours.

Sur les 5 patients étudiés, trois mutations décrites (p.Met505Val, p.Glu139Asp, p.Glu110Lys) sont confirmés chez trois patients, dont une dans l'exon 13, la deuxième dans

l'exon 4 et la troisième dans l'exon 3. Ces trois patients partagent les traits faciaux caractéristiques du syndrome de Noonan.

Un polymorphisme (c.854-21 T>G) est observé chez le quatrième patient mais il est jugé bénin.

Pour le cinquième patient l'étude moléculaire des exons 3 et 8 n'a pas montrée de mutations et l'étude des autres exons est en cours.

4. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS

Une étude de taux de mutation du gène PTPN11 chez plusieurs populations a été mise en œuvre, ainsi comparé avec nos résultats (tableau 7).

Tableau 9 : Taux de mutation du gène PTPN11 dans différentes études de patients atteints du syndrome de Noonan.

Références d'étude	Populations	Nombres de cas mutés
Tartaglia et al. 2001	Américaine	9/22 (40,9%)
Sarkozy et al. 2003	Italienne	17/71 (23%)
Zenker et al. 2004	Allemande	26/57 (45%)
Yoshida et al. 2004	Japonaise	15/45 (33%)
Bertola et al. 2006	Brésilienne	13/50 (26%)
Ko et al. 2008	Coréenne	9/59 (15%)
Hung et al. 2007	Taïwanaise	8/34 (23,5%)
El Bouchikhi . 2015	Marocaine	4/16 (25%)
Notre étude	Marocaine	4/5 (80%)

Dans notre série de 5 patients, quatre mutations décrites (80%), ce qui est largement supérieur aux autres études trouvées dans la littérature. Ce résultat peut être dû au nombre limité de nos patients dans cette série, qui ne représente pas un échantillon significatif d'une population donnée.

Conclusion générale

Le syndrome de Noonan est un syndrome d'origine génétique qui se manifeste par un aspect particulier des traits du visage, des malformations du cœur et une petite taille. Il existe parfois un déficit intellectuel et un retard d'acquisition du langage.

Le syndrome de Noonan est dû à une altération d'un gène (mutation). Dans plus de 50% des cas familiaux, il est dû à une mutation du gène appelé *PTPN11* (pour « Proteine-Tyrosine Phosphatase Non recepneur-Type 11 »), localisé sur le chromosome 12 (12q24.1).

Ce gène permet la fabrication d'une protéine, la tyrosine phosphatase SHP-2, qui est présente en grande quantité dans l'organisme. Elle joue un rôle dans la régulation des informations échangées entre les cellules et intervient dans de nombreuses fonctions de l'organisme.

Sur les 5 patients étudiés, quatre mutations décrites ont été confirmés chez quatre patients. Chez trois patients la mutation a été juger causale du syndrome de Noonan par contre chez le quatrième patient un polymorphisme (c.854-21 T>G) a été observé mais il est jugé bénin. Pour le cinquième patient l'étude moléculaire des exons 3 et 8 n'a pas montrée de mutations, et l'étude des autres exons est en cours.

L'étude présente a permis de confirmer le diagnostic du Syndrome de NOONAN chez nos patients concernés, et de leur accorder une prise en charge multidisciplinaire adaptée et un conseil génétique adéquat. Cette étude nous a permis également d'avoir une idée sur le profil génétique de la population marocaine atteinte du syndrome de NOONAN.

Il n'y a pas de traitement spécifique mais ce dernier est dit symptomatique, il dépend des anomalies et de l'organe impliqué et il n'est pas spécifique du syndrome de Noonan.

Des examens cardiologiques comprenant une échocardiographie et un électrocardiogramme(ECG) sont indispensables dès la naissance afin de dépister précocement toute anomalie du cœur.

