



HAL
open science

Impact de la protéine SHP2 associé au syndrome de Noonan sur le métabolisme glucidique

Romain Paccoud

► **To cite this version:**

Romain Paccoud. Impact de la protéine SHP2 associé au syndrome de Noonan sur le métabolisme glucidique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30242 . tel-02381678v2

HAL Id: tel-02381678

<https://theses.hal.science/tel-02381678v2>

Submitted on 27 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

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

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Romain PACCOUD

Le 13 novembre 2018

**Impact de la protéine SHP2 associé au syndrome de Noonan
sur le métabolisme glucidique**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

Armelle YART

Jury

Wilfried LE GOFF, Rapporteur

Mme Corinne VIGOUROUX, Rapporteur

Hélène CAVé, Rapporteur

M. Pierre GOURDY, Examineur

Mme Armelle YART, Directeur de thèse

M. Jean-Philippe PRADÈRE, Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de consacrer de leur temps à la lecture de ce manuscrit et pour l'intérêt qu'ils ont pu porter à ce travail. Monsieur le Professeur **Pierre Gourdy**, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, Mesdames les Professeures **Hélène Cavé**, **Corinne Vigouroux** ainsi que Monsieur le Docteur **Wilfried Le Goff** pour avoir accepté la charge de travail qui incombe à la qualité de rapporteur, ainsi que pour les discussions scientifiques très enrichissantes que vous avez menées au cours de cette journée.

Je voudrais remercier tous les membres de l'Adipolab pour ces trois années passées en leur compagnie qui ont été très enrichissantes.

Dans un premier temps, je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, **Armelle**. J'ai énormément appris avec toi au cours de ces trois années, et je suis heureux d'avoir pu faire mes premiers pas dans la recherche à tes côtés. Ta gentillesse, ta patience, ta pédagogie et ta réflexion font de toi une formidable directrice de thèse, et a également fait de toi un soutien constant et indéfectible dans mon quotidien. Tu as toujours été à l'écoute et présente à chaque instant de cette thèse, notamment lors de la rédaction de ce manuscrit. Au-delà de cette thèse, tu as été un pilier majeur dans ma recherche de post-doc et des diverses péripéties qui y ont été associées. Tu n'as jamais douté de moi ou de mes idées, même s'il t'est arrivé par deux fois de m'offrir un trèfle à quatre feuilles.

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire, à commencer par **Jean-Philippe** pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Tu as toujours été présent lorsque j'avais besoin d'aide et tu trouvais toujours le bon conseil ou la bonne idée, que ce soit sur le plan scientifique, personnel ou sur la recherche de post-doc.

Un grand merci au chef de l'Adipolab, **Philippe**, pour votre disponibilité, votre gentillesse ainsi que votre sens de l'humour qui participe à la bonne humeur de toute l'équipe. Je tiens à vous remercier tout spécialement pour m'avoir cédé votre moto durant ma première année de thèse, et avoir eu le plaisir de me vanter de rouler avec la moto du chef. Merci également à tous les autres membres de l'équipe : **Cédric**, **Bernard**, **Isa**, **Sophie** pour votre disponibilité, votre humour et vos idées.

Je remercie également les djeun's de l'Adipolab : **Alizée**, **Ophélie**, vous m'avez tellement aidé pour les manips et vous vous êtes toujours rendues disponibles, même quand je vous prévenais au dernier moment ; **Nancy**, **Johanna**, **Veronika**, **Sophie**, **Vanessa**, pour tous les bons moments passés dans le laboratoire et en dehors ; **Enzo**, pour toutes tes histoires rocambolesques qui mettent de très bonne humeur.

Je souhaite remercier mes co-bureaux, **Jean** et **Gwendo** pour tous ces bons moments passés ensemble, nos fous rires, en particulier lors des RLDP, ainsi que toutes les discussions très « philosophiques » que nous avons pu avoir... Je suis vraiment heureux de vous avoir connus, et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie aussi **Thomas Edouard** grâce à qui nous avons pu avoir des données sur les patients, ainsi que pour son implication et sa gentillesse.

Je remercie également mes amis **Milli**, **Pasto**, vous avez toujours été présent (même le jour J !!!) et surtout bien avant ! Je voudrais dire un énorme merci à **mes parents** qui m'ont soutenu depuis toujours, et grâce à qui j'en suis là aujourd'hui.

Enfin, j'en arrive maintenant à **Cécilia**, qui me soutient (et supporte ?) depuis un petit moment déjà et qui a énormément participé à ce manuscrit (vive zotero hein^^). Merci à toi d'avoir toujours été là dans les moments difficiles, et de m'avoir supporté quand je te parlais de Noonan et SHP2.

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie qui affecte de plus en plus de personnes à travers le monde et comporte plusieurs complications. Les moyens thérapeutiques actuels sont assez limités, car même s'ils sont efficaces, ils sont associés à d'importants effets secondaires. Ainsi, il est important de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer la sensibilité à l'insuline en situation d'obésité ou de diabète. Nous nous intéressons ici à une nouvelle cible potentielle, appelée SHP2, qui est une protéine tyrosine phosphatase impliquée dans la transduction du signal en régulant plusieurs voies canoniques (MAPK, PI3K). Cette protéine est connue pour ses rôles cruciaux dans le développement ainsi que son implication dans le métabolisme glucidique. Cependant, cette dernière fonction est encore assez peu comprise, car l'effet d'une délétion de SHP2 sur la sensibilité à l'insuline est différent suivant les tissus et son rôle global n'est pas connu. Nous utilisons ici un modèle original pour étudier l'impact de SHP2 sur le métabolisme glucidique au niveau du corps entier, en travaillant sur le syndrome de Noonan (SN). En effet, cette maladie génétique est principalement causée par une mutation hyperactivatrice du gène *PTPN11* codant la protéine SHP2. L'étude du métabolisme glucidique dans le contexte du SN a permis de mettre en évidence une intolérance au glucose, qui est dissociée de l'adiposité réduite, à la fois chez les patients et dans le modèle murin de la maladie (SHP2^{D61G/+}). Nous montrons que les souris SN présentent une inflammation caractérisée par une surexpression de marqueurs pro-inflammatoires, ainsi qu'une augmentation de macrophages pro-inflammatoires dans les tissus métaboliques. Grâce à des expériences de transplantation de moelle osseuse et de traitement au clodronate, nous mettons en évidence que cette inflammation est d'origine macrophagique et est la cause de la résistance à l'insuline présente dans le SN. De plus, nous démontrons que l'hyperactivation de SHP2 induit une hyperactivation des macrophages. De façon intéressante, un traitement avec un inhibiteur de SHP2 améliore fortement le métabolisme glucidique de souris sauvages obèses et diabétiques. Ainsi, ce travail de thèse a permis d'identifier un phénotype original chez les patients et les souris SN associant une insulino-résistance dissociée de l'adiposité, ainsi qu'un rôle clé des macrophages dans ce phénotype. De plus, au-delà de la maladie rare, nous montrons que dans un contexte d'obésité et de DT2, l'inhibition de SHP2 améliore grandement le phénotype métabolique des souris suggérant que SHP2 pourrait être une cible efficace dans le traitement de l'insulino-résistance.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is a disease that affects more and more people worldwide and has many severe, lifethreatening complications. The current therapies are rather limited, because even if they are effective, they are associated with significant side effects. Thus, it is important to find new therapeutic targets to improve insulin sensitivity in obesity or diabetes. We are interested here in a new potential target called SHP2, a protein tyrosine phosphatase involved in signal transduction by regulating several canonical pathways (MAPK, PI3K). This protein is known for its crucial roles in development as well as its involvement in glucidic metabolism. However, this latter function is still poorly understood because the effect of a deletion of SHP2 on insulin sensitivity is different between tissues and its overall role is not known. Here, to study the impact of SHP2 on whole body glucidic metabolism we used Noonan Syndrome (NS) as an original model system. Indeed, this genetic disease is mainly caused by a hyperactivating mutation of the gene *PTPN11* encoding the protein SHP2. The study of glucidic metabolism in the context of SN has revealed glucose intolerance, which is dissociated from reduced adiposity, both in patients and in the murine model of the disease (SHP2^{D61G/+}). We show that NS mice exhibit inflammation characterized by overexpression of pro-inflammatory markers, as well as an increase of pro-inflammatory macrophages in metabolic tissues. Thanks to bone marrow transplantation and clodronate treatment, we show this inflammation comes from macrophage and is the cause of the insulin resistance in SN. In addition, we demonstrate that hyperactivation of SHP2 induces hyperactivation of macrophages. Interestingly, treatment with an inhibitor of SHP2 strongly improves the glucidic metabolism of obese and diabetic WT mice. Thus, this thesis work has identified an original metabolic phenotype in patients and NS mice, in particular an inflammation-driven insulin resistance uncoupled from adiposity, and a key role of macrophages in this phenotype. Moreover, beyond the rare diseases, we show that in an obesity and T2D context, the inhibition of SHP2 greatly improves the metabolic phenotype of mice suggesting that SHP2 could be an efficient target in the treatment of insulin resistance.

Table des matières

Table des tableaux.....	10
Table des figures.....	10
Introduction générale	9
Partie 1 : De l'homéostasie glucidique à l'insulino-résistance	17
I. Homéostasie du glucose et désordres associés à sa dérégulation	18
1. Flux glucidiques	18
a. Transport du glucose	18
b. Utilisation directe du glucose	19
c. Stockage du glucose	21
d. Production du glucose.....	22
2. Hormones impliquées dans ces flux.....	24
a. L'insuline : une hormone hypoglycémiante	24
b. Le glucagon : une hormone hyperglycémiante	31
3. Désordres du métabolisme glucidique.....	32
a. Syndrome métabolique	32
b. Diabète de type 2	33
II. Résistance à l'insuline	36
1. Diagnostic de l'insulino-résistance	36
a. Méthodes simples	36
b. Tests métaboliques	37
c. Indice de résistance à l'insuline.....	38
d. Adaptation de ces tests chez l'animal	38
2. Causes.....	39
a. Acteurs directs.....	39
b. Facteurs environnementaux et systémiques	42
3. Conséquences de l'insulino-résistance	48
a. Métabolisme glucidique	48
b. Métabolisme lipidique.....	48
4. Aspects thérapeutiques.....	49
a. Cibles pharmacologiques.....	50
b. Cibles futures.....	51
Partie 2 : SHP2, une tyrosine phosphatase aux multiples facettes.....	53
I. Structure et activité.....	53

1.	Généralités	53
2.	Structure et activité catalytique	54
3.	Régulation de l'activité	55
II.	Rôle dans la signalisation cellulaire	56
1.	Rôle de SHP2 dans la voie MAPK.....	57
2.	Rôle de SHP2 dans la voie PI3K	59
3.	Rôle de SHP2 dans la voie JAK/STAT	60
4.	Fonctions sans signalisation	61
III.	Implication de SHP2 dans le développement.....	61
1.	Invalidation totale	61
2.	Implication dans l'auto-renouveau.....	62
3.	Implication dans les différents tissus	63
IV.	Implication de SHP2 dans l'inflammation	66
1.	Différenciation des cellules hématopoïétiques.....	66
2.	Impact sur la lignée lymphoïde	67
3.	Impact sur la lignée myéloïde	68
4.	SHP2 et inflammation.....	69
V.	Implication de SHP2 dans le métabolisme	69
1.	Dans le cerveau	69
2.	Dans le pancréas.....	70
3.	Dans le foie	70
4.	Dans le muscle squelettique	71
5.	Dans le tissu adipeux	72
	Partie 3 : Mutations de SHP2 et physiopathologie	74
I.	SHP2 et tumorigénèse	74
II.	SHP2 et maladies génétiques	76
1.	La Métachondromatose	76
2.	Le Syndrome de Noonan	78
a.	Description clinique du Syndrome de Noonan.....	78
b.	Génétique du SN.....	80
c.	Conséquences des mutations SN de SHP2 sur sa structure et son activité	80
d.	Conséquences fonctionnelles des mutations SN de SHP2 sur la signalisation et le développement	82
3.	Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples	85
a.	Description clinique du Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples	85
b.	Génétique du SN-LM	87

c.	Conséquences des mutations SN-LM de SHP2 sur sa structure et son activité	87
d.	Conséquences fonctionnelles des mutations SN-LM sur la signalisation et le développement 89	
III.	SHP2 et maladies auto-immunes.....	92
IV.	SHP2 et métabolisme.....	88
	Résultats expérimentaux.....	91
	Discussion et perspectives.....	134
	Annexes.....	154
	Bibliographie.....	197

Table des tableaux

Tableau 1 : Description de quelques isoformes des GLUTs.....	19
Tableau 2 : Liste des différents KO tissus spécifiques de SHP2.....	64
Tableau 3 : Liste des cas cliniques de patients atteints à la fois de SN et de maladies auto-immunes.....	89
Tableau 4 : Top 10 des gènes surexprimés dans la population globale de cellules hépatiques CD45+, F4/80+ de souris SN vs WT et dans le cluster 6	140

Table des figures

Figure 1 : Voie métabolique de la glycolyse	20
Figure 2 : Voie métabolique de la glycogénogénèse et de la lipogénèse de novo	21
Figure 3 : Voie métabolique de la glycogénolyse.	22
Figure 4 : Voie métabolique de la néoglucogénèse.....	23
Figure 5 : Schéma récapitulatif du métabolisme glucidique.....	24
Figure 6 : Schéma de biosynthèse de l'insuline	25
Figure 7 : Glucose-sensing au niveau de la cellule beta du pancréas	26
Figure 8 : Action de l'insuline via la voie PI3K et RAS/MAPK sur le métabolisme du glucose.....	29
Figure 9 : Action du glucagon sur le métabolisme glucidique (adapté de Jiang et Zhang, 2003)	32
Figure 10 : Altération du métabolisme glucidique durant le diabète de type 2	33
Figure 11 : Pathogénèse du DT2 : « l'ominous octet »	35
Figure 12 : Schéma simplifié de la voie canonique NF-κB en réponse à l'inflammation	44
Figure 13 : Régulation de la sensibilité à l'insuline par les macrophages du tissu adipeux.....	46
Figure 14 : Conséquence de l'insulino-résistance sur le métabolisme glucidique et lipidique.....	49
Figure 15 : Structure de la protéine SHP2	54
Figure 16 : Représentation schématisée de l'activation de SHP2	56
Figure 17 : Rôle de SHP2 dans la voie RAS/MAPK	59
Figure 18 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse	67
Figure 19 : Schéma-bilan de l'impact des délétions de SHP2 dans les différents tissus métaboliques sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline	73
Figure 20 : Enchondromes présents dans la métachondromatose.....	77
Figure 21 : Anomalies faciales retrouvées dans le Syndrome de Noonan (SN).....	79
Figure 22 : Conséquences des mutations de Ptpn11 dans le SN sur la conformation de SHP2	82
Figure 23 : Phénotype de patients atteints du Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples (SN-LM)	85
Figure 24 : Conséquences des mutations de PTPN11 associée SN-LM sur la conformation de SHP2	88
Figure 25 : Association déséquilibre catalytique de SHP2 et maladies	92
Figure 26 : Impact de mutants hyperactifs de SHP2 sur l'activation de la voie insulinaire.	143
Figure 27 : Évolution de l'insulinémie au cours du temps avant et après un bolus de glucose.....	144
Figure 28: Mesure de l'insulinémie avant et après un bolus de glucose lors de la transplantation de la moelle osseuse	145
Figure 29 : Test de tolérance au glucose réalisé en IP	146
Figure 30 : Mesure de la dépense énergétique	150
Figure 31 : Expression génique de marqueurs pro-inflammatoires dans le foie, le muscle et le tissu adipeux blanc chez des souris WT et SN-LM.....	153
Figure 32 : Ostéoclastogénèse accrue dans le SN.....	155

Abréviations

A

ACC : Acetyl CoA Carboxylase

AMPK : AMP-activated protein kinase

B

BMDM : Bone Marrow Derived Macrophages

C

ChREBP : Carbohydrate Response Element Binding Protein

CK : cellules de Kupffer

CPN : Cellules Progénitrices Neurales

CSE : Cellules Souches Embryonnaires

D

DAG : Diacylglycerol

DPP4 : dipeptidyl peptidase 4

DT2 : Diabète de Type 2

E

EGF : Epidermal Growth Factor

F

FAS : Fatty Acid Synthase

FGF : Fibroblast Growth Factor

G

G6P : Glucose-6-Phosphate

GAS : muscle Gastrocnemus

GH : Growth Hormone

GLP-1 : Glucagon Like Peptide 1

GLUT : glucose transporter

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GOF : Gain Of Function

GRB2 : Growth factor Receptor Bound protein 2

GS : Glycogen Synthase

H

HDL : High Density Lipoprotein

HFD : High Fat Diet

HGPO : Hyperglycémie provoquée par voie orale

I

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1

IKK : I κ B kinase

iPSCs : cellules souches pluripotentes induites

J

JNK : c-Jun N-terminal kinase

L

LDL : Low Density Lipoprotein

LES : Lupus Érythémateux Systémique

LHS : Lipase Hormono Sensible

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LMMJ : Leucémies Myélo-Monocytaires Juvéniles

LOF : Loss Of Function

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MC : Métachondromatose

MC4R : Melanocortin Receptor 4

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

MHR : Macrophages Hépatiques Recrutés

MTA : Macrophages des Tissus Adipeux

mTORC2 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 2

N

NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non-Alcoholic SteatoHepatitis

O

OGTT : Oral Glucose Tolerance Test

P

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PEPCK : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

PG : tissu adipeux périgonadiques

PHG : Production Hépatique de Glucose

PI3K : Phosphoinositide-3 Kinases

PKC ζ : Protein kinase C zeta

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PTP : Prtoein Tyrosine Phosphatase

PTPN11 : Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor type 11

R

ROS : Reactive Oxygen Species

RTK : récepteur tyrosine kinase

S

SC : tissu adipeux sous-cutané

SGLT : Sodium Glucose co-transporter

SH2 : Src homology 2 domain

SHIP2 : SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 2

SHP2 : SH2 domain-containing Phosphatase 2

SN : Syndrome de Noonan

SN-LM : Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples

SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling

Sol : muscle Soleus

SOS : Son Of Sevenless

SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c

T

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TZD : Thiazolidinediones

W

WT : wild type

Introduction générale

Le métabolisme du glucose, qui permet d'apporter l'énergie suffisante au maintien des fonctions vitales de l'organisme, est d'une importance cruciale et est donc très finement régulé. En conséquence, toute dérégulation du métabolisme glucidique peut évoluer en pathologie, la plus connue étant le diabète de type 2 (DT2). Etroitement liée à la pandémie d'obésité, cette maladie affecte de plus en plus de personnes à travers le monde et comporte plusieurs complications en particulier vasculaires. Le DT2 se caractérise par une résistance à l'insuline ainsi que plusieurs autres affections systémiques entraînant une hyperglycémie. Il existe à l'heure actuelle plusieurs traitements et bien qu'ils soient efficaces pour traiter cette maladie, ils présentent néanmoins d'importants effets secondaires. Il devient donc très important de trouver de nouvelles cibles pour le traitement de cette pathologie.

Une des cibles pourrait être SHP2, une protéine tyrosine phosphatase qui intervient dans plusieurs voies de signalisation (MAPK, PI3K...) et joue de nombreux rôles dans le développement mais aussi dans le maintien de l'homéostasie. Une littérature abondante s'est en effet accumulée, tirant notamment parti de modèles animaux d'inactivation tissu-spécifique de son gène, montrant des rôles divers, et parfois contradictoires de SHP2 dans le métabolisme et la régulation de la sensibilité à l'insuline. Bien que des études de polymorphisme aient associé *PTPN11*, le gène codant SHP2, aux maladies métaboliques, l'impact de SHP2 sur la sensibilité à l'insuline à l'échelle de l'organisme entier reste mal compris, son inactivation systémique étant létale.