Références bibliographiques

- Allanson JE**, Hall JG, Hughes HE, Preus M, Witt RD: Noonan syndrome: the changing phenotype. *Am J Med Genet.* 1985 Jul;21(3):507-14.
- Allanson JE**: Noonan syndrome. *J Med Genet.* 1987 Jan;24(1):9-13.
- Binder G**, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt NE: PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Sep;90(9):5377-81.
- Chen B**, Bronson RT, Klaman LD, Hampton TG, Wang JF, Green PJ, et al.: Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet.* 2000 Mar;24(3):296-9.
- Chen Y**, Wen R, Yang S, Schuman J, Zhang EE, Yi T, Feng GS: Identification of *Shp-2* as a *Stat5A* phosphatase. *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):16520-7.
- Hof P**, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE: Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell.* 1998 Feb 20;92(4):441-50.
- Jamieson CR**, van der Burgt I, Brady AF, van Reen M, Elswawi MM, Hol F et al.: Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat Genet.* 1994 Dec;8(4):357-60.
- Jongmans M**, Sistermans EA, Rikken A, Nillesen WM, Tamminga R, Patton M et al.: Genotypic and phenotypic characterization of Noonan syndrome: new data and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2005 Apr 15;134(2):165-70.
- Koblinsky O**: Ueber eine flughautähnliche Ausbreitung am Halse. *Archiv für Anthropologie, Braunschweig* 1883 14: 343.
- Kosaki K**, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N et al.: PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):3529-33.
- Lee NB**, Kelly L, Sharland M: Ocular manifestations of Noonan syndrome. *Eye.* 1992;6 (Pt 3):328-34.
- Leichtman LG**: Are cardio-facio-cutaneous syndrome and Noonan syndrome distinct? A case of CFC offspring of a mother with Noonan syndrome. *Clin Dysmorphol.* 1996 Jan;5(1):61-4.
- Neel BG**, Gu H, Pao L: The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci.* 2003 Jun;28(6):284-93.
- Noonan JA**: Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. *Am J Dis Child.* 1968 Oct;116(4):373-80.
- Nora JJ**, Nora AH, Sinha AK, Spangler RD, Lubs HA: The Ullrich-Noonan syndrome (Turner phenotype). *Am J Dis Child.* 1974 Jan;127(1):48-55.
- Opitz JM**, Summitt RL, Sarto GE (1965): Noonan's syndrome in girls: A genocopy of the UllrichTurner syndrome. *J Pediatr* 67:968.
- Opitz, Mendez Hm**, JM: Noonan syndrome: a review. *Am J Med Genet.* 1985 Jul;21(3):493-506.
- Sarkozy A**, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C et al. : Correlation between

- PTPN11 gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet.* 2003 Sep;40(9):704-8.
- Saxton TM**, Pawson T: Morphogenetic movements at gastrulation require the SH2 tyrosine phosphatase Shp2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3790-5.
- Sharland M**, Patton MA, Talbot S, Chitolie A, Bevan DH: Coagulation-factor deficiencies and abnormal bleeding in Noonan's syndrome. *Lancet.* 1992 Jan 4;339(8784):19-21.
- Schubbert S**, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G et al.: Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2006 Mar;38(3):331-6.
- 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 Dec;29(4):465-8.
- Tartaglia M**, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I et al.: PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2002 Jun;70(6):1555-63.
- Tartaglia M**, Cordeddu V, Chang H, Shaw A, Kalidas K, Crosby A et al.: Paternal germline origin and sex-ratio distortion in transmission of PTPN11 mutations in Noonan syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004 Sep;75(3):492-7.
- Tartaglia M**, Gelb BD: Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:45-68.
- Turner H**: A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology* 1938 25:566–74.
- Uhlen P**, Burch PM, Zito CI, Estrada M, Ehrlich BE, Bennett AM: Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/Ptpn11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2160-5.
- Ullrich O**: Uber typische kombinationbilder multiper abanturgen. *Z. Kinderheilkd.* 1930 49:271–76.
- Yoshida R**, Hasegawa T, Hasegawa Y, Nagai T, Kinoshita E, Tanaka Y, Kanegane H et al.: Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor type 11 mutation analysis and clinical assessment in 45 patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3359-64.
- Zenker M**, Buheitel G, Rauch R, Koenig R, Bosse K, Kress W et al.: Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr.* 2004 Mar;144(3):368-74.