Afin de pallier ces limites nous avons développé une approche originale en utilisant comme modèle le Syndrome de Noonan (SN). En effet, cette maladie génétique est causée par des mutations sur *PTPN11* qui induisent une hyperactivation de SHP2, ce qui nous permet d'étudier l'effet global de l'hyperactivation de SHP2 sur la sensibilité à l'insuline.

Grâce à une cohorte de patients SN mutés sur *PTPN11* et d'un modèle murin de la maladie (souris *Ptpn11^{D61G/+}* ou souris SN) nous mettons en évidence une adiposité réduite et une intolérance au glucose à la fois chez les patients et dans le modèle murin. Le phénotypage métabolique des souris *Ptpn11^{D61G/+}* montre par plusieurs approches (tests métaboliques, signalisation insuline, clamp euglycémique hyperinsulinémique) que ces animaux sont

résistants à l'insuline. Nous mettons également en évidence que les souris SN présentent une inflammation caractérisée par la surexpression de marqueurs pro-inflammatoires, ainsi qu'une augmentation de macrophages pro-inflammatoires dans les tissus métaboliques. Avec des approches de transplantation de moelle osseuse et de traitement au clodronate pour éliminer les macrophages, nous démontrons que l'inflammation, et en particulier celle médiée par les macrophages, est la cause de l'intolérance au glucose chez les souris SN. D'un point de vue mécanistique, nous montrons que l'hyperactivation de SHP2 induit une hypersensibilité des macrophages *in vitro* et une polarisation M1. Une analyse RNAseq sur cellules isolées des macrophages du foie révèle une population spécifique dans la situation SN, exprimant un pattern d'expression génique particulier, signature d'un état inflammatoire des macrophages résidents et recrutés. Cet effet direct de l'hyperactivation de SHP2 sur le développement de l'insulino-résistance induite par l'inflammation de bas bruit nous a amené à évaluer son implication dans un contexte plus vaste de DT2. De façon intéressante, un traitement par un inhibiteur de SHP2 se traduit par une importante amélioration de l'intolérance au glucose ainsi que de la glycémie à jeun d'animaux obèses et diabétiques, un effet qui s'accompagne d'une réduction de leur profil inflammatoire.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un phénotype métabolique associé au SN à la fois chez les patients et les souris SN. De façon intéressante, nos données suggèrent une dissociation entre l'insulino-résistance induite par l'inflammation et l'adiposité, identifiant un lien direct entre l'hyperactivation de SHP2 et l'installation d'une inflammation des tissus métaboliques. De plus, ce travail de thèse a mis en évidence un impact majeur de l'hyperactivation de SHP2 dans l'activation des macrophages et pose la question de savoir si le SN ne serait pas associé, de façon plus large, à une dysfonction du macrophage. Au-delà de la maladie rare, ce travail a mis en évidence le potentiel thérapeutique de l'inhibition de SHP2 pour améliorer la sensibilité à l'insuline dans l'obésité ou le diabète de type 2.

INTRODUCTION

Introduction

Partie 1 : De l'homéostasie glucidique à l'insulino-résistance

Le maintien des fonctions vitales de tout organisme vivant repose sur l'utilisation, et donc sur la génération, de molécules à haut niveau énergétique, comme l'ATP. Ces molécules fournissent l'énergie indispensable au bon fonctionnement d'enzymes intervenant dans des processus aussi variés que les réactions chimiques du métabolisme, la biosynthèse de molécules, la locomotion, la division cellulaire, la motilité, le transport de molécules ou le transfert d'information. Cette production d'énergie nécessite l'utilisation de substrats énergétiques qui sont apportés par l'alimentation sous forme de glucides, de lipides et de protéines, que l'organisme utilise directement via la mitochondrie ou stocke pour les cataboliser pendant les périodes interprandiales, lors d'un exercice ou en cas de stress. L'utilisation et le stockage de substrats énergétiques font intervenir plusieurs voies biochimiques qui sont sous le contrôle de multiples niveaux de régulation (hormones, influx nerveux, etc.) afin de subvenir aux besoins énergétiques de l'organisme et ainsi maintenir son homéostasie et son fonctionnement. Il n'est donc pas surprenant que toute dérégulation de ces processus, et la perte d'homéostasie associée, ait des conséquences physiopathologiques importantes, allant de maladies métaboliques, à des défaillances d'organes ou encore au cancer.

Un exemple frappant de ces mécanismes de contrôle est donné par la régulation de la glycémie. En effet, le glucose est le substrat énergétique le plus utilisé dans des conditions physiologiques du fait de sa disponibilité immédiate et de sa nécessité pour certains organes, comme le cerveau, qui dépendent strictement du glucose. Ainsi, la glycémie doit être maintenue dans des limites strictes afin de ne pas nuire à l'intégrité de l'organisme et de toujours subvenir à ces besoins énergétiques. Tout un ensemble de mécanismes, regroupés sous le terme d'homéostasie glucidique, faisant intervenir différentes voies métaboliques, dans différents tissus, et contrôlées par un jeu complexe de multiples boucles de régulation, se coordonne pour maintenir cet équilibre. Cependant, dans certaines situations, cette régulation de la glycémie devient défaillante et aboutit à plusieurs défauts qui peuvent donner lieu à certaines pathologies comme le diabète de type 2 (DT2). Nous détaillerons dans ce

premier chapitre les mécanismes mis en jeu pour maintenir l'homéostasie glucidique, puis les conséquences physiopathologiques de leurs dérégulations.

I. Homéostasie du glucose et désordres associés à sa dérégulation

1. Flux glucidiques

L'homéostasie glucidique est la résultante de différentes voies biochimiques permettant de maintenir une glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L. L'augmentation de la glycémie, événement physiologique observé par exemple après un repas, est normalisée par l'action conjointe des voies de stockage du glucose dans le foie, les muscles et les tissus adipeux blancs (glycogénogénèse et lipogenèse *de novo*), et des voies utilisatrices de glucose (la glycolyse et la voie des pentoses phosphates), nécessitant au préalable le transport du glucose du compartiment sanguin vers les cellules. À l'inverse, la chute de la glycémie est compensée par les voies productrices de glucose (néoglucogénèse et glycogénolyse).

a. Transport du glucose

Le glucose étant une petite molécule hydrophile, il doit être transporté activement à travers la bicouche lipidique des membranes plasmiques. On distingue deux classes de transporteurs du glucose :

- Les SGLTs (sodium glucose co-transporter) sont des co-transporteurs de glucose et de sodium, permettant au glucose de rentrer dans les cellules selon un gradient de sodium. Ils sont uniquement localisés au niveau de la membrane apicale des entérocytes et au niveau de la membrane apicale du tubule proximal des néphrons.
- Les transporteurs GLUTs (glucose transporter), à la différence des SGLTs, se retrouvent dans tout l'organisme. Il existe plusieurs isoformes de GLUT qui diffèrent selon leur localisation tissulaire, leur affinité pour le glucose ou leur régulation, parmi lesquels on retrouve : GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 (Tableau 1).

Tableau 1 : Description de quelques isoformes des GLUTs

Isoforme	Distribution	Particularité
GLUT1	Ubiquitaire	« Uptake » de glucose basal
GLUT2	Foie, Rein, Cellules β pancréatiques	Transporteur bi-directionnel
GLUT3	Neurones	Forte affinité pour le glucose
GLUT4	Tissus adipeux, Muscles squelettiques, Cœur	Sensible à l'insuline

GLUT4, transporteur de haute affinité pour le glucose que l'on retrouve au niveau des muscles squelettiques et des tissus adipeux, a la particularité d'être sensible à l'insuline, en ce sens que sa localisation cellulaire est contrôlée par l'insuline. En effet, à l'état basal, seul 5% du pool de GLUT4 se situe à la membrane plasmique, le reste étant stocké dans des vésicules intra-cytoplasmiques (Leto and Saltiel, 2012). Suite au signal insulinaire, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, exposant ainsi le transporteur au contact du milieu extra-cellulaire et permettant une entrée massive de glucose dans la cellule. GLUT4 est un composant essentiel dans la régulation du métabolisme glucidique puisqu'il a été montré que sa délétion dans le muscle et les adipocytes entraîne une hyperglycémie à jeun, ainsi qu'une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (Kotani et al., 2004).

Dans le compartiment intracellulaire, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par une hexokinase (appelée glucokinase dans l'hépatocyte), afin de rejoindre les différentes voies d'utilisation et de stockage.

b. Utilisation directe du glucose

Il existe deux voies d'utilisation du glucose, à savoir la glycolyse et la voie des pentoses phosphate. La glycolyse est la voie d'oxydation du glucose et permet de produire directement de l'énergie via des molécules d'ATP ou indirectement par l'intermédiaire d'équivalents réduits (NADH, H^+) qui donneront de nouvelles molécules d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Sous l'action successive de différentes enzymes (phosphofructokinase, pyruvate kinase), cette voie cytosolique ubiquitaire aboutit, à partir d'une molécule de glucose, à deux molécules de pyruvate qui entrent dans le cycle de Krebs afin de produire deux molécules d'ATP, ainsi que du glycérol-3-phosphate, nécessaire pour la synthèse d'acides gras (Figure 1).

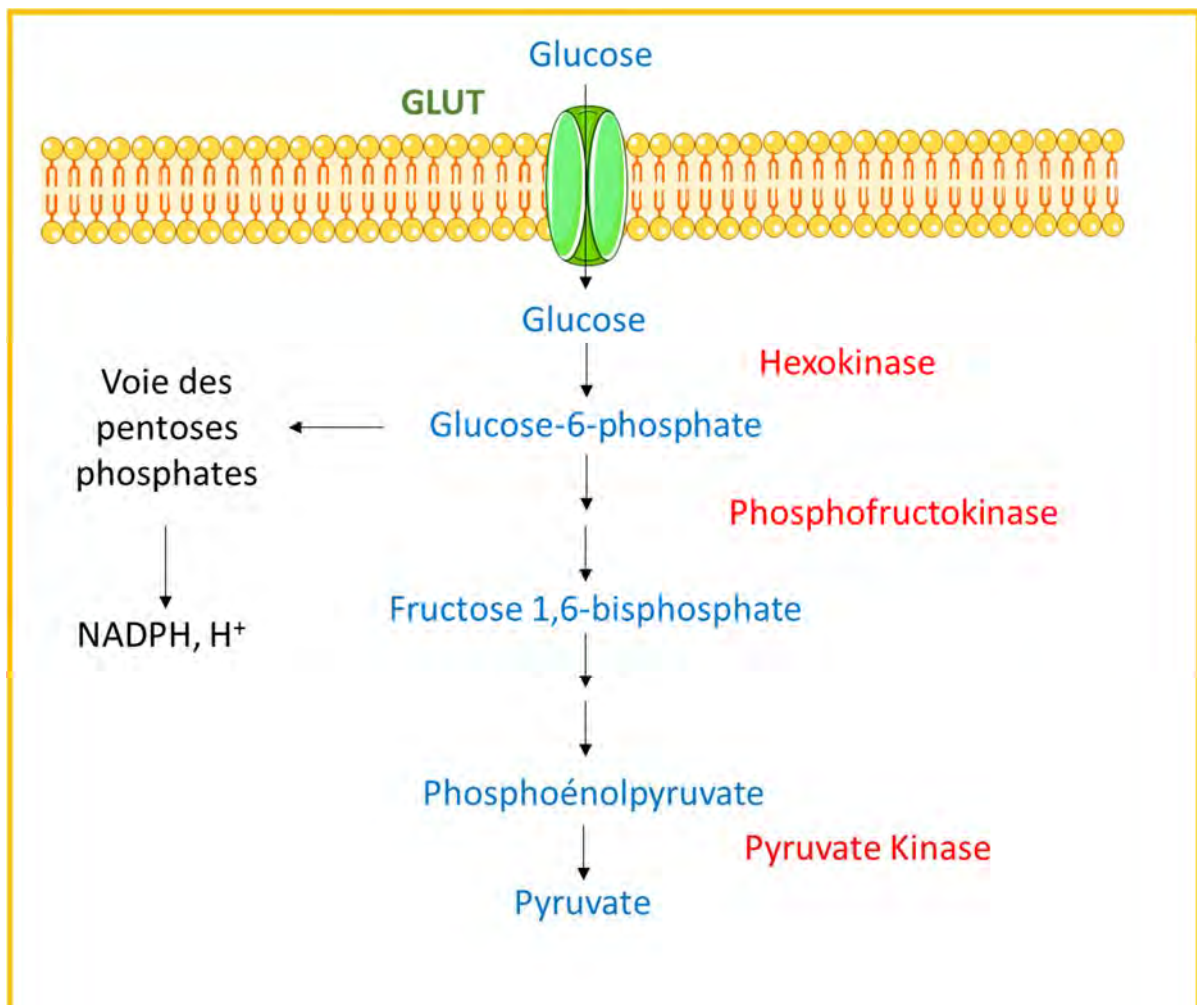


Figure 1 : Voie métabolique de la glycolyse

Le glucose entre dans la cellule, est converti en glucose-6-phosphate (G6P) et subit une série de réactions aboutissant à la formation de pyruvate, qui entre dans le cycle de Krebs afin de produire de l'énergie. Le G6P peut être dérivé vers la voie des pentoses phosphate afin de former des coenzymes réduits NADPH, H⁺, indispensables pour la biosynthèse des acides gras ou encore du cholestérol, et du ribose-5-phosphate, nécessaire à la synthèse de nucléotides. En fonction des besoins énergétiques de la cellule, le G6P est shunté vers la voie des pentoses phosphate au détriment de la glycolyse et vice versa.

Dans cette voie, le glucose entre dans la cellule par l'intermédiaire de GLUT2 (ou par GLUT4 lors d'une stimulation par l'insuline au niveau des muscles et des tissus adipeux), et est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par l'intermédiaire de la glucokinase dans le foie, et par une hexokinase dans les autres tissus. Il est à noter que plusieurs activateurs de la glucokinase ont été développés et testés comme thérapies contre le diabète de type 2, mais leur principal effet secondaire est l'hypoglycémie (pour revue, Rines et al., 2016).

c. Stockage du glucose

Le stockage du glucose se fait à travers la glycogénogénèse et la lipogénèse *de novo*.

La glycogénogénèse est une voie réalisée principalement au niveau du foie et des muscles permettant de stocker le glucose sous forme de glycogène après un repas (Figure 2).

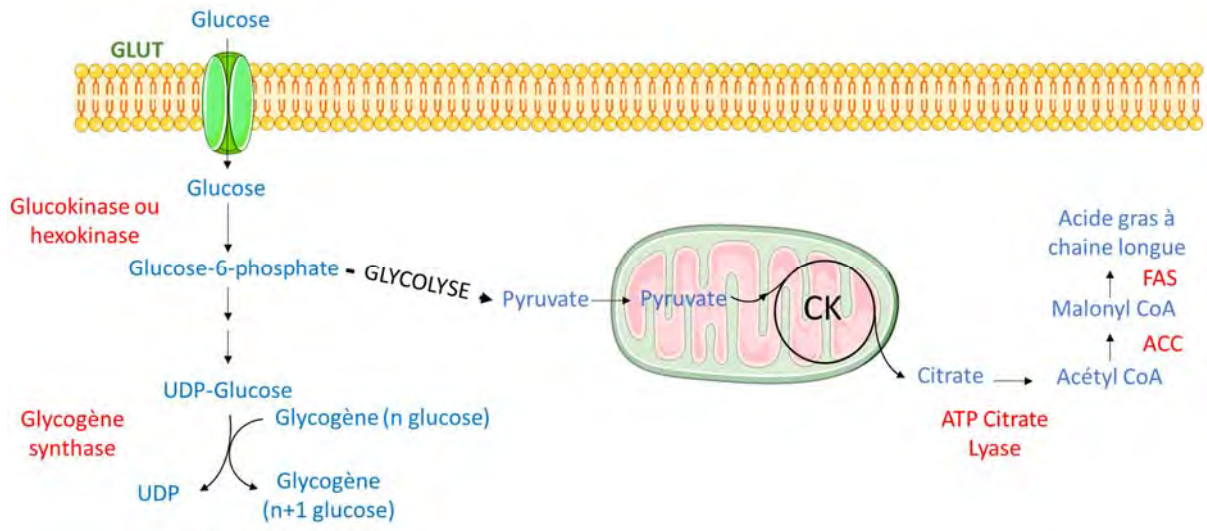


Figure 2 : Voie métabolique de la glycogénogénèse et de la lipogénèse *de novo*

Une fois entré dans la cellule, le glucose est transformé en UDP-glucose et lié à d'autres molécules de glucose pour être stocké sous forme de glycogène ou intègre la voie de la glycolyse pour aboutir à la formation de pyruvate. Le pyruvate entre dans le cycle de Krebs pour donner de l'acétyl-CoA qui est le premier substrat de la lipogénèse. CK : cycle de Krebs.

Le glycogène est constitué de plusieurs molécules de glucose liées entre elles en α 1-4 et de ramification de glucose en α 1-6. Une enzyme très importante dans cette voie est la GS (Glycogen Synthase) qui permet l'ajout des unités de glucose par des liaisons α 1-4. Cette enzyme est régulée par un système de phosphorylation/déphosphorylation sous contrôle de l'insuline.

Le stockage sous forme de glycogène a l'avantage d'être rapidement mobilisable, via la glycogénolyse, mais ses capacités sont limitées. C'est pourquoi il existe une autre forme de stockage du glucose, la lipogénèse *de novo* qui forme des acides gras à partir du glucose en excès (Figure 2).

Cette voie se réalise au niveau du foie et des tissus adipeux à partir du pyruvate produit par la glycolyse. Le pyruvate entre dans le cycle de Krebs au niveau de la mitochondrie dans le but de donner du citrate, premier substrat de la lipogénèse. La lipogénèse se déroule dans le cytosol et entraîne la formation d'acides gras à longues chaînes constituant les triglycérides intracellulaires. A noter que la régulation de cette voie se fait au niveau de l'entrée du glucose dans la cellule, ainsi qu'au niveau de deux enzymes : ACC (Acetyl CoA Carboxylase) et FAS (Fatty Acid Synthase).

d. Production du glucose

Durant la période interprandiale ou pendant des périodes de jeûne, l'organisme doit maintenir une glycémie constante malgré une absence d'ingestion de glucose. Pour cela, il existe des voies de production de glucose à partir des réserves de glycogène (glycogénolyse) et à partir de substrats non glucidiques (néoglucogénèse).

La glycogénolyse représente la dégradation du glycogène en glucose au niveau du foie et des muscles pour donner du G6P. Cependant le devenir du G6P diverge entre ces deux tissus : au niveau du foie, il est converti en glucose grâce à la glucose-6-phosphatase et relargué, via GLUT2, dans le compartiment sanguin afin de fournir du glucose aux autres tissus. Par contre, au niveau du muscle, il entre directement dans la voie de la glycolyse afin de produire de l'énergie (Figure 3).

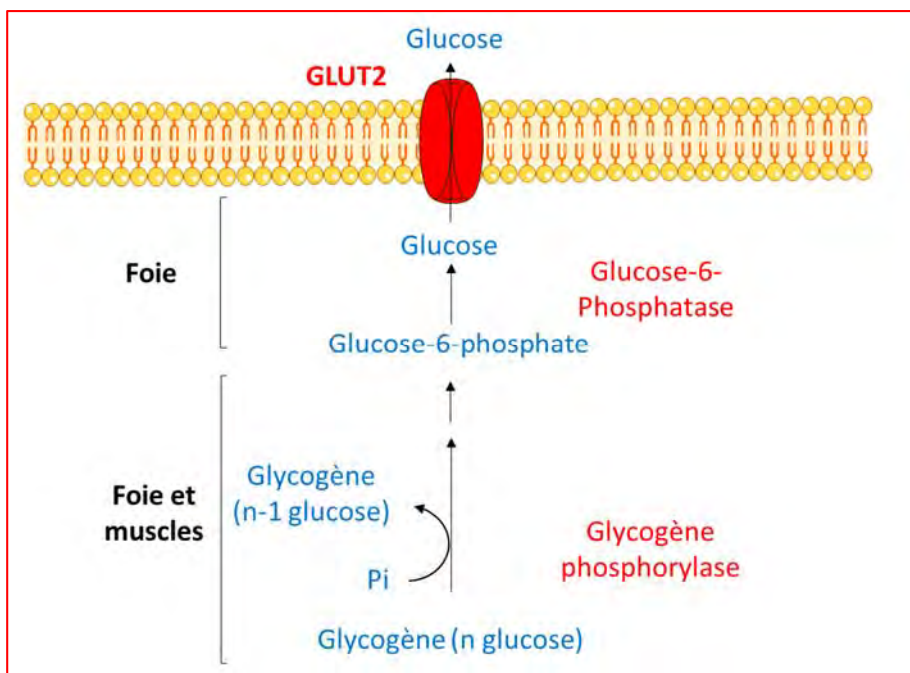


Figure 3 : Voie métabolique de la glycogénolyse.

Le glycogène est clivé pour libérer les molécules de glucose qui seront utilisées au niveau du muscle et qui sortiront de la cellule au niveau du foie.

La glucose-6-phosphatase est une enzyme très importante de cette voie, car un déficit en glucose-6-phosphatase provoque la maladie de von Gierke, une maladie rare qui est associée avec une hypoglycémie et un retard de croissance (Sun et al., 2009).

Une autre enzyme très importante dans cette voie est la Glycogen Phosphorylase, qui permet de scinder les liaisons α 1-4 et de libérer les molécules de glucose. Cette voie cytosolique permet une mobilisation rapide de glucose en cas de besoins énergétiques.

La néoglucogenèse est une voie principalement hépatique qui se déclenche lors de périodes de jeûne, quand les réserves de glycogène sont réduites. Elle permet la production de glucose à partir de substrats non glucidiques comme le lactate, certains acides aminés (en particulier l'alanine) ou encore le glycérol. Dans cette voie, les substrats non glucidiques sont utilisés pour former du pyruvate, qui intègre le cycle de Krebs pour former de l'oxaloacétate. Sous l'action de l'enzyme PEPCK (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase), du phosphoenolpyruvate est produit au niveau du cytosol et suit les réactions enzymatiques de la glycolyse, en sens inverse (Figure 4).

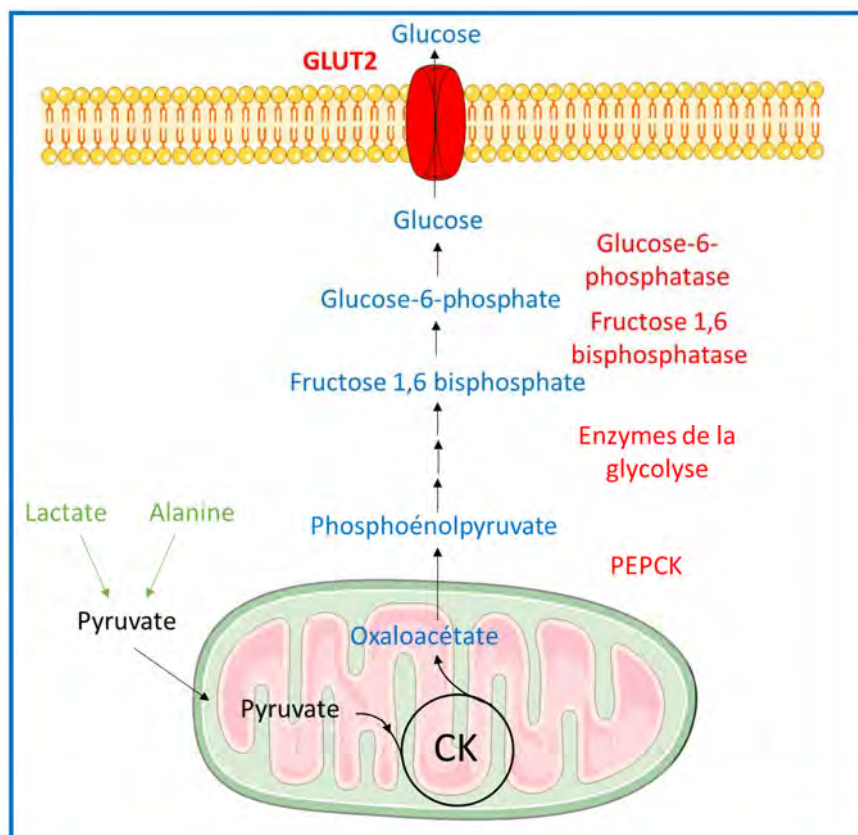


Figure 4 : Voie métabolique de la néoglucogenèse

Du pyruvate est formé à partir de substrats non glucidiques et entre dans le cycle de Krebs. De l'oxaloacétate est alors formé, sort de la mitochondrie et est converti en phosphoenolpyruvate par la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Ce composé subit les réactions inverses de la glycolyse pour finalement former du glucose.

Le glucose sort alors de la cellule grâce au transporteur bidirectionnel GLUT2. Dans cette voie, la fructose-1,6-bisphosphatase est une enzyme importante, dont des inhibiteurs en thérapie du diabète de type 2 sont actuellement en essais cliniques (van Poelje et al., 2011; Rines et al., 2016).

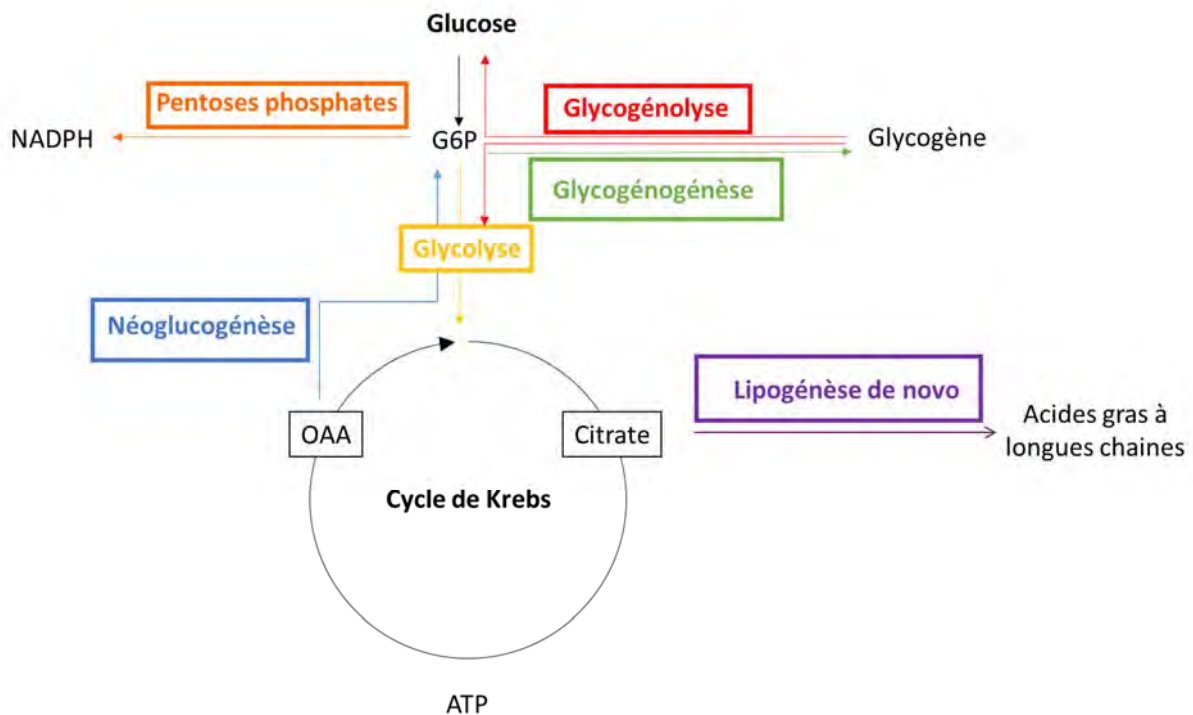


Figure 5 : Schéma récapitulatif du métabolisme glucidique.

2. Hormones impliquées dans ces flux

Le bon fonctionnement des voies métaboliques maintenant l'homéostasie glucidique nécessite plusieurs régulations qui se font au travers d'hormones classiquement réparties en deux catégories : les hormones hyperglycémiantes, comme le glucagon et les hormones hypoglycémiantes comme l'insuline.

a. L'insuline : une hormone hypoglycémiante

Biosynthèse et sécrétion d'insuline

Codée par le gène *INS* chez l'Homme, et par les gènes *Ins1* et *Ins2* chez le rat et la souris, située sur le chromosome 11, l'insuline est produite dans la cellule β des îlots de Langerhans pancréatiques. Plusieurs facteurs de transcription, comme PDX-1 et MafA, interviennent dans

la régulation de l'expression de l'insuline (Melloul et al., 1993; Olbrot et al., 2002). La liaison de ces facteurs de transcription avec le promoteur du gène codant pour l'insuline est favorisée par le glucose (Melloul et al., 1993 ; Zhao et al., 2005). De plus, l'importance du glucose dans la synthèse de l'insuline est telle qu'il intervient à toutes les étapes de sa synthèse, allant de la transcription du gène jusqu'au maintien de la stabilité des ARNm (Poitout et al., 2006). Le gène de l'insuline code pour une chaîne peptidique appelée préproinsuline possédant un peptide signal qui est clivé au niveau du réticulum endoplasmique. La mise en place de ponts disulfures et le clivage du peptide C par les prohormones convertases PC1/3 et PC2 permettent d'obtenir l'insuline mature avec une chaîne α et une chaîne β (Figure 6).

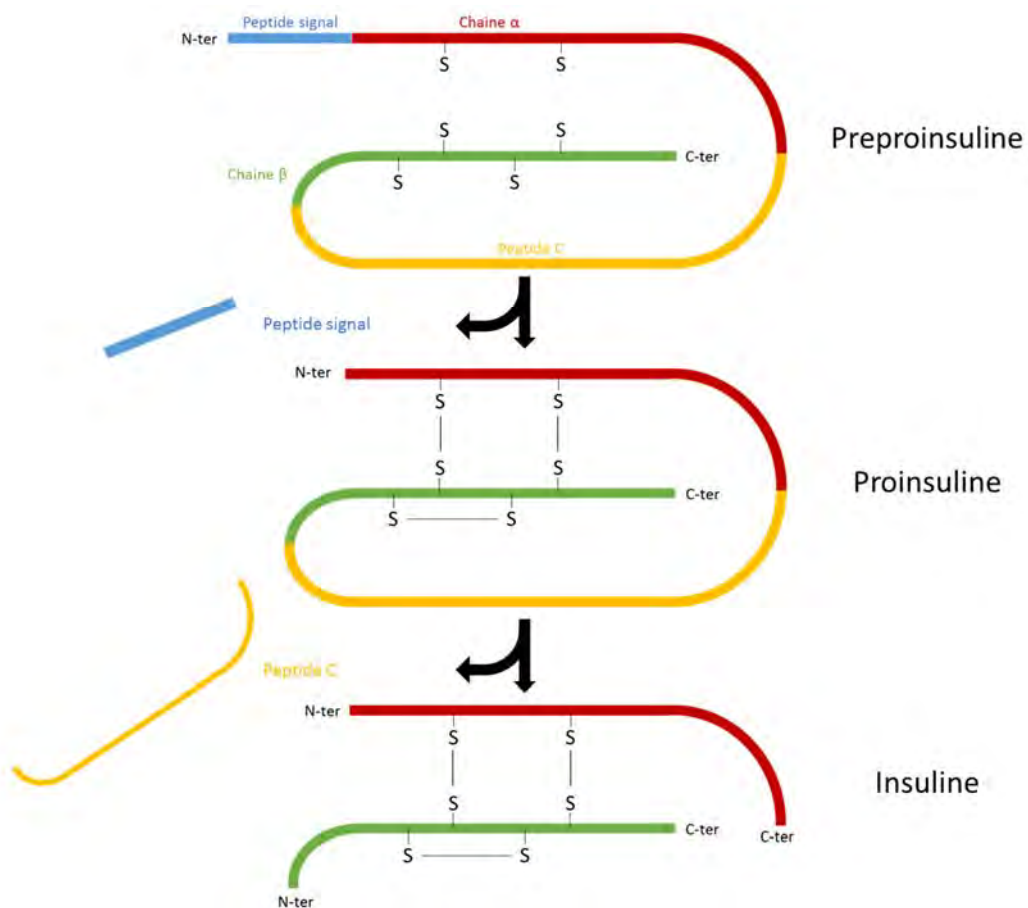


Figure 6 : Schéma de biosynthèse de l'insuline

A partir de la préproinsuline, plusieurs clivages ont lieu pour donner la forme mature de l'insuline ainsi que le peptide C.

L'insuline mature est stockée dans des granules dont l'exocytose est dépendante du glucose, sous le contrôle d'un mécanisme appelé « glucose-sensing ». En effet, lorsque la glycémie augmente, le glucose entre dans la cellule β par l'intermédiaire du transporteur GLUT2, puis suit la voie de la glycolyse pour donner de l'ATP. L'ATP ainsi formé ferme le canal K_{ATP} , entraînant une dépolarisation de la membrane permettant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. Cela conduit à une entrée de calcium dans la cellule, qui provoque l'exocytose des granules d'insuline (Figure 7).

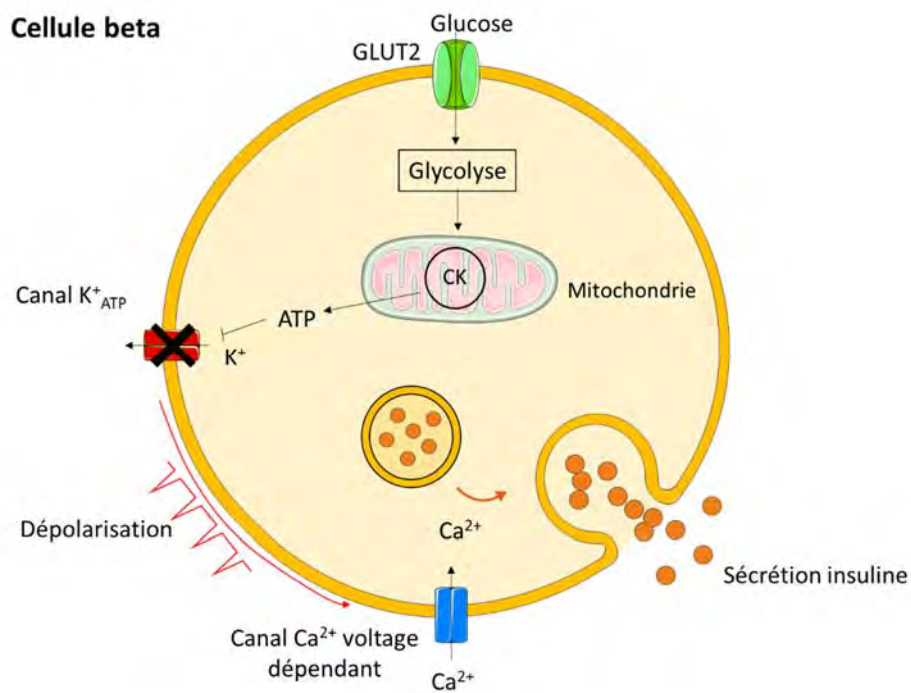


Figure 7 : Glucose-sensing au niveau de la cellule beta du pancréas

Le glucose entre dans la cellule, réalise la glycolyse pour donner de l'ATP entraînant la fermeture du canal K_{ATP} et une dépolarisation de membrane aboutissant à une entrée de calcium dans la cellule et l'exocytose des granules d'insuline. CK : Cycle de Krebs

La sécrétion d'insuline est soumise à une régulation très précise contrôlée par divers processus physiologiques, notamment la glycémie, mais aussi par certains acides aminés, acides gras ou des hormones.

En effet, des études ont montré que bien que les acides aminés aient un faible pouvoir sur la sécrétion d'insuline, une combinaison de glutamine et de leucine pouvait augmenter la sécrétion d'insuline (Dixon, 2003). En effet, la leucine peut être rapidement convertie en acétyl-CoA et être utilisée via le cycle de Krebs pour produire de l'ATP et ainsi fermer le canal

K_{ATP} permettant la dépolarisation de la cellule β (Malaisse et al., 1980). Par ailleurs, la sécrétion d'insuline peut également être stimulée par des acides gras libres (Roduit et al., 2004). En effet, l'oxydation des acides gras produit de l'ATP qui, comme nous l'avons vu précédemment entraîne la dépolarisation de la membrane de la cellule β et provoque l'exocytose des vésicules d'insuline (pour revue, Nolan et al., 2006). De plus, les acides gras interviennent dans les processus d'exocytose des granules d'insuline (Vijayakumar et al., 2017). Enfin, il existe des hormones pouvant moduler la sécrétion d'insuline, c'est notamment le cas pour le GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1), la leptine et l'hormone de croissance GH. Le GLP-1 est une hormone incrétine sécrétée par les cellules L de l'intestin suite à un repas et a un rôle stimulateur sur la sécrétion d'insuline en fermant le canal K_{ATP} (Light et al., 2002). A l'inverse, il a été montré que l'hormone de croissance GH, par son effet stimulateur sur la production d'IGF-1 (Insulin-like Growth factor 1) diminue la sécrétion d'insuline même si le mécanisme impliqué est encore discuté (Guler et al., 1989 ; Van Schravendijk et al., 1990 ; Fu et al., 2013). De même, la leptine, une hormone produite par le tissu adipeux, peut diminuer la sécrétion d'insuline, même si le mécanisme est encore peu compris (Fu et al., 2013).

Action de l'insuline

Libérée dans le compartiment sanguin, l'insuline agit sur ses tissus cibles par l'intermédiaire de son récepteur qui fait partie de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs). Ces récepteurs ont la particularité d'avoir une partie intracellulaire, qui comporte une activité enzymatique permettant de phosphoryler les tyrosines de substrats intracellulaires. En effet, la liaison de l'insuline à son récepteur rapproche les deux domaines tyrosine kinase permettant la phosphorylation de différentes tyrosines du domaine intracellulaire et de diverses protéines adaptatrices, créant des sites de liaison pour d'autres protéines comportant des domaines d'interaction avec les phosphotyrosines. L'échafaudage de ces complexes de signalisation au contact du récepteur initie différentes cascades de transduction du signal parmi lesquelles la voie PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) (Figure 8) et la voie MAPK (RAS/Mitogen Activated Protein Kinase).

Une fois que ces voies de signalisation sont activées, le complexe ligand/récepteur est internalisé. Pour cela, le complexe est séquestré dans des vésicules intracellulaires de l'appareil endosomal, et des pompes à protons ATP-dépendantes acidifient l'intérieur des endosomes dissociant ainsi le complexe ligand/récepteur. Alors que l'insuline est dégradée, le

récepteur libre est dirigé soit vers le compartiment lysosomal pour y être dégradé soit vers la membrane plasmique pour permettre à un nouveau signal insulinique d'être transmis. Dans ce cas, l'acidification des endosomes est inhibée pour permettre le recyclage du récepteur à la membrane plasmique. L'exposition des cellules à une forte mais brève concentration d'insuline induit le recyclage alors que l'exposition prolongée à l'insuline induit la dégradation du récepteur (Guglielmo et al., 1998), ceci permettant une première régulation du signal insulinique.