Annexes

Annexe 1 : Programme PCR des exons (2, 3, 4, 7, 8, 12 et 13)

PCR Simplex					
<u>Gène</u> : PTPN11		<u>Locus</u> : 12q24.13		<u>Nombre d'exons</u> : 2	
<u>Taille de l'amplification</u> : 309		<u>Amorce forward</u> : ACTCTGCTCATAATGCGTCTTAGCTG		<u>Amorce Reverse</u> : GAAATGCAGGCAGCAAGCTATCC	
<i>Conditions expérimentales</i>		<i>Programme PCR</i>			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	0,5	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	66°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,8	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

PCR Simplex					
<u>Gène</u> : PTPN11		<u>Locus</u> : 12q24.13		<u>Nombre d'exons</u> : 3	
<u>Taille de l'amplification</u> : 290		<u>Amorce forward</u> : CTTGCCCTCCCTTTCCAATGGAC		<u>Amorce Reverse</u> : GCATTTCTGACACTCAGGGCAC	
<i>Conditions expérimentales</i>		<i>Programme PCR</i>			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	1	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	63°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,3	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

PCR Simplex

<u>Gène</u> : PTPN11		<u>Locus</u> : 12q24.13		<u>Nombre d'exons</u> : 4	
<u>Taille de l'amplification</u> : 304		<u>Amorce forward</u> : GAAAGAACAACATGAACCCATAGTAGAGC		<u>Amorce Reverse</u> : CACCCAAAGGTAACATCTTGCCAG	
Conditions expérimentales		Programme PCR			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	0,5	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	62°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,8	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

PCR Simplex

<u>Gène</u> : PTPN11		<u>Locus</u> : 12q24.13		<u>Nombre d'exons</u> : 7	
<u>Taille de l'amplification</u> : 263		<u>Amorce forward</u> : CCTTAAAGAAGTAATGCTGATCCAGGC		<u>Amorce Reverse</u> : CCCTGAGGAAAGGTACAGAGG	
Conditions expérimentales		Programme PCR			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	0,5	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	61°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,8	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

PCR Simplex

<u>Gène :</u> PTPN11		<u>Locus :</u> 12q24.13	<u>Nombre d'exons :</u> 8		
<u>Taille de l'amplification :</u> 294		<u>Amorce forward :</u> GACTAGGCTGGGGAGTAACTG	<u>Amorce Reverse :</u> GCTAGAAATTTAGGAAGAAAATCCTTCAAACACC		
Conditions expérimentales		Programme PCR			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	1	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	58°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,3	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

PCR Simplex

<u>Gène :</u> PTPN11		<u>Locus :</u> 12q24.13	<u>Nombre d'exons :</u> 12		
<u>Taille de l'amplification :</u> 323		<u>Amorce forward :</u> GCTGACTCCAAAGCCCTATGC	<u>Amorce Reverse :</u> CCCAGACTGTTTTCGTGAGCAC		
Conditions expérimentales		Programme PCR			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	1	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	59°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,3	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

PCR Simplex

<u>Gène :</u> PTPN11		<u>Locus :</u> 12q24.13	<u>Nombre d'exons :</u> 13		
<u>Taille de l'amplification :</u> 303		<u>Amorce forward :</u> GTCTCTGAGTCCACTAAAAGTTGTGC	<u>Amorce Reverse :</u> AGCGTATCCAAGAGGCCTAGC		
Conditions expérimentales		Programme PCR			
Réactifs	Volume (µl)	Étapes	T (°C)	Temps	Cycles
Tampon	2,5	Dénaturation initial	94°C	8min	1
Mgcl2	0,5	Dénaturation	94°C	45s	35
DNTP	1	Hybridation	60°C	45s	
Amorce F	1				
Amorce R	1				
H2O	17,8	Elongation	72°C	45s	
Taq	0,2				
ADN	1	Elongation Final	72°C	10min	1