- **L'activation de la voie PI3K** passe par la phosphorylation des protéines d'ancrage IRS, et en particulier IRS-1 et IRS-2, qui, une fois phosphorylées, permettent de propager le signal insulinique en recrutant d'autres composants de la voie via leur domaine SH2 (Src homology 2 domain).

Les phosphorylations de certaines tyrosines d'IRS-1, incluses dans des motifs YXXM, permettent de recruter et d'activer les PI3K de classe Ia. Celles-ci sont composées d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice, p85 (qui inhibe la sous-unité catalytique p110 à l'état basal), dont le domaine SH2 a une grande affinité pour les domaines YXXM. L'interaction p85/IRS-1 induit l'activation de PI3K par un mécanisme complexe faisant intervenir des interactions inter-moléculaires, la relocalisation à proximité des substrats lipidiques et la phosphorylation de p85 qui perd alors sa fonction inactivatrice sur la sous-unité p110. PI3K phosphoryle la position 3 du noyau inositol du PI4,5P₂ (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) pour donner du PIP₃ (phosphatidyinositol-,4,5-triphosphate). Ce véritable second messenger assure, via des interactions avec des domaines PH (pleckstrin homology), la relocalisation et/ou l'activation de diverses protéines, comme les kinases PDK-1 (3-phosphoinositide-dependant protein kinase 1) et AKT. La pleine activation d'AKT requiert sa phosphorylation sur la thréonine³⁰⁸ par PDK1 (Alessi et al., 1997), mais aussi sur sa sérine⁴⁷³ par mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 2) (Sarbasov et al., 2005). Une fois activée, AKT phosphoryle plusieurs protéines, notamment AS160 (Akt Substrate 160 kDa protein), dont la phosphorylation médie la translocation de GLUT4 à la membrane, favorisant ainsi l'entrée de glucose dans la cellule (Guo, 2014). De plus, un autre substrat d'AKT est GSK3β (Glycogen synthase kinase 3 beta), ce qui conduit à l'activation de la GS (Glycogen Synthase) et ainsi à l'activation de la glycogénogénèse (Figure 8). L'insuline agit également via AKT au niveau des voies utilisatrices de glucose, comme la glycolyse, en induisant la synthèse

de l'hexokinase ou encore de la pyruvate kinase. Enfin, AKT phosphoryle le facteur de transcription FOXO1, induisant une diminution de la transcription d'enzymes intervenant dans la néoglucogénèse, ce qui aboutit à la diminution de la production hépatique de glucose.

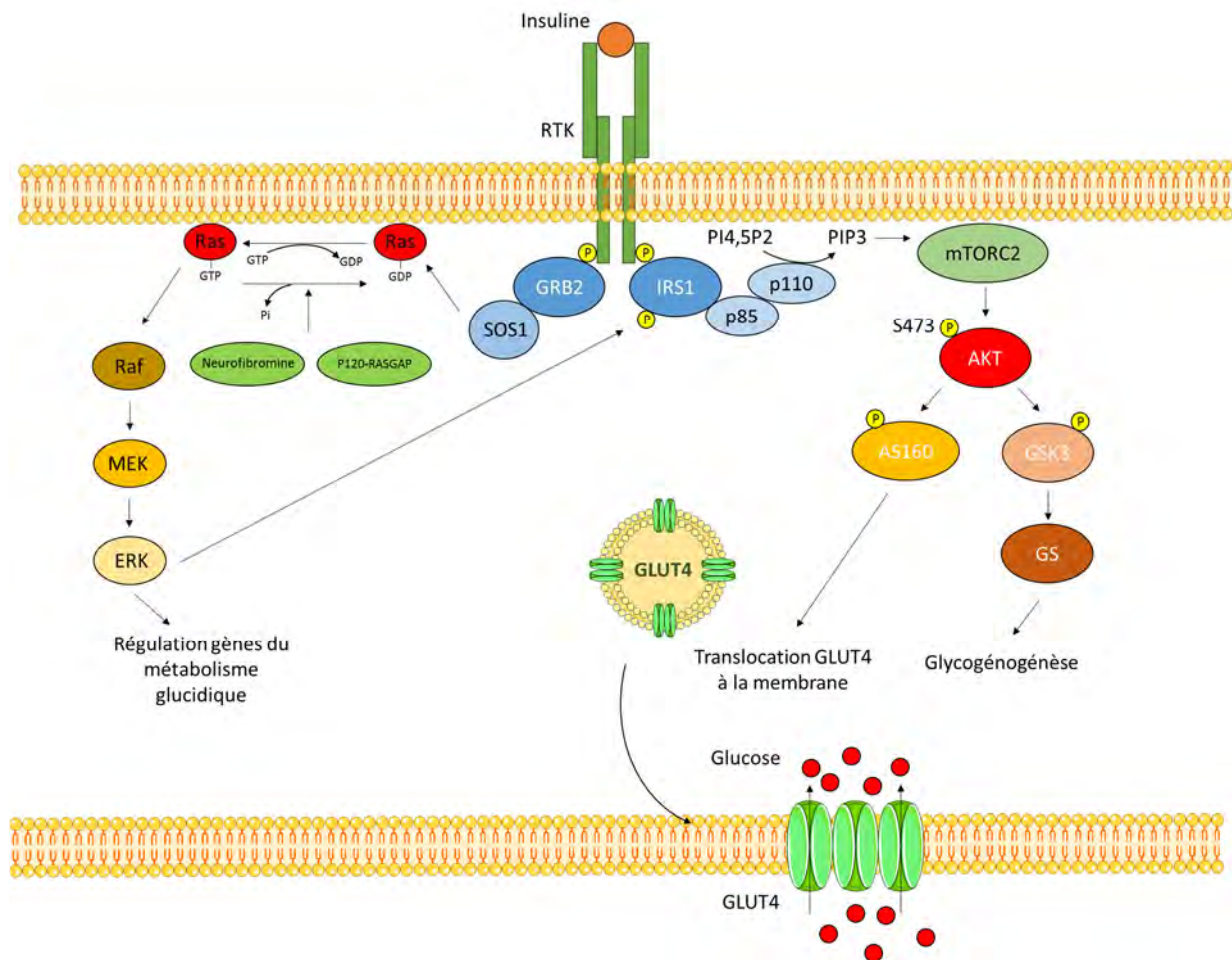


Figure 8 : Action de l'insuline via la voie PI3K et RAS/MAPK sur le métabolisme du glucose

En se liant à son récepteur, l'insuline active la voie PI3K, permettant l'entrée de glucose dans la cellule via la translocation de GLUT4 à la membrane, et le stockage de glucose sous forme de glycogène via l'activation de la Glycogène Synthase (GS). L'insuline active également la voie RAS/MAPK aboutissant à l'activation des protéines ERK, et pouvant inhiber la voie PI3K par des phosphorylations inhibitrices sur IRS-1.

Plusieurs études montrent que la délétion de certains composants ou l'inhibition pharmacologique de cette voie induit une hyperglycémie associée à une diminution du transport de glucose (Mauvais-Jarvis et al., 2002 ; Zhao et al., 2006 ; Ortega-Molina et al., 2015 ; Lopez-Guadamillas et al., 2016 ; Hopkins et al., 2018). À l'inverse, l'hyperactivation de la voie, par délétion de régulateurs négatifs (e.g. PTEN) résulte en une hypoglycémie (Stiles et al., 2004; Kurlawalla-Martinez et al., 2005; Wijesekara et al., 2005). De plus, la diminution

d'expression de la sous-unité p85 (en diminuant la quantité de p85 monomérique, favorisant ainsi le recrutement de l'hétérodimère) améliore fortement la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Mauvais-Jarvis et al., 2002).

Ainsi, l'activation de la voie PI3K en réponse à l'insuline, en stimulant le transport de glucose et les voies d'utilisation/stockage de glucose et en inhibant les mécanismes de production, joue une part importante dans l'action hypoglycémiante de l'insuline.

- **L'activation de la voie Ras/MAPK** se réalise quant à elle à travers la protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor Receptor Bound protein 2), qui est recrutée par ses domaines SH2 au niveau d'IRS-1/2 ou sur SHC, une autre protéine adaptatrice associée au récepteur de l'insuline phosphorylée. Ceci permet le recrutement de SOS (Son of sevenless 1), un facteur d'échange de nucléotides à guanine (GEF) nécessaire pour l'activation de Ras, la protéine centrale de la voie MAPK. RAS est une petite protéine G à activité GTPase (Guanosine Tri Phosphate hydrolase) ancrée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. RAS oscille d'un état inactif lié au GDP à un état actif lié au GTP dans lequel elle interagit avec ses effecteurs. Ainsi, le recrutement de SOS permet le remplacement du GDP par du GTP sur Ras entraînant son activation. À l'inverse, des protéines GTPase Activating Protein (GAP), comme la neurofibromine 1 (NF1) et la p120-RASGAP, stimulent l'activité catalytique intrinsèque de Ras permettant son retour à la forme Ras-GDP inactive. Ras-GTP initie différentes voies de signalisation, notamment la voie des MAPK via une cascade de phosphorylations de trois kinases RAF-MEK-ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1 and 2) (Figure 8).

Le rôle de la voie RAS/MAPK dans la signalisation insuline est complexe, mais il a cependant été montré que ERK1/2 peut phosphoryler IRS-1 sur des résidus sérines spécifiques, inhibant l'association IRS1/p85, et donc l'activation de la voie PI3K. Ainsi, ce mécanisme a été montré comme pouvant diminuer l'action de l'insuline dans plusieurs tissus (De Fea and Roth, 1997 ; Boucher et al., 2014). De plus, des souris délétées pour ERK1 spécifiquement dans le foie ont une sensibilité à l'insuline augmentée et un traitement chronique avec un inhibiteur de MEK (PD0325901) améliore la sensibilité à l'insuline chez des souris obèses et diabétiques (Banks et al., 2015).

b. Le glucagon : une hormone hyperglycémiant

Le glucagon est une hormone peptidique produite à partir du proglucagon. Le proglucagon est présent dans plusieurs tissus (cerveau, pancréas, intestins) et suivant la prohormone convertase considérée, son clivage produit plusieurs peptides. Au niveau des cellules α pancréatiques, son clivage par la prohormone convertase 2 (PC2) forme le glucagon (Rouillé et al., 1994). Hormone hyperglycémiant, le glucagon est sécrété dans des conditions d'hypoglycémie, mais les mécanismes sont encore mal compris. En effet, s'il est bien connu que l'administration orale de glucose supprime la sécrétion de glucagon, l'augmentation de la concentration de glucose dans des cellules α isolées stimule de façon surprenante la sécrétion de glucagon (Le Marchand and Piston, 2010). La régulation de la sécrétion du glucagon se fait également par certains acides aminés comme l'arginine (Eisenstein and Strack, 1978) et des acides gras (Hong et al., 2007) en réponse à une stimulation adrénergique ou en réponse à certains peptides stimulateurs, comme la ghréline, ou inhibiteurs, comme le GLP-1 ou l'insuline (Gromada et al., 2007 ; Cooperberg and Cryer, 2010).

Le glucagon agit par l'intermédiaire d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, appelé glucagon receptor (GCGR), exprimé principalement au niveau du foie et des reins (Figure 9). Le GCGR est couplé à une protéine Gs qui stimule l'adénylate cyclase ce qui produit de l'AMPc aboutissant à l'activation de la protéine kinase A (PKA). Celle-ci phosphoryle la phosphorylase kinase induisant l'activation de la glycogène phosphorylase, ce qui stimule la glycogénolyse (Jiang and Zhang, 2003). La PKA phosphoryle également la protéine CREB (cAMP Response Element Binding) qui se lie au promoteur du gène codant pour PGC-1 et active sa transcription (Herzig et al., 2001). PGC-1 est un co-activateur nécessaire à la transcription des enzymes PEPCK et G-6-Pase permettant, avec FOXO1, de stimuler la néoglucogénèse (Yoon et al., 2001).

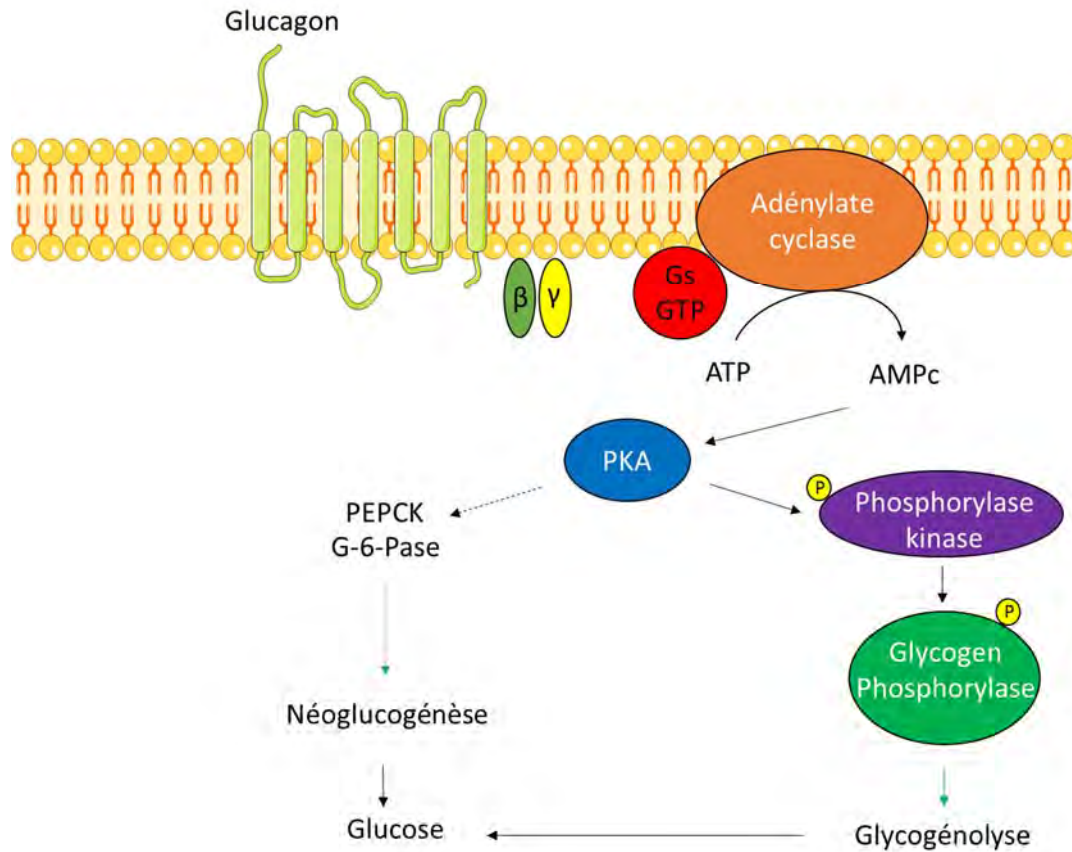


Figure 9 : Action du glucagon sur le métabolisme glucidique (adapté de Jiang et Zhang, 2003)

La liaison du glucagon à son récepteur active la protéine Gs aboutissant à l'activation de la PKA. Une fois activée, la PKA active la transcription des enzymes impliquées dans la néoglucogénèse, et active la glycogénolyse.

3. Désordres du métabolisme glucidique

Comme nous l'avons vu précédemment, la régulation du métabolisme glucidique est complexe et fait intervenir plusieurs facteurs comme les hormones, certains acides aminés ou encore des acides gras. Tous ces éléments permettent de maintenir la glycémie stable au cours du temps. Cependant, il existe de nombreuses causes pouvant altérer cette régulation et provoquer plusieurs désordres comme des hypoglycémies (ce qui ne sera pas détaillé ici) mais aussi des pathologies comme le syndrome métabolique ou encore le diabète de type 2.

a. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique (SM) a d'abord été défini par Reaven en 1988 comme une association de symptômes regroupant : une diminution du glucose uptake sous insuline, une intolérance au glucose, une hyperinsulinémie, une augmentation des VLDL, une diminution

du cholestérol HDL et une hypertension. Sa définition a ensuite été revue par l'Organisation Mondiale de la Santé en 2001 pour y ajouter la présence d'une obésité viscérale. En 2005, l'IDF (International Diabetes Federation) a redéfini le SM comme étant un ensemble de conditions qui, une fois regroupées, augmentent le risque de maladies cardiovasculaires, d'infarctus et de diabète. Les critères de diagnostic sont une obésité abdominale (tour de taille ≥ 94 cm) combinée à deux des critères suivants : triglycérides ≥ 150 mg/dL ou cholestérol HDL < 40 mg/dL, pression sanguine $\geq 140/90$ mmHg, glycémie à jeun ≥ 100 mg/dL. Malgré les différences de critères de diagnostic suivant les définitions, tous s'accordent sur le fait que le SM est caractérisé par une obésité et une résistance à l'insuline (Alberti et al., 2006). Le SM représente un problème majeur de santé publique avec une prévalence de 25% d'adultes atteints dans le monde (O'Neill and O'Driscoll, 2015), une mortalité cardiovasculaire six fois plus élevée (Isomaa et al., 2001) et un risque cinq fois plus élevé de développer un diabète (Stern et al., 2004).

b. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie métabolique très fréquente qui touchait 422 millions d'adultes dans le monde en 2014 avec une prévalence qui augmente dans toutes les régions du monde (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). Le DT2 est caractérisé par une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline et une défaillance de la cellule bêta (Ogihara and Mirmira, 2010) (Figure 10).

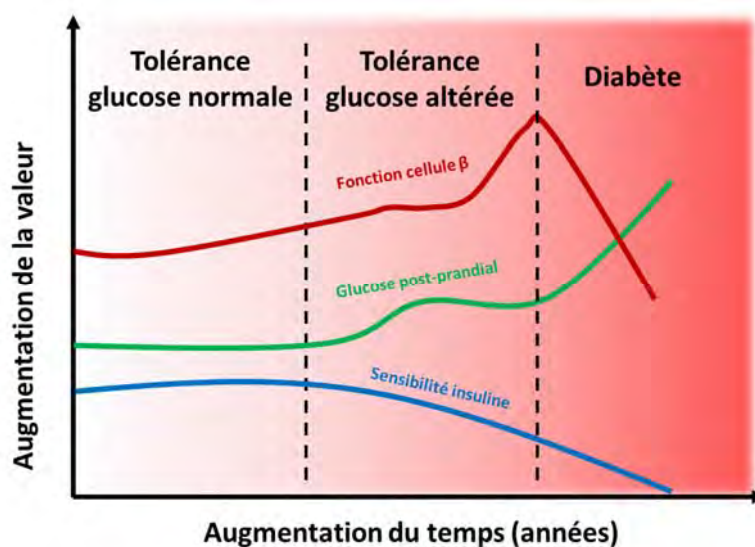


Figure 10 : Altération du métabolisme glucidique durant le diabète de type 2

Évolution de la fonction de la cellule β , de la glycémie et de la sensibilité à l'insuline dans le temps suivant l'état physiologique : tolérance au glucose normale, altérée et lors du diabète (adaptée de Ogihara and Mirmira, 2010)

Les principales complications du DT2 sont des complications cardiovasculaires qui touchent les petits vaisseaux comme les rétinopathies diabétiques, les néphropathies diabétiques et les neuropathies diabétiques mais aussi les plus gros vaisseaux et favorise la formation de plaques d'athéromes ainsi que les arrêts cardiaques. À la différence du diabète de type 1 qui est une maladie génétique auto-immune dirigée contre les cellules du pancréas, le DT2 est une maladie complexe associant des causes génétiques et environnementales.

Les causes génétiques du DT2 sont illustrées par plusieurs aspects : d'une part, la prévalence du DT2 varie considérablement selon les populations, passant de 2% chez les Caucasiens en Europe à plus de 50% chez les Indiens Pima (Diamond, 2003). D'autre part, il est clairement établi qu'il existe une prévalence familiale de cette maladie, où le risque pour un enfant de développer un DT2 est de 30 % si un de ses parents est diabétique et approche 70% si les deux parents sont diabétiques. Enfin, un troisième argument est le taux de concordance très élevé chez les jumeaux, qui est proche de 100% chez des jumeaux homozygotes (Diamond, 2003).

Le principal facteur environnemental est l'obésité qui, surtout lorsqu'elle est abdominale, est le plus robuste facteur prédisposant au DT2 (Hu et al., 2001; Guh et al., 2009). Véritable pandémie, l'obésité se manifeste à travers une détérioration de l'alimentation, une diminution de l'activité physique et une augmentation de la sédentarité chez la majorité des personnes depuis plusieurs années, se traduit par une augmentation de l'adiposité et s'accompagne du développement du T2D chez un grand nombre de sujets. Or, il a été montré qu'une réduction du poids est associée à un risque diminué de développer un diabète et que chez des personnes diabétiques, une perte de poids est associée à une forte diminution des risques cardiovasculaires (Wilding, 2014).

L'obésité peut également être classée dans les causes génétiques car il est maintenant bien établi qu'il existe des gènes de prédisposition à l'obésité, le meilleur exemple étant le gène *MC4R*, codant pour la protéine Melanocortin Receptor 4, qui est associé à une obésité sévère (Farooqi et al., 2000).

Cependant, il existe une certaine interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux qui est illustrée par l'augmentation de la prévalence du DT2 dans certaines populations suite à un changement dans leur style de vie. C'est notamment le cas des Indiens Pimas en Arizona, qui pendant des milliers d'années ont connu des périodes de famines et de grande sécheresse entraînant ainsi une sélection de gènes favorisant le stockage de graisses. Lorsque cette population s'est retrouvée dans une société de pléthore alimentaire, ces gènes

sont alors devenus pro obésogènes et le nombre de personnes atteintes de DT2 a alors augmenté de façon exponentielle, pour arriver aujourd’hui à une prévalence de DT2 de 50%, ce qui en fait la population avec la plus grande prévalence de DT2 (Diamond, 2003). Cet exemple montre que les facteurs génétiques et environnementaux agissent en synergie.

La pathogénèse du DT2 fait intervenir plusieurs mécanismes aboutissant à l’hyperglycémie regroupés à ce jour sous le terme d’« ominous octet » (Figure 11). Il regroupe la résistance à l’insuline dans les tissus périphériques, processus au cours duquel l’action hypoglycémisante de l’insuline décroît, l’augmentation de la lipolyse des tissus adipeux, l’augmentation de la réabsorption du glucose au niveau du rein, une dysfonction des neurotransmetteurs, l’augmentation de la sécrétion de glucagon et la diminution de l’effet incrétine, aboutissant à l’hyperglycémie et au DT2 (DeFronzo, 2009).

Nous nous intéresserons dans la partie suivante à l’insulino résistance, composante majeure du DT2.

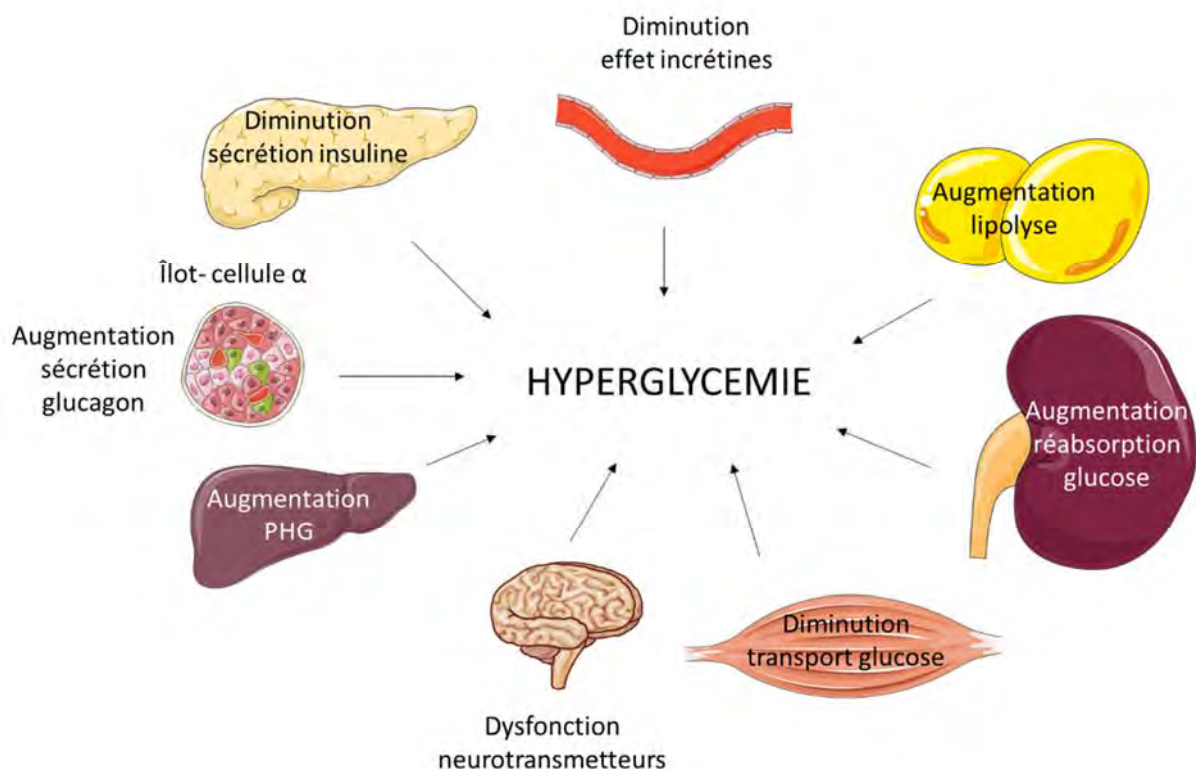


Figure 11 : Pathogénèse du DT2 : « l’ominous octet »

Liste des causes retrouvées dans le DT2 provoquant une hyperglycémie (adapté de DeFronzo, 2009)

II. Résistance à l'insuline

L'insulino résistance, principale composante du DT2, est un processus complexe au cours duquel l'efficacité de l'insuline sur ses tissus cibles diminue, résultant en une diminution du transport de glucose dans les tissus et en l'augmentation de la production hépatique de glucose. Pour compenser cette diminution d'efficacité de l'insuline, la cellule beta pancréatique augmente sa sécrétion d'insuline et tant que ce processus est opérationnel, la régulation de la glycémie continue de se réaliser. On parlera alors d'intolérance au glucose avec des patients qui sont normoglycémiques mais hyperinsulinémiques. Cependant, avec le temps, la cellule beta perd de son efficacité et la sécrétion d'insuline diminue renforçant ainsi la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie (Piya et al., 2010).

La résistance à l'insuline dans les tissus périphériques, comme le foie, les tissus adipeux et les muscles, a été caractérisée comme le triumvirat du DT2, et il est maintenant bien établi que l'obésité est corrélée à l'insulino-résistance de ces trois tissus (DeFronzo, 1988).

Nous étudierons ici les conséquences et les causes de l'insulino-résistance ainsi que les cibles thérapeutiques actuelles pour lutter contre cet état.

1. Diagnostic de l'insulino-résistance

Étant donné que l'insulino-résistance est la composante centrale du DT2, son diagnostic est nécessaire, mais peut être difficile à réaliser. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour évaluer une résistance à l'insuline avec des méthodes simples comme la mesure de la glycémie et de l'insulinémie, qui est la mesure de l'hémoglobine glyquée. Des tests métaboliques comme l'hyperglycémie provoquée par voie orale, le test de tolérance à l'insuline et le clamp hyperinsulinémique-euglycémique sont également utilisés. Par ailleurs, il existe des indices de résistance à l'insuline, comme l'HOMA-IR ou encore l'indice de QUICKI.

a. Méthodes simples

Mesure de la glycémie : C'est la méthode la plus simple et la plus rapide pour évaluer la présence d'un diabète. Selon l'OMS, une glycémie à jeun (après un jeûne de 8h) est signe d'un métabolisme glucidique normal lorsqu'elle est < 110 mg/dL, est signe d'un prédiabète quand elle est comprise entre 110-125 mg/dL, et caractérise un état diabétique lorsqu'elle est > 126 mg/dL. Cependant, le problème majeur de ce test concerne la mise à jeun, qui selon

l'adhérence et le temps de jeûne va directement modifier la glycémie et peut conduire au mauvais diagnostic. De plus, d'autres facteurs peuvent influencer la mesure de la glycémie comme l'utilisation de sang complet ou de plasma ou encore l'âge (la glycémie augmente avec l'âge).

Mesure de l'insulinémie : La mesure de l'insulinémie se fait à jeun sur du plasma et se situe aux alentours de 5 mU/L. Cette mesure, combinée avec celle de la glycémie, donne une première indication de l'état du métabolisme glucidique du patient.

Mesure de l'hémoglobine glyquée : La glycation est une modification post-transcriptionnelle des protéines en présence de sucre. Cette réaction ne nécessite pas d'enzyme et le pourcentage de protéines glyquées est fonction de la quantité de sucres présents. L'hémoglobine est une des protéines pouvant être glyquée et sa forme principale est l'hémoglobine A1c (HbA1c) dont la concentration varie entre 4 et 6%. La demi-vie de l'hémoglobine glyquée est de 120 jours, et est donc un reflet de la glycémie sur une période de 3 mois. Selon l'OMS, une HbA1c est normale si $< 6\%$ et est signe de diabète si $> 6.5\%$ (DeFronzo et al., 2015). Cependant, certaines études nuancent l'utilisation de l'HbA1c comme méthodes de dépistage pour des personnes à risques et montrent une meilleure sensibilité de dépistage pour l'HGPO ou la glycémie à jeun (Cederberg et al., 2010; Lorenzo et al., 2010).

b. Tests métaboliques

Hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) : Ce test consiste en l'ingestion d'un bolus de glucose par voie orale (généralement 75g dans 300 mL d'eau chez l'humain) après un jeûne et de suivre la glycémie au cours du temps. Suite à ce test, les patients pourront être répartis en trois catégories : normotolérants (si la glycémie à 2h est < 140 mg/dL), intolérants au glucose (si la glycémie à 2h est entre 140-199 mg/dL) ou diabétiques (glycémie à 2h > 200 mg/dL) (DeFronzo et al., 2015).

Test de tolérance à l'insuline : Ce test consiste en l'injection d'un bolus d'insuline et d'un suivi de glycémie au cours du temps. Ce test est peu utilisé en raison du risque d'hypoglycémie associée au bolus d'insuline. Pour éviter le risque d'hypoglycémie chez l'humain, le test se fait sur les 15 premières minutes après injection.

Clamp hyperinsulinémique-euglycémique : Ce test est considéré comme la méthode de référence pour évaluer la sensibilité à l'insuline. Il consiste en la perfusion veineuse d'insuline à débit constant afin de provoquer une hyperinsulinémie stable, et en une perfusion veineuse

de glucose à débit variable afin de maintenir la glycémie constante. En effet, suite à l'action de l'insuline, le glucose entre dans les cellules et la production hépatique de glucose chute, conduisant à une diminution de la glycémie. Ainsi, plus le débit de glucose est élevé, et plus la sensibilité à l'insuline est bonne. Cependant, cette méthode est lourde à mettre en place en clinique et n'est pas réalisable pour des études populationnelles.

c. Indice de résistance à l'insuline

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment : Insulin Resistance) : Cette méthode de calcul a été mise au point par Matthews et al., en 1985 et consiste à multiplier la glycémie par l'insulinémie et de diviser le tout par une constante de 22,5 (qui représente le produit de l'insulinémie (5 mU/L) et de la glycémie (4,5 mM) chez un patient sain à jeun). Cette méthode a un bon taux de recouvrement avec le clamp hyperinsulinémique euglycémique (Matthews et al., 1985) et est très facile à mettre en place. Plus la valeur de l'HOMA-IR est importante et plus le patient sera résistant à l'insuline et l'on considère qu'un HOMA-IR >2 est signe d'insulino-résistance.

QUICKI (Quantitative Insulin sensitivity Check Index) : Cette méthode a été mise au point par Katz et al., 2000 et est définie par la formule suivante :

$$\frac{1}{\log(\text{insulinémie à jeun}) + \log(\text{glycémie à jeun})}$$

Le principe de cette formule est le même que celui de l'HOMA, mais intègre un logarithme dans la formule, ce qui rend le QUICKI plus reproductible entre deux visites que l'HOMA (Sarafidis et al., 2007). Néanmoins, ces deux indices sont utilisés en routine pour le diagnostic des patients.

d. Adaptation de ces tests chez l'animal

L'ensemble de ces tests ont été adaptés chez l'animal afin d'étudier le métabolisme glucidique.

Test de tolérance au glucose : comme chez l'humain, les animaux reçoivent un bolus de glucose généralement à une dose de 3g/kg et la glycémie est mesurée au cours du temps. Ce test peut également se faire par injection intrapéritonéale pour s'affranchir de l'effet incrétine (GLP-1 et GIP1, qui sont sécrétées par l'intestin suite à l'absorption intestinale de glucose) et

ainsi mieux caractériser la réponse. L'injection de glucose peut également se faire par voie veineuse, mais cette technique est peu utilisée.

Test de tolérance à l'insuline : le principe est le même que chez l'humain mais le test se fait sur une période plus longue, en général 120 minutes, afin d'évaluer la remontée de la glycémie.

Clamp hyperinsulinémique-euglycémique : cette méthode est couplée avec l'utilisation de glucose radiomarqué (comme le 2-déoxyglucose marqué au H³ ou au C¹³) pour mesurer l'incorporation du glucose dans les différents tissus (qui sont prélevés après sacrifice) ou avec du H³glucose afin d'évaluer la production hépatique de glucose.

2. Causes

La résistance à l'insuline est multi-causale, et associe des composantes aussi bien génétiques qu'environnementales. Parmi ces causes, nous nous intéresserons ici aux acteurs directs, c'est à dire aux acteurs intrinsèques de la voie de signalisation PI3K qui sont dérégulés dans l'insulino-résistance, et aux acteurs systémiques et environnementaux.

a. Acteurs directs

Étant donné l'importance de la signalisation insuline dans le métabolisme glucidique, il existe des mécanismes régulateurs induisant une inhibition de la signalisation insuline. Cette inhibition peut venir de déphosphorylations de tyrosines activatrices de PI3K (comme la protéine PTP1B), de phosphorylations inhibitrices (sérines/thréonines) ou encore de déphosphorylations de substrats lipidiques (SHIP2, PTEN).

Inhibition de l'activation de PI3K : déphosphorylations et phosphorylations inhibitrices

- **PTP1B** est une protéine tyrosine phosphatase codée par le gène *PTPN1* et se distribue dans plusieurs tissus comme le foie, les muscles squelettiques ou encore les tissus adipeux. Cette phosphatase est localisée à la surface du réticulum endoplasmique via son extrémité C-terminale et il a été montré qu'elle peut déphosphoryler le récepteur à l'insuline entraînant ainsi un arrêt du signal insulinaire (Elchebly, 1999). Les souris nourries en régime gras présentent une augmentation de l'expression de PTP1B au niveau du foie, du muscle, des tissus adipeux et de l'hypothalamus (Bettaieb et al., 2012; Nagata et al., 2012; Panzhinskiy et al., 2013; Prada et al., 2013). De plus, les souris PTP1B KO présentent une amélioration de la

sensibilité à l'insuline, avec une augmentation de la phosphorylation du récepteur à l'insuline au niveau du foie et du muscle squelettique, et sont résistantes à l'obésité et à l'insulino-résistance induite par un régime gras (Elchebly, 1999 ; (Klaman et al., 2000). De plus, plusieurs groupes ont montré une association entre des polymorphismes de PTP1B et l'apparition du syndrome métabolique chez l'humain (Bento et al., 2004). L'ensemble de ces données fait de PTP1B une cible thérapeutique potentielle contre la résistance à l'insuline associée au DT2.

- **Les Phosphorylations sérines/thréonines (S/T) inhibitrices** sont des acteurs majeurs dans la régulation de la voie PI3K. Ces phosphorylations sont classiquement décrites sur le récepteur à l'insuline et sur ses substrats comme IRS-1 et IRS-2 (Copps and White, 2012). Les phosphorylations S/T induisent des changements conformationnels pouvant éventuellement empêcher le recrutement de p85 sur les motifs YXXM (Nishi et al., 2014). Les phosphorylations les mieux décrites se situent au niveau de IRS-1, où l'on compte plus de 20 résidus phospho-S/T dont les fonctions ont été caractérisées (Copps et White, 2012). Ces phosphorylations sont la conséquence de l'intervention de protéine kinases (MAPK, JNK...) activées par plusieurs composés comme des acides gras libres, des cytokines et même par l'insuline dans des situations de lipotoxicité ou encore d'inflammation (Gual et al., 2005) (voir le paragraphe suivant : facteurs environnementaux et systémiques). Parmi les différents sites de phosphorylation S/T, la plus étudiée concerne la Ser³⁰⁷ dont l'hyperphosphorylation est fréquemment utilisée comme signature d'insulino-résistance. En effet, il a été montré que cette phosphorylation est augmentée chez des souris obèses et diabétiques (Um et al., 2004). Cependant, Copps et al ont montré en 2010, qu'un modèle de souris dans lequel la Ser³⁰⁷ était remplacée par une alanine (et donc non phosphorylable) présentait une résistance à l'insuline encore plus importante que les souris contrôles sous régime gras indiquant que la Ser³⁰⁷ est nécessaire pour maintenir une signalisation insuline normale. Parmi les autres sites de phosphorylation, on retrouve la Ser¹¹⁰¹ dont la phosphorylation peut être augmentée chez des souris db/db sous activation de la S6K1 (Tremblay et al., 2007) ainsi que la phosphorylation de la Ser⁶³⁶ (Ser⁶³² chez la souris) qui est augmentée dans des myotubes de patients atteints de DT2 sous activation des ERK (Bouzakri et al., 2003).

Inhibition de l'action de PI3K : déphosphorylation de ses substrats lipidiques

- **PTEN** (Phosphatase and Tensin homolog) est une lipide phosphatase catalysant la déphosphorylation de PIP_3 en $PI4,5P_2$. Le gène *PTEN* a d'abord été caractérisé comme étant un puissant suppresseur de tumeurs et est l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains (Li et al., 1997). Il a été rapporté que l'expression de PTEN est augmentée dans un modèle murin d'obésité et de diabète (souris db/db) (Hu et al., 2007). Ainsi, plusieurs groupes ont caractérisé l'effet sur la sensibilité à l'insuline d'une suppression de PTEN et que ce soit au niveau du foie, du tissu adipeux ou du muscle, cette délétion entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Stiles et al., 2004 ; Kurlawalla-Martinez et al., 2005 ; Wijesekara et al., 2005). De plus, bien que la suppression de PTEN au niveau du corps entier soit létale, les animaux avec une haploinsuffisance de PTEN montrent une amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi que de la tolérance au glucose (Wong et al., 2007). Chez l'humain, il a été montré que des individus avec une haploinsuffisance de PTEN (syndrome de Cowden) sont plus sensibles à l'insuline avec un risque diminué de DT2. Toutefois, de façon surprenante, cette meilleure sensibilité à l'insuline est associée à une obésité (Pal et al., 2012).