Annexe 2 : Enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique

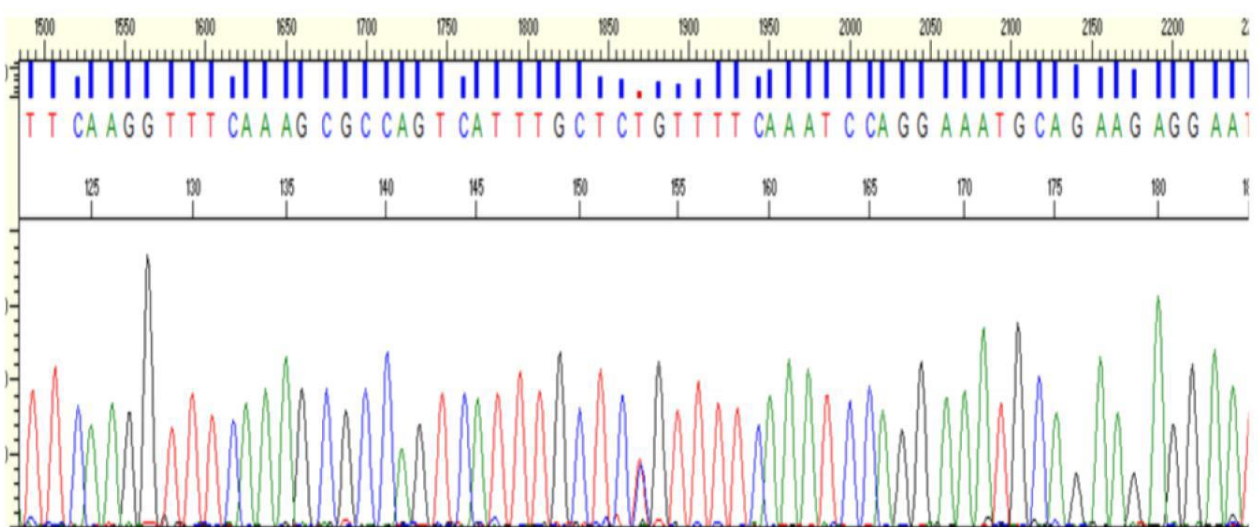


Image d'un résultat de séquençage. Pic en bleu : C, pic en rouge : T, pic en vert : A, pic en noir : G

Annexe 3 : Matériels utilisés pour nos techniques



**Thermocycleur Applied Biosystem
2700.**



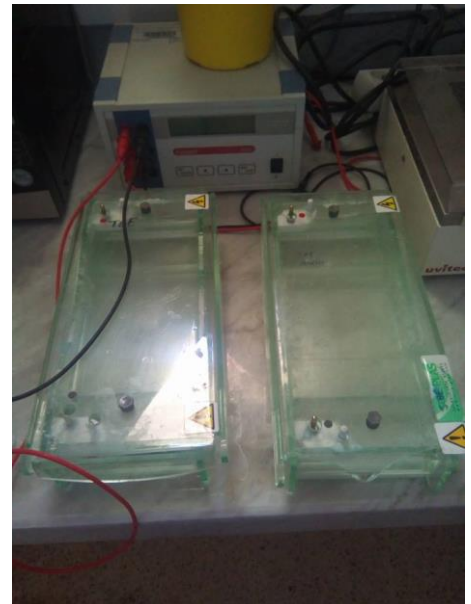
Vortex Genius 3



Lecteur aux UV



Centrifugeuse



Electrophoretic chamber

Annexe 5 : Fiche Noonan