- **SHIP2** (SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 2) est une lipide phosphatase ubiquitaire catalysant la déphosphorylation de PIP_3 en $PI3,4P_2$ avec possiblement un rôle dans la signalisation insuline. En 2001, Clément et al. ont reporté que des souris délétées pour le gène *Inpp1* (codant pour la protéine SHIP2) présentaient une augmentation de la sensibilité à l'insuline, caractérisée par une sévère hypoglycémie néonatale associée à une mortalité périnatale. Ils se sont alors intéressés aux souris hétérozygotes pour cette mutation, qui présentaient une amélioration de la tolérance au glucose associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, montrant alors le rôle inhibiteur de SHIP2 dans la signalisation insuline. Cependant, les auteurs ont reporté en 2004 que leur construction induisait également la suppression d'un exon du gène *Phox2a* entraînant une protéine PHOX2A non fonctionnelle mettant ainsi un doute quant à l'effet de SHIP2 sur la sensibilité à l'insuline. En effet, le développement de nouveaux modèles utilisant deux autres constructions révèle que, bien que ces souris soient résistantes à l'obésité, dans les deux cas la délétion de SHIP2 n'a pas d'effet sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Sleeman et al., 2005 ; Dubois et al., 2012). Pourtant, des polymorphismes de SHIP2 sont retrouvés chez des patients avec un syndrome métabolique ou un diabète de type 2 (Kaisaki et al., 2004; Kagawa et al., 2005).

Ces différences d'effet pourraient peut-être s'expliquer par une dynamique différentielle des substrats lipidiques de PI3K selon les modèles utilisés. En effet, à la différence de PTEN qui déphosphoryle le PIP₃ en PI4,5P₂, SHIP2 le déphosphoryle en PI3,4P₂. Ainsi, le KO de SHIP2, s'il augmente les taux de PIP₃, entraîne également une diminution de PI3,4P₂ qui a été montrée pour favoriser la phosphorylation de AKT sur sa S⁴⁷³, ce qui pourrait contrecarrer les effets directs de la chute des taux de PIP₃ (Ma et al., 2008).

b. Facteurs environnementaux et systémiques

Un facteur très important dans la mise en place de l'insulino-résistance est l'environnement, où une prise alimentaire augmentée et une diminution de l'activité physique entraînent une surcharge pondérale aboutissant à une obésité. L'obésité est définie par l'OMS comme un excès de masse grasse qui entraîne des conséquences néfastes pour la santé. Cette obésité est associée à plusieurs caractéristiques comme la lipotoxicité et une inflammation chronique de bas bruit qui sont des causes très importantes de résistance à l'insuline.

- **La lipotoxicité** est une des caractéristiques du syndrome métabolique et se traduit par une accumulation ectopique de lipides dans les tissus. En effet, le tissu adipeux a une capacité d'expansibilité qui dépend des besoins de stockage. Cependant, une fois que la capacité de stockage du tissu est atteinte, les lipides qui n'ont pas pu être stockés se retrouvent dans la circulation et finissent par être stockés dans des tissus non adipeux, comme le foie, les muscles ou encore le cœur. Cette augmentation d'acides gras devient délétère pour les tissus, et provoque au niveau du foie une stéatose hépatique caractérisée par une augmentation de dépôts ectopiques provoquant inflammation et apoptose. La stéatose hépatique est la première étape du NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) qui peut dériver en NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis) une fois l'inflammation installée. Cependant, l'obésité n'est pas la seule cause de lipotoxicité, puisque la lipotrophie (situation avec une absence de tissu adipeux) entraîne également des dépôts ectopiques de lipides (Kim et al., 2000).

Plusieurs études ont montré que la stéatose hépatique pouvait être à l'origine de l'insulino-résistance hépatique. En effet, la concentration de DAG (Diacylglycérol) dans les gouttelettes lipidiques est très fortement corrélée avec l'insulino-résistance (Kumashiro et al., 2011; Magkos et al., 2012). Mécanistiquement, il a été proposé que l'augmentation de DAG active

l'isoforme ϵ de la protéine kinase C qui altère l'activation du récepteur à l'insuline (Samuel et al., 2004, 2007).

Au niveau du muscle squelettique, l'exposition chronique à de fortes concentrations d'acides gras saturés ou de DAG conduit à l'inhibition de la signalisation insuline à travers une inhibition de IRS-1 via une diminution de phosphorylation tyrosine (Dresner et al., 1999 ; Virkamaki et al., 2001 ; Szendroedi et al., 2014).

- **L'inflammation** est maintenant bien reconnue comme participant à la résistance à l'insuline. Il a d'abord été montré que des patients avec une infection aiguë présentaient une résistance à l'insuline (Yki-Järvinen et al., 1989), puis, dans les années 1990, Hotamisligil et al. ont montré pour la première fois le lien entre l'inflammation et la résistance à l'insuline. Dans cette étude, les auteurs montraient que des modèles animaux d'obésité et de diabète présentaient une augmentation de l'expression de l'ARNm de TNF- α , et que la neutralisation de ce dernier améliorait le transport de glucose en réponse à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993). De plus, des souris avec une inactivation de TNF- α ou des récepteurs de TNF- α montrent une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline sous régime gras (Uysal et al., 1997). Mécanistiquement, il a été montré que la stimulation de cellules CHO au TNF- α induit la phosphorylation inhibitrice de la sérine 307 sur IRS-1 par l'intermédiaire de JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Aguirre et al., 2000). De plus, le TNF- α et l'IL-6 ont également été montrés pour stimuler l'expression des SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) qui sont connus pour atténuer la capacité du récepteur à l'insuline de phosphoryler ses substrats comme les IRS (Emanuelli et al., 2000 ; Ueki et al., 2004). Les protéines SOCS peuvent également se lier aux protéines IRS et entraîner leur dégradation (Rui et al., 2002 ; Shi et al., 2006).

Depuis, est apparu le terme de « metaflammation » défini comme une inflammation chronique de bas bruit des cellules métaboliques en réponse à un excès de nutriments et d'énergie (Gregor and Hotamisligil, 2011).

Dès lors, une multitude d'études ont vu le jour, impliquant le TNF- α mais aussi d'autres cytokines et surtout, le rôle des macrophages et de cellules de l'immunité adaptative dans l'insulino-résistance induite par l'inflammation.

Les macrophages, acteurs clefs de l'insulino résistance

Il est largement établi que l'insulino-résistance s'accompagne d'un état pro-inflammatoire. Au-delà de cette corrélation, de nombreuses études ont démontré le lien de cause à effet entre l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et l'installation de l'insulino-résistance. Les macrophages jouent un rôle central dans ce processus.

La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires se fait par l'intermédiaire de la signalisation NF- κ B qui est la voie majeure impliquée en réponse à l'inflammation. La voie est déclenchée par activation des TLRs (Toll-Like Receptor) et des cytokines pro-inflammatoires comme TNF α et IL-1 qui vont activer le complexe IKK (I κ B kinase). IKK phosphoryle l'inhibiteur I κ B, entraînant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome, permettant ainsi au complexe p50/p65 d'entrer dans le noyau et de réguler l'expression des gènes pro-inflammatoires (Figure 12).

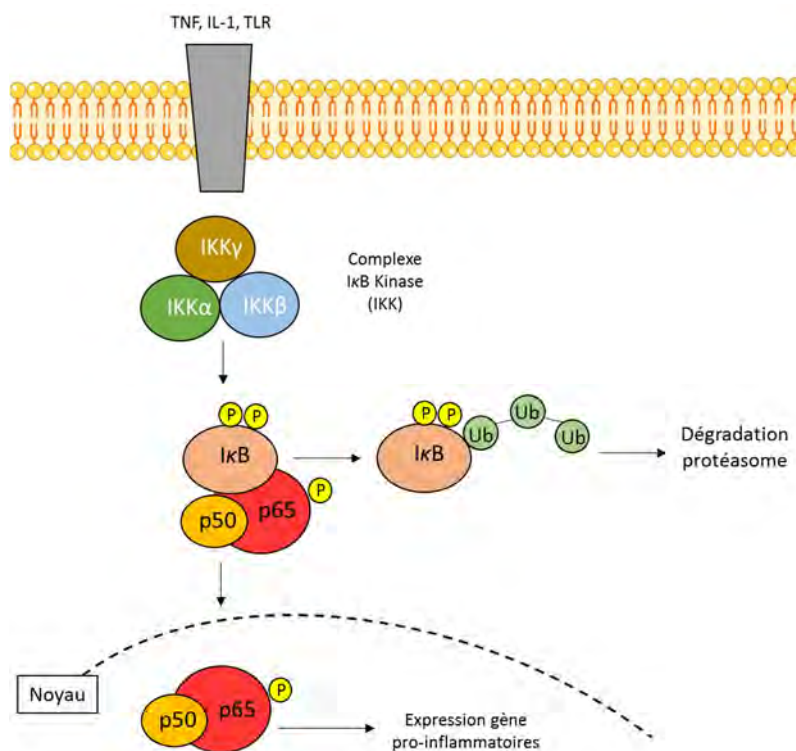


Figure 12 : Schéma simplifié de la voie canonique NF- κ B en réponse à l'inflammation

La liaison du ligand au récepteur induit le recrutement des IKK (I κ B kinase) qui en phosphorylant I κ B permet la translocation du complexe p50/p65 dans le noyau.

À noter qu'il existe une voie adaptative retrouvée dans l'immunité adaptative qui ne sera pas détaillée ici.

Cette signalisation a été montrée comme participant à l'insulino-résistance, puisque des souris délétées pour IKK (I κ B Kinase, kinase indispensable à l'activation de la signalisation NF- κ B) dans les cellules myéloïdes présentent une meilleure sensibilité à l'insuline et sont protégées contre l'insulino-résistance induite par un régime gras (Arkan et al., 2005).

Les macrophages sont souvent classés en deux catégories, à savoir les macrophages de type M1-like pro-inflammatoires et les macrophages de type M2-like anti-inflammatoires. Cependant, cette classification est à modérer *in vivo* puisque les macrophages ne sont pas seulement l'un ou l'autre, mais peuvent couvrir le spectre entier de pro-inflammatoires à anti-inflammatoires (Sica and Mantovani, 2012; Murray et al., 2014).

Le recrutement de macrophages dans les tissus se fait à travers diverses molécules chemo-attractantes comme par exemple MCP1 (Figure 13). En effet, il a été montré *in vitro* que le fait de traiter des adipocytes avec du TNF ou des acides gras libres induit une libération de MCP1 qui augmente le recrutement de macrophages (Patsouris et al., 2009). De plus, la délétion de CCR2 (C-C motif chemokine receptor 2, récepteur de MCP1) protège contre l'inflammation et l'insulino-résistance induite par l'obésité et entraîne l'expression de gène de type M2 (Lumeng et al., 2007). D'autres molécules ont également été caractérisées avec un effet chemo-attractant. C'est le cas du leucotriène LTB4, qui est présent en quantité plus importante dans le muscle, le foie et le tissu adipeux de souris obèses. Comme pour MCP1, la délétion du récepteur LTB4R induit une diminution du recrutement de macrophages et améliore la sensibilité à l'insuline (Li et al., 2015).

Les différentes populations de macrophages

- **Les macrophages des tissus adipeux (MTA)** s'accumulent pendant l'obésité pour atteindre jusqu'à 40% des cellules immunitaires de la fraction stroma-vasculaire dans des tissus adipeux de souris obèses (Lumeng et al., 2007). Ces MTA sont la source majeure de cytokines pro-inflammatoires pouvant causer une insulino-résistance locale et systémique (Xu et al., 2003). En effet, de nombreuses études montrent que chez des souris obèses, la suppression des macrophages du tissu adipeux à l'aide de clodronate induit une diminution importante de l'inflammation et une restauration de la sensibilité à l'insuline (Eguchi et al., 2012 ; Li et al., 2015, 2016).

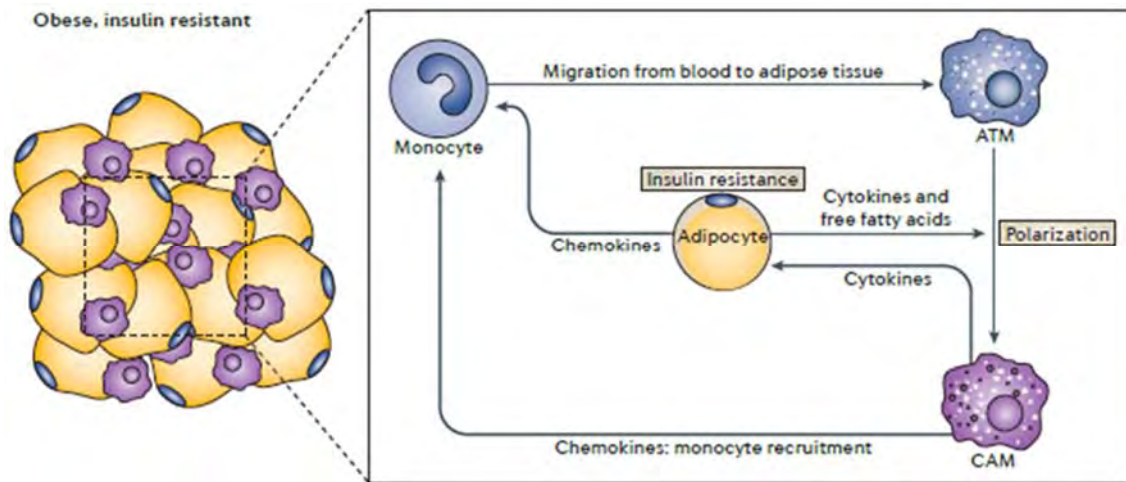


Figure 13 : Régulation de la sensibilité à l'insuline par les macrophages du tissu adipeux.

Les monocytes s'infiltrent dans le tissu adipeux et se différencient en macrophages pro-inflammatoires sécrétant des chemokines induisant le recrutement d'autres monocytes, et de cytokines altérant la sensibilité à l'insuline (Lackey and Olefsky, 2016).

- Les macrophages du foie** sont regroupés en deux catégories qui diffèrent selon leur fonction et leur origine embryologique : les macrophages hépatiques recrutés (MHR) et les cellules de Kupffer (CK). Les CK sont des macrophages résidents qui dérivent du sac vitellin et apparaissent dans le foie fœtal durant l'embryogénèse. Ces cellules ont la capacité de s'auto-renouveler (Gomez Perdiguero et al., 2015). De façon intéressante, en situation d'obésité, le nombre de CK reste inchangé mais leur état de polarisation varie, avec des CK M1-like, M2-like ou avec une polarisation intermédiaire (Wang et al., 2014). Les MHR sont des macrophages qui dérivent des monocytes (qui proviennent donc de la moelle osseuse) et ont comme origine embryologique les cellules souches hématopoïétiques (Gomez Perdiguero et al., 2015). À la différence des CK, les MHR sont augmentés dans l'obésité et sont hautement pro-inflammatoires avec une sécrétion importante de TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Morinaga et al., 2015). De plus, des expériences de co-cultures indiquent que le milieu conditionné de ces MRH peut directement induire une insulino-résistance des hépatocytes (Morinaga et al., 2015).

- Les macrophages du muscle** sont également augmentés dans l'obésité, polarisés vers un état pro-inflammatoire (Fink et al., 2014) et paraissent même être un évènement précoce dans l'installation de l'insulino-résistance (Boon et al., 2015). Ces macrophages sont localisés à des sites spécifiques : il existe des dépôts adipeux (triglycérides) entre les myocytes, appelés tissu adipeux intermyocellulaire (TAIM). Comme dans le tissu adipeux, ces dépôts adipeux s'expandent avec l'obésité et accumulent des macrophages pro-inflammatoires (Khan et al.,

2015). Ces macrophages sécrètent les mêmes cytokines que dans les autres tissus, comme le TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP1. Ces cytokines, et en particulier le TNF- α , ont été montrées pour diminuer la sensibilité à l'insuline des myocytes (Austin et al., 2008). Cependant, les études sur le muscle laissent perplexes quant au rôle de IL-6, une cytokine pro-inflammatoire reconnue pour promouvoir la résistance à l'insuline dans le foie (Senn et al., 2002). En effet, chez le rat, l'obésité est associée à une diminution de l'expression de IL-6 dans le muscle squelettique, et des myocytes de patients obèses atteints de DT2 montrent une expression de IL-6 plus basse que ceux de patients contrôles (Wu and Ballantyne, 2017).

Inflammation et communication inter-organe

La complexité de la relation entre inflammation et résistance à l'insuline est également due à une communication inter-organes. En effet, en plus du lien entre inflammation et insulino-résistance tissu-spécifique, plusieurs études montrent que la modulation de l'inflammation dans un tissu donné, par le biais de modèles KO tissu-spécifique, améliore la sensibilité à l'insuline dans d'autres tissus (Li et al., 2011). La communication inter-organes est médiée par plusieurs facteurs provenant d'un tissu et voyageant à travers la circulation pour influencer d'autres organes comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) ou les molécules chemo-attractantes (MCP1, LTB4). Récemment, d'autres molécules ont été étudiées, comme la galectine-3, une lectine sécrétée par les macrophages et qui a été montré comme étant augmentée en situation d'obésité chez la souris et l'humain (Li et al., 2016). Les auteurs ont montré que l'augmentation de galectine-3 participe à l'insulino-résistance du foie, du muscle squelettique ainsi que du tissu adipeux. Encore plus récemment, il a été découvert que les macrophages du tissu adipeux peuvent sécréter des exosomes contenant des miARN qui entrent dans la circulation pour aller agir sur d'autres tissus et moduler la sensibilité à l'insuline (Thomou et al., 2017). Ainsi, de par la complexité de leur sécrétion, les macrophages sont des acteurs clés de la résistance à l'insuline médiée par l'inflammation.

Cependant, les macrophages ne sont pas les seules cellules immunitaires impliquées dans la résistance à l'insuline, puisque plusieurs études montrent l'implication des cellules de l'immunité adaptative (pour une revue récente, voir McLaughlin et al., 2017).

3. Conséquences de l'insulino-résistance

Étant donné l'importance des voies régulées par l'insuline, l'insulino-résistance a un impact très important sur le métabolisme glucidique mais également sur le métabolisme lipidique.

a. Métabolisme glucidique

Nous avons vu précédemment que l'insuline est un régulateur important du métabolisme glucidique. La résistance à l'insuline induit différentes dérégulations selon le tissu considéré, l'ensemble aboutissant à l'hyperglycémie.

Au niveau du foie, cette résistance empêche l'insuline de diminuer la production hépatique de glucose principalement via la néoglucogenèse. En effet, nous avons vu que l'insuline, en activant la voie PI3K, entraîne l'inhibition de la néoglucogenèse via la phosphorylation inhibitrice de FOXO1. Or en situation d'insulino-résistance, la voie PI3K étant moins activée, la phosphorylation de FOXO1 est diminuée levant ainsi le frein de l'insuline sur la suppression de la néoglucogenèse (Dong et al., 2008). De plus, la résistance à l'insuline induit une augmentation de la glycolyse hépatique (Boden et al., 2002).

Au niveau du muscle, la résistance à l'insuline a un effet double, car en plus de diminuer l'entrée de glucose dans les cellules via GLUT4, elle entraîne une diminution de stockage du glucose via une diminution de la glycogénogénèse.

Au niveau du tissu adipeux, l'insulino-résistance diminue l'entrée de glucose dans la cellule comme dans le muscle.

Ainsi, de par les effets de l'insuline sur les voies métaboliques du glucose, l'insulino-résistance provoque une hyperglycémie.

b. Métabolisme lipidique

En plus de ces effets sur le métabolisme glucidique, l'insulino-résistance a un impact très important au niveau du métabolisme lipidique, entraînant une augmentation de la concentration d'acides gras libres dans le sang, ce qui favorise la lipotoxicité et dégrade, comme nous le verrons plus loin, la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques.

Cette augmentation de libération d'acides gras passe par une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux. Dans cette voie, l'adipocyte hydrolyse les triglycérides en acyl-CoA,

impliquant plusieurs enzymes, dont la lipase hormono-sensible (LHS). La LHS est stimulée par l'adrénaline, mais elle est également inhibée de façon indirecte par l'insuline. Lors de l'insulino-résistance, l'insuline ne peut plus exercer son effet inhibiteur sur la LHS, entraînant ainsi une augmentation de la libération d'acides gras (Girousse et al., 2013).

En plus de son rôle dans la lipolyse, l'insuline favorise la lipogénèse *de novo* en activant le facteur de transcription SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) qui stimule l'expression de gènes lipogéniques incluant FAS et ACC. Cependant, dans l'insulino-résistance, l'insuline maintient son action stimulatrice sur SREBP1c par un mécanisme encore inconnu et entraîne une augmentation de l'expression de FAS et de ACC dans le foie aboutissant à une augmentation de la lipogénèse *de novo* et contribuant ainsi à la lipotoxicité (Pettinelli et al., 2009) (Figure 14).

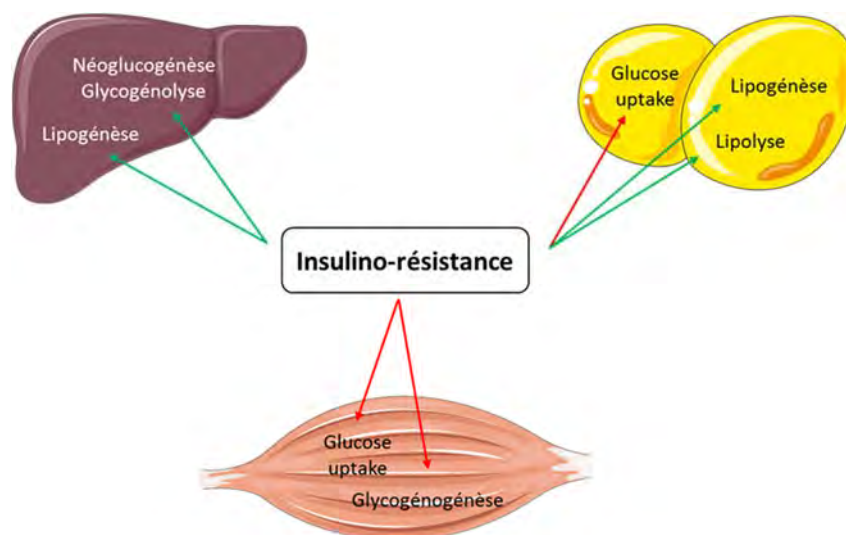


Figure 14 : Conséquence de l'insulino-résistance sur le métabolisme glucidique et lipidique

L'insulino-résistance entraîne des altérations du métabolisme glucidique et lipidique au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux.

4. Aspects thérapeutiques

Étant données les conséquences de l'insulino-résistance et son fort risque d'évolution en DT2, il existe plusieurs thérapies qui ont été mises au point avec une efficacité plus ou moins variable. L'obésité est fortement corrélée à l'insulino-résistance et la perte de poids est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Ainsi, les méthodes nutritionnelles et comportementales permettant de limiter l'apport en énergie et d'augmenter l'activité ont

largement fait leur preuve pour améliorer la sensibilité à l'insuline. Il existe également plusieurs méthodes chirurgicales permettant la perte de poids comme notamment le bypass gastrique. Ces chirurgies bariatriques peuvent être soit une dérivation gastrique (Roux en Y), soit une dérivation bilio-pancréatique associant une restriction gastrique et une dérivation des sécrétions de la bile et du pancréas favorisant une malabsorption. Cette dernière méthode est la plus efficace en termes de perte de poids. Cependant, l'approche nutritionnelle n'est pas totalement efficace et la chirurgie est une méthode très invasive utilisée seulement pour les cas extrêmes d'obésité. De plus, plusieurs études montrent qu'après une chirurgie bariatrique les patients reprennent du poids sur le long terme (pour revue récente, voir Karmali et al., 2013). C'est pourquoi, les cibles pharmacologiques sont nécessaires.

a. Cibles pharmacologiques

Il existe plusieurs agents pharmacologiques comme la metformin, qui est largement utilisée comme traitement anti-diabétique mais également en prévention chez des personnes pré-diabétiques (DeFronzo et al., 2015). Il existe également d'autres agents thérapeutiques comme les thiazolidinediones, les inhibiteurs de sodium/glucose cotransporteur 2 (SGLT2), les analogues du glucagon-like peptide 1 (GLP-1) ainsi que des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4).

La metformin est un activateur de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui, en supprimant la production hépatique de glucose, réduit la glycémie à jeun et l'HbA1c. En effet, l'AMPK diminue la néoglucogénèse en inhibant plusieurs facteurs de transcription comme CREB qui stimulent l'expression d'enzymes néoglucogéniques incluant la PEPCK et la G-6-Pase (Koo et al., 2005). De plus, l'AMPK phosphoryle l'histone H2a déacétylase l'excluant du noyau ce qui a pour rôle de désactiver FOXO1 (Mihaylova et al., 2011). La metformin a été montrée pour diminuer l'HbA1c chez des patients atteints de DT2 (Ito et al., 2010). De plus, Knowler et al. ont montré en 2002 que l'utilisation de la metformin chez des patients pré-diabétiques diminue le risque d'apparition de DT2 et que ces patients présentent une diminution de la glycémie à jeun et une diminution de l'HbA1c (Knowler et al., 2002). Cependant, la metformin présente des effets secondaires et en particulier des intolérances gastrointestinales (Florez et al., 2010) associant douleur abdominale, flatulence et diarrhée, et a été montrée comme augmentant le risque de déficience en vitamine B12 (de Jager et al., 2010).

Les Thiazolidinediones (TZD) sont des agonistes de PPAR γ . La liaison des TZD à PPAR γ résulte en une transactivation ou une transrépression des gènes cibles de PPAR γ notamment une diminution de l'expression de gènes intervenant dans la voie NF- κ B diminuant ainsi l'inflammation. De plus, les TZD sont connus pour promouvoir l'uptake des acides gras et leur stockage dans le tissu adipeux, empêchant leur accumulation dans d'autres organes comme le foie et les muscles (Nanjan et al., 2018), et augmentent le glucose uptake au niveau des muscles (Park et al., 1998). Les TZD sont actuellement le seul traitement permettant d'augmenter la sensibilité à l'insuline, notamment chez des patients DT2 (Miyazaki et al., 2002). De plus, les TZD jouent un rôle protecteur au niveau de la cellule β permettant une meilleure sécrétion d'insuline dans un modèle de pré-diabète (Higa et al., 1999) mais également chez les patients DT2 (Gastaldelli et al., 2007). Cependant, les TZD ont également d'importants effets secondaires avec une sévérité plus ou moins élevée. Le traitement avec les TZD est associé avec une augmentation du risque de fractures osseuses (Billington et al., 2015), du risque d'arrêt cardiaque (Hernandez et al., 2011) et de cancer, même si les études divergent sur ce sujet (Rizos et al., 2016). Etant donné l'importance des effets secondaires liés aux TZD, leur autorisation de mise sur le marché est retirée en France depuis 2011.

Bien que ces deux traitements soient efficaces dans la prévention et le traitement du DT2, ils présentent de nombreux effets secondaires ainsi que des contre-indications. C'est pourquoi il y a nécessité de trouver d'autres cibles thérapeutiques.

b. Cibles futures

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inflammation joue un rôle majeur dans l'insulino-résistance et représente une cible thérapeutique de choix. Plusieurs études ont testé l'effet de composés anti-inflammatoires et en particulier des anticorps anti TNF- α . Bien que l'administration d'anticorps anti- TNF- α soit efficace chez la souris diabétique (Hotamisligil et al., 1993), l'impact chez l'humain est plus discutable. En effet, plusieurs études ne montrent pas d'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des patients avec un syndrome métabolique traités par des anticorps anti- TNF- α (Dominguez et al., 2005; Wascher et al., 2011).

Ces études mettent le doigt sur le fait que le TNF- α n'est pas la seule cytokine impliquée dans l'insulino-résistance liée à l'inflammation et que d'autres cytokines, ou d'autres molécules

pro-inflammatoires sont également impliquées. C'est pourquoi de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes précis impliqués dans la mise en place de l'insulino-résistance et pour trouver des agents thérapeutiques plus spécifiques.

En conclusion, l'insulino-résistance est un mécanisme multi-causal avec de grandes répercussions sur le métabolisme glucidique et lipidique pouvant aboutir au DT2. Nous avons vu que l'inflammation chronique de bas bruit participe fortement à l'insulino-résistance mais le mécanisme déclenchant cette inflammation est encore inconnu.

Afin de diminuer le nombre de patients souffrant de DT2, plusieurs agents thérapeutiques ont été développés avec des efficacités plus ou moins variables, et le traitement avec des anticorps neutralisants ayant peu d'effet suggère qu'il faudrait identifier une cible en amont.

Partie 2 : SHP2, une tyrosine phosphatase aux multiples facettes

SHP2 est une protéine ubiquitaire appartenant à la famille des tyrosine phosphatases et est très conservée à travers les espèces. Elle est décrite pour son rôle de régulation dans la transduction du signal de plusieurs voies de signalisation en réponse à une grande variété d'agonistes, et contrairement aux autres phosphatases, est connue pour avoir des effets activateurs. Ces dernières années, le rôle crucial de SHP2 dans le développement a été mis en évidence par le biais de plusieurs KO tissus spécifiques, qui ont également révélé son implication dans régulation du métabolisme, notamment de la sensibilité à l'insuline.

Nous étudierons ici quelques généralités concernant sa structure, son activité et sa régulation, puis décrirons ses rôles au sein des voies de signalisation et dans différentes fonctions biologiques.

I. Structure et activité

1. Généralités

SHP2 (Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 2) est une protéine tyrosine phosphatase ubiquitaire qui est codée par le gène *PTPN11* (Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor 11) situé sur la région chromosomique 12q24. SHP2 fait partie de la superfamille des PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) qui est très conservée à travers les espèces. Les PTP partagent en commun un motif signature C(X)₅R situé au cœur de leur site catalytique (Andersen et al., 2001). Les PTPs « classiques » contiennent un domaine catalytique d'environ 240 acides aminés qui leur confère une spécificité absolue pour l'hydrolyse/la déphosphorylation des phosphotyrosines. SHP2 forme avec SHP1, d'expression restreinte à la lignée hématopoïétique, la sous famille des PTPs classiques non transmembranaires à domaines SH2 (Neel, 1993). SHP2 est une protéine cytoplasmique, mais certaines études montrent qu'elle est également présente au niveau nucléaire (Chughtai et al., 2002; Jakob et al., 2008) et peut être transloquée au niveau de la mitochondrie (Salvi and Toninello, 2004; Guo et al., 2017).

2. Structure et activité catalytique

SHP2 est constituée de deux domaines SH2 (Src Homology region 2) au niveau N-terminal (N-SH2 et C-SH2), d'un domaine catalytique PTP central et d'une queue C-terminale (Figure 15.A).

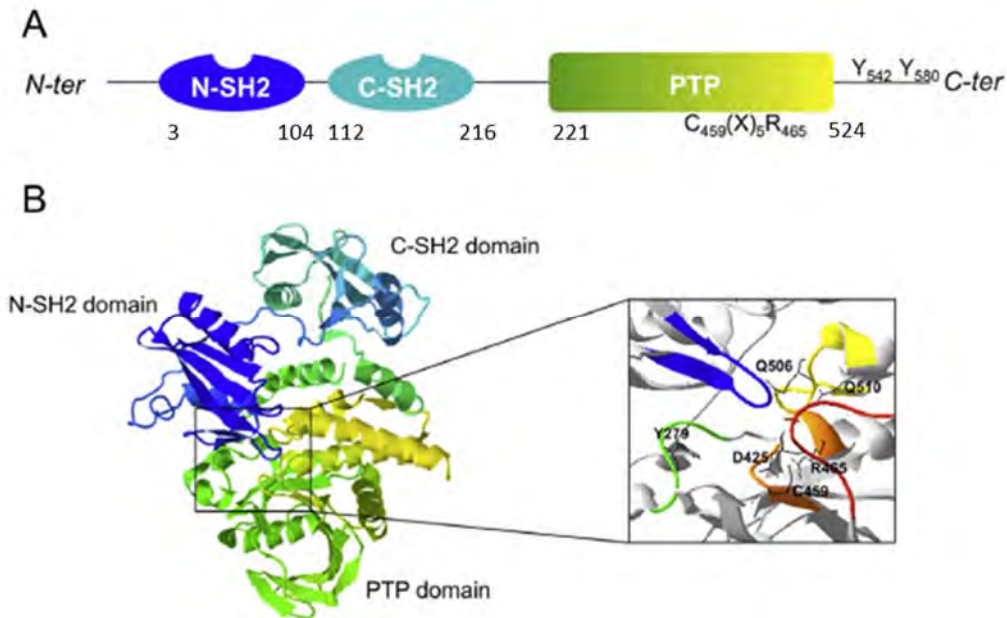


Figure 15 : Structure de la protéine SHP2

(A) Organisation structurale de SHP2 montrant ses domaines SH2, son domaine catalytique PTP et ses résidus phosphotyrosines régulateurs. (B) Structure 3D de SHP2 montrant les différents domaines et boucles impliqués dans l'activité de SHP2 et sa régulation (Tajan et al., 2015).

Les domaines SH2 de SHP2 reconnaissent spécifiquement certains motifs contenant une tyrosine phosphorylée, lui permettant d'interagir avec ses partenaires lorsqu'ils sont phosphorylés. Ainsi, SHP2 peut interagir avec des récepteurs membranaires (RTKs, récepteurs aux cytokines) et des protéines adaptatrices comme IRS ou Gab1.

Le domaine PTP est lui composé de quatre boucles : PTP, pTYR, WPD, Q (Figure 15.B) qui forment la poche du site actif et jouent des rôles spécifiques dans l'activité de SHP2. Dans la boucle pTYR, on retrouve la tyrosine 279 (Y279) qui définit la profondeur de la poche catalytique et contribue ainsi à la sélection de substrat. La boucle PTP porte le motif de signature des PTP (C459 (X)₅ R465) qui contient les résidus clés pour la catalyse, en particulier la cystéine. En effet, la mutation de cette cystéine annihile l'activité catalytique de l'enzyme, et son état d'oxydo-réduction représente un mécanisme important de régulation (voir ci-

dessous). La boucle WPD porte un aspartate en position 425 (N425) qui joue un rôle de catalyseur en apportant un proton nécessaire à la libération du substrat du site catalytique. La boucle Q contient une glutamine en position 506 (Q506) qui est nécessaire pour la régénération de l'enzyme.

Le rôle de SHP2 est de déphosphoryler des substrats, et le mécanisme de catalyse se fait en deux étapes : la déphosphorylation du résidu tyrosine et la régénération de l'enzyme. La déphosphorylation du résidu tyrosine commence par l'attaque nucléophile par la cystéine C459 provoquant un changement conformationnel de l'enzyme et positionnant la boucle WPD au niveau de la tyrosine phosphorylée. L'arginine 465 du motif PTP stabilise le complexe enzyme-substrat puis le groupement phosphoryl est transféré sur la C459. La régénération de l'enzyme fait intervenir la Q506 et la N425 et permettent la libération du phosphate inorganique et le retour de l'enzyme à son état basal (Barford and Neel, 1998; Denu and Dixon, 1998).

La queue C-terminale porte des sites de phosphorylations sérine et tyrosine ainsi qu'un domaine riche en proline. On y retrouve deux résidus tyrosines (Y542 et Y580) qui peuvent être phosphorylés en réponse à certains facteurs de croissance comme le PDGF ou le FGF, créant ainsi des sites de liaison pour des protéines adaptatrices comme GRB2 (Araki et al., 2003).

3. Régulation de l'activité

La résolution de la structure cristallographique de SHP2 accompagnée de validations biochimiques ont permis d'élucider le mode d'activation de SHP2 (Barford and Neel, 1998; Hof et al., 1998). A l'état basal, le domaine N-SH2 interagit avec le domaine PTP et s'insère dans la poche catalytique empêchant ainsi l'accès des substrats au site catalytique. Cette interaction maintient la protéine en conformation fermée, dans un état auto-inhibée. La stimulation par des facteurs de croissance ou des hormones permet le recrutement de SHP2 au niveau de protéines adaptatrices via ses domaines N-SH2 et C-SH2. Cette liaison entraîne un changement conformationnel de la protéine aboutissant à la rupture de la liaison entre le domaine N-SH2 et le domaine PTP libérant ainsi le site catalytique. La phosphatase est alors en conformation ouverte et peut accueillir ses substrats au niveau de son site catalytique et exercer son activité phosphatase sur les résidus phosphotyrosines (Figure 16).

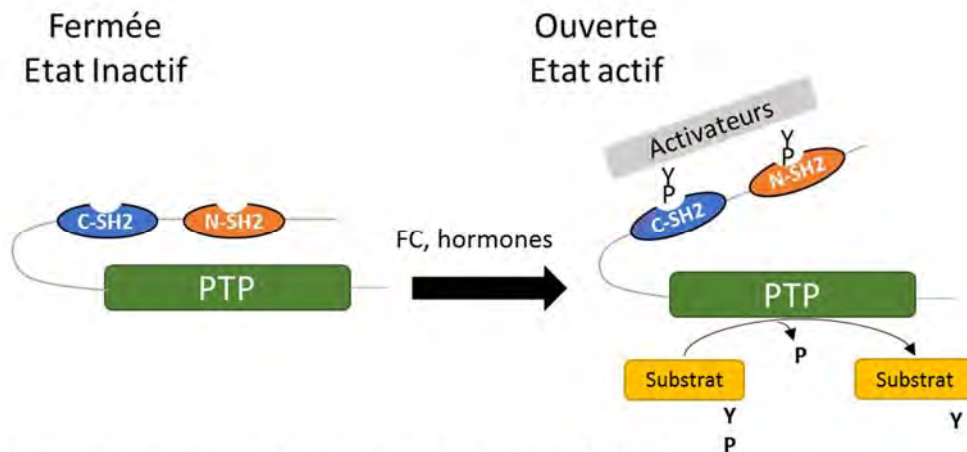


Figure 16 : Représentation schématique de l'activation de SHP2

Suite à l'interaction des domaines N-SH2 et C-SH2 avec un activateur phosphorylé sur tyrosines, la protéine s'ouvre, devient active et réalise son activité catalytique en déphosphorylant son substrat.

Ce « switch » de conformation permet l'activation de SHP2 uniquement lorsqu'elle est recrutée au niveau de protéines adaptatrices. Ainsi à l'état basal, l'activité de SHP2 est très faible, et suite à son activation, son activité augmente d'un facteur 10 (Lechleider et al., 1993).

En plus de son activation par recrutement, plusieurs études font état de la régulation de l'activité de SHP2 par phosphorylation des résidus tyrosines Y542 et Y580 au niveau de la queue C-terminale (Lu et al., 2001; Araki et al., 2003). En effet, le remplacement de ces tyrosines par des phenylalanines stimule l'activité catalytique de SHP2 sous certains facteurs de croissance (Araki et al., 2003). De plus, il a été proposé que le recrutement de GRB2 sur ces tyrosines pouvait moduler leur interaction avec les domaines SH2 de SHP2 (Sun et al., 2013). Cependant, le rôle de ces phosphorylations sur l'activité de SHP2 est encore mal compris.

Il a également été décrit des mécanismes inhibiteurs notamment via les ROS (Reactive Oxygen Species) qui oxydent de façon réversible la cystéine catalytique contenue dans le motif phosphatase (Jang et al., 2014). De plus, SHP2 possède sur sa queue C-terminale des résidus sérines et thréonines qui, une fois phosphorylés en réponse à l'EGF (Epidermal Growth Factor), entraînent une inhibition catalytique de la phosphatase (Peraldi et al., 1994).

II. Rôle dans la signalisation cellulaire

SHP2 est recrutée en réponse à de nombreuses hormones, cytokines ou facteurs de croissance et a été montrée pour être impliquée dans plusieurs voies de signalisation faisant intervenir des événements de phosphorylation sur tyrosine, comme les voies RAS/MAPK, PI3K/AKT ou

JAK/STAT (Noguchi et al., 1994 ; You et al., 1999 ; Zhang et al., 2002 ; Chen et al., 2003 ; Neel et al., 2003 ; Edouard et al., 2010). À la différence des PTPs classiques qui sont généralement vues comme des régulateurs négatifs du signal, SHP2 a plutôt une fonction positive.

1. Rôle de SHP2 dans la voie MAPK

La fonction la mieux établie de SHP2 est de promouvoir la voie RAS/MAPK en réponse à de nombreux agonistes. En effet, en aval de plusieurs RTK, SHP2 est nécessaire pour maintenir l'activation des MAPK et, dans certains cas, leur activation est même inexistante en l'absence de SHP2 (Noguchi et al., 1994; Neel et al., 2003; Dance et al., 2008). Le rôle de SHP2 dans l'activation des MAPK est si important que des mutations activatrices de SHP2 induisent une hyperactivation de la voie RAS/MAPK et sont à l'origine de maladies humaines (voir Partie III).

Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette activation sont encore mal compris et plusieurs hypothèses ont été émises.

La première hypothèse émise est que SHP2 serait, via ses résidus Y542 et Y580 phosphorylés, une protéine adaptatrice pour le complexe GRB2/SOS permettant son recrutement en réponse à plusieurs agonistes, en particulier le PDGF (Bennett et al., 1994; Vogel and Ullrich, 1996). Ainsi, le recrutement de SHP2 au récepteur du PDGF permettrait celui du complexe GRB2/SOS induisant ainsi l'activation de RAS. Cependant, cette hypothèse est controversée puisque SHP2 n'est pas phosphorylée en réponse à l'EGF ou l'IGF1, et suggère ainsi que l'effet promoteur de SHP2 sur la voie RAS/MAPK soit peut-être indépendant de sa fonction adaptatrice (Araki et al., 2003).

D'autres hypothèses ont été émises et impliquent l'activité catalytique de SHP2 dans la régulation de la voie RAS/MAPK. En effet, plusieurs études montrent que l'expression de mutants catalytiquement inactifs de SHP2 supprime l'effet promoteur de la phosphatase sur la voie RAS/MAPK induit par plusieurs facteurs de croissances et cytokines (Noguchi et al., 1994 ; Deb et al., 1998 ; Maroun et al., 2000) (Figure 17). Ainsi, plusieurs protéines ont été impliquées dans cette régulation, notamment :

- **SPROUTY** : cette protéine est bien connue pour inhiber la voie RAS/MAPK en réponse à plusieurs facteurs de croissance (Masoumi-Moghaddam et al., 2014). Ainsi, en réponse à divers facteurs de croissance, la phosphorylation de SPROUTY entraînerait sa liaison à GRB2,

empêchant ainsi l'interaction du complexe GRB2/SOS nécessaire à l'activation de RAS (Hanafusa et al., 2002). De façon intéressante, SHP2 a été montrée pour déphosphoryler SPROUTY à la fois *in vitro* et *in vivo* entraînant ainsi la levée d'inhibition de SPROUTY sur l'interaction entre GRB2 et SOS et sur l'activation des MAPK (Hanafusa et al., 2004).

- **RASGAP** : RAS est négativement régulée par des GAPs dont fait partie p120-RASGAP. Il a été montré que SHP2 favorisait l'activation de RAS en déphosphorylant les sites de recrutement de RASGAP au niveau du récepteur à l'EGF excluant ainsi RASGAP du complexe de signalisation (Cleghon et al., 1998; Agazie and Hayman, 2003). De plus, il a également été montré que SHP2 déphosphoryle les sites de recrutement de RASGAP au niveau de la protéine adaptatrice GAB1 (GRB2-associated binder-1) en réponse à l'EGF ou à l'hormone de croissance (Montagner et al., 2005; Bard-Chapeau et al., 2006; Serra-Nedelec et al., 2012). Ainsi, que ce soit par l'intermédiaire d'un récepteur ou de protéines adaptatrices, SHP2 stimule l'activation de RAS en excluant la protéine inhibitrice RASGAP du complexe de signalisation.

- **RAS** : des travaux récents ont identifiés que RAS elle-même pouvait être phosphorylée sur sa tyrosine Y32 par les kinases SRC, et que cette phosphorylation favorise son interaction avec RASGAP, promouvant ainsi son retour à l'état GDP lié, et empêche son interaction avec RAF. Or cette étude montre également que SHP2 déphosphoryle spécifiquement ce résidu, maintenant ainsi RAS dans son état activé et permettant son action activatrice sur RAF (Bunda et al., 2015)

- **SRC kinases** : ces protéines cytosoliques sont impliquées dans la signalisation de nombreux RTKs pouvant réguler la voie RAS/MAPK (Bromann et al., 2004; Kim et al., 2009). SHP2 pourrait agir en amont des SRC pour promouvoir l'activation des MAPK (Yang et al., 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour savoir comment SHP2 active SRC. En effet, SRC est inhibée par phosphorylation sur sa tyrosine 527 par la kinase CSK (C-terminal SRC Kinase), qui est elle-même recrutée via les protéines adaptatrices Paxilline et Cbp/PAG. Il a été montré qu'en réponse à l'EGF, le recrutement de SHP2 sur GAB1 conduit à la déphosphorylation de la Paxilline sur ces sites de recrutement pour CSK, qui est alors exclue du complexe de signalisation et lève son effet inhibiteur sur SRC. Ainsi, SRC reste activée et continue de promouvoir l'activation de RAS/MAPK (Ren et al., 2004). Un autre mécanisme proposé est que SHP2 induise une déphosphorylation de Cbp/PAG diminuant l'accès de CSK

au complexe de signalisation et donc à SRC. De manière générale, SHP2 favoriserait donc l'activation de SRC en déphosphorylant les sites de recrutement de son inhibiteur CSK (Zhang et al., 2004).

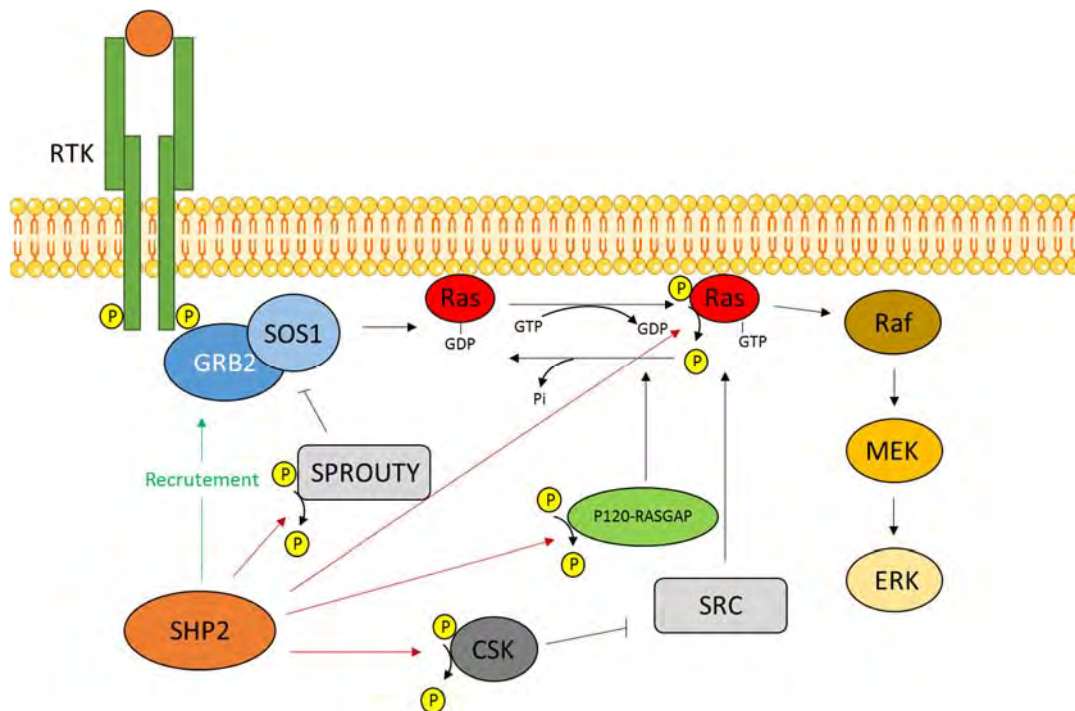


Figure 17 : Rôle de SHP2 dans la voie RAS/MAPK

SHP2 active la voie RAS/MAPK en déphosphorylant des inhibiteurs de la voie comme SPROUTY, P120-RASGAP, CSK.

2. Rôle de SHP2 dans la voie PI3K

SHP2 régule l'activation de la voie PI3K mais son rôle est encore mal compris et a l'air dépendant de l'agoniste utilisé. En effet, il a été montré que dans un même type cellulaire, SHP2 inhibe l'activation d'AKT en réponse à l'EGF alors qu'elle stimule son activation en réponse au PDGF ou à l'IGF-1 (Zhang et al., 2002). D'un point de vue mécanistique, l'effet de SHP2 sur l'activation d'AKT en réponse à l'EGF serait dû aux déphosphorylations des sites de recrutement de la sous-unité p85 sur la protéine adaptatrice GAB1 diminuant le recrutement de la PI3K (Zhang et al., 2002 ; Edouard et al., 2010).

En réponse à l'insuline, plusieurs études montrent que SHP2 s'associe au récepteur de l'insuline (Rocchi et al., 1996) mais également au niveau de protéines adaptatrices comme IRS-

1 (Case et al., 1994; Myers et al., 1998). IRS-1 possède des résidus tyrosines (1172 et 1222) pouvant servir de point d'ancrage à SHP2 via ses domaines SH2 (Case et al., 1994). Cette association a également été montrée *in vivo* (Lima et al., 2002). Cependant, l'effet de SHP2 sur la voie PI3K est encore controversé. En effet, certains auteurs émettent l'hypothèse que SHP2 améliore la signalisation PI3K/AKT sous insuline (Ugi et al., 1996). Dans cette étude, l'expression d'un mutant de SHP2 délété de son domaine phosphatase, dans des fibroblastes de rat surexprimant le récepteur humain de l'insuline, diminue l'activité de la PI3K sous stimulation par l'insuline. Cet effet est corrélé à une diminution de la phosphorylation de IRS-1 suggérant que SHP2 potentialise par un mécanisme indirect la phosphorylation de IRS-1 et exerce un effet stimulateur sur l'activation de PI3K. Cependant d'autres auteurs attribuent à SHP2 un rôle négatif dans la voie PI3K/AKT. En effet, l'expression d'une forme mutée de IRS-1 sur les sites d'ancrage de SHP2 (avec deux résidus phénylalanines à la place de résidus tyrosines) empêche le recrutement de SHP2 sur IRS-1, induisant ainsi une hyperphosphorylation globale de IRS-1 et une activation augmentée de PI3K dans des cellules 32D (Myers et al., 1998). Ceci suggère que SHP2 est recrutée au niveau de IRS-1 et déphosphoryle certains résidus tyrosines empêchant le recrutement de la PI3K et son activation. De plus, dans des 3T3-L1, la surexpression d'un mutant de SHP2 catalytiquement inactif augmente la phosphorylation de IRS-1 et le recrutement de la PI3K sous stimulation par l'insuline, alors que la surexpression d'une forme sauvage de SHP2 a l'effet inverse (Ouwens et al., 2001).

3. Rôle de SHP2 dans la voie JAK/STAT

De nombreuses études font état d'un lien entre SHP2 et la voie JAK/STAT. En effet, il a été montré que SHP2 régule négativement la voie JAK/STAT1 sous stimulation par de l'IFN γ ou IFN α dans des fibroblastes murins (You et al., 1999). Plus spécifiquement, la phosphorylation Y701 de STAT1 est prolongée dans des cellules délétées de SHP2 sous stimulation par de l'IFN γ (Wu et al., 2002). Un mutant catalytiquement actif de SHP2 a été montré pour déphosphoryler STAT3 au niveau de la tyrosine 705 sous stimulation par l'EGF ou le GM-CSF (Zhang et al., 2009). De plus, le KO neuronal de SHP2 provoque une hyperactivation de la voie JAK2/STAT3 (Zhang et al., 2004). STAT5 a également été identifiée comme un substrat direct de SHP2 (Chen et al., 2003).

4. Fonctions sans signalisation

SHP2 a été localisée dans le noyau (Tsutsumi et al., 2013) ainsi que dans la mitochondrie, et de récentes études montrent que l'expression de mutants de SHP2 catalytiquement hyperactifs induit une augmentation de la respiration mitochondriale et une surproduction de ROS (Salvi and Toninello, 2004). Ainsi, SHP2 pourrait déclencher une activité de découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale et/ou altérer l'activité de la pompe à proton au niveau des complexes OxPhos. En effet, Zheng et al., ont montré que l'expression de mutants de SHP2 hyperactifs réduisent le ratio ADP:O₂ associé à la diminution de potentiel de membrane. Cependant, le rôle précis de SHP2 sur la production d'ATP et sur l'expression et l'activité d'enzymes mitochondriales n'est pas encore établi (Xu et al., 2003; Lee et al., 2010; Zheng et al., 2013). Il a également été rapporté que SHP2 pouvait déclencher la fusion mitochondriale ce qui pourrait également promouvoir le métabolisme énergétique des mitochondries (Duarte et al., 2012).

III. Implication de SHP2 dans le développement

Il est connu depuis de nombreuses années que SHP2 a un rôle indispensable dans la prolifération, sa perte de fonction ayant un impact majeur dans de multiples lignées cellulaires. En conséquence, que ce soit chez la drosophile, chez *Caenorhabditis elegans* ou chez le Xénope, SHP2 est requise pour le développement de l'organisme (Perkins et al., 1992; Tang et al., 1995; Gutch et al., 1998). Comme nous allons le voir, le rôle clé de SHP2 dans le développement est aussi présent chez la souris.

1. Invalidation totale

À la fin des années 90, une première souris délétée de l'exon 3 codant pour le domaine N-terminal de SHP2 et aboutissant à une forme tronquée de la protéine a été générée (Saxton et al., 1997). Cette délétion a révélé un rôle fondamental de SHP2 en période prénatale, puisque les auteurs ont montré que les souris knock out ne sont pas viables en raison d'une létalité *in utero* au stade de la gastrulation. Plus tard, une autre construction a été générée dans laquelle les auteurs ont supprimé l'exon 2 de SHP2, induisant une perte quasi totale de l'expression de SHP2, et ont découvert que cette délétion entraîne une létalité encore plus précoce que la délétion de l'exon 3 (Yang et al., 2006). Cette létalité est associée à une

apoptose rapide des cellules trophoblastiques et à une incapacité à produire les cellules souches trophoblastiques. À l'appui de cette observation, SHP2 a été montrée comme étant nécessaire dans le processus de différenciation de cellules souches murines mais également humaines. En effet, la délétion de SHP2 dans des lignées murines ou son knockdown par des siARN dans des lignées humaines inhibe la différenciation des cellules souches vers les trois feuilletts embryonnaires, expliquant ainsi l'impact de l'inactivation de SHP2 dès les premiers stades de développement (Wu et al., 2009)

Étant donnée l'implication de SHP2 dans le développement, un modèle murin inducible de délétion de SHP2 a été généré (Bauler et al., 2011). Cependant, même à l'âge adulte, l'inactivation systémique de SHP2 induit 90% de létalité huit semaines après l'induction ainsi que de nombreuses atteintes squelettiques et une hématopoïèse altérée.

2. Implication dans l'auto-renouveaulement

Les cellules souches sont des cellules qui, en se différenciant, donnent plusieurs types cellulaires, mais ont également la capacité de s'auto-renouveler. SHP2 a été montrée pour avoir un rôle clé dans les processus de différenciation et d'auto-renouveaulement. En effet, SHP2 est connue pour jouer un rôle important dans l'auto-renouveaulement et la différenciation des cellules souches embryonnaires (CSEs). Il a été montré que dans des souris déficientes pour SHP2, leur capacité de différenciation était limitée (Saxton and Pawson, 1999). De plus, la délétion de SHP2 dans des CSEs augmente leur capacité d'auto-renouveaulement en présence de LIF (Leukemia Inhibitory Factor), suggérant un rôle inhibiteur de SHP2 dans l'auto-renouveaulement des CSHs (Chan et al., 2006).

L'implication de SHP2 dans l'auto-renouveaulement et la différenciation se retrouve également au niveau des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). En effet, une première étude a démontré qu'une délétion ciblée de 65 acides aminés dans le domaine N-SH2 de SHP2 altère le développement des progéniteurs érythroïdes et myéloïdes aussi bien dans le foie fœtal que dans la moelle osseuse de souris chimères (Qu et al., 1997; Qu et al., 1998). De plus, il a été montré que des souris avec une haplo insuffisance de SHP2 présentent une diminution de la repopulation des CSHs après irradiation, et que cette diminution est due à un auto-renouveaulement réduit (Chan et al., 2006). En outre, la délétion de SHP2 dans les CSHs induit une perte rapide de ces cellules et des progéniteurs immatures de tous les lignages

hématopoïétiques par apoptose (Chan et al., 2011). Ainsi, SHP2 est importante pour l'hématopoïèse avec des rôles dans la différenciation et l'auto-renouveauement des CSHs.

SHP2 est également fortement impliquée au niveau des cellules progénitrices neurales (CPNs), Ke et al. montrant que la délétion de SHP2 au niveau des (CPNs) (Nestin-Cre) altère profondément leur prolifération et leur différenciation résultant en une létalité post-natale et une corticogénèse altérée (Ke et al., 2007). Les auteurs montrent également que les CPNs requièrent SHP2 pour maintenir leur capacité d'auto-renouveauement.

Ainsi l'ensemble de ces données montrent que SHP2 est fortement impliquée dans les processus d'auto-renouveauement et de différenciation des cellules souches, même si son effet est différent suivant le type cellulaire concerné (pour revue récente, (Kan et al., 2018)).

3. Implication dans les différents tissus

Étant donnée la létalité du KO total de SHP2, beaucoup de KO tissus spécifiques ont été développés révélant des impacts importants sur le développement de nombreux tissus et organes, incluant les os, le système nerveux, le cœur, les muscles, le sang, les reins, les poumons, les glandes mammaires, les intestins ou encore le tissu adipeux. Ces effets ont souvent été associés avec une hypoactivation de ERK1/2, bien que d'autres altérations ont également été rapportées (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des différents KO tissus spécifiques de SHP2.

Tissu/Cellule cible	Construction	Phénotype	Altération signalisation	Références
Ubiquitaire	<i>Ptpn11</i> ^{-/-}	létalité embryonnaire		Saxton et al., 1997; Yang et al., 2006
Ubiquitaire (inductible)	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Ub-ERT2-cre	Hématopoïèse altérée, perte de poids, anomalies du squelette, mort prématurée		Bauler et al., 2011
Muscle cardiaque et squelettique	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x MHC-cre ou MCK-cre	Cardiomyopathie dilatée, résistance à l'insuline, intolérance au glucose, diminution nombre et taille des myofibrilles	↘ ERK1/2, ↗ RhoA, AKT, STAT3	Fornaro et al., 2006; Kontaridis et al., 2008; Princen et al., 2009
Cellules souches mésenchymateuses	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Prx1-cre	Retard de croissance postnatal, anomalies craniales, manque de tissu adipeux sous-cutané	↘ ERK1/2, AKT dans l'os	Lapinski et al., 2013
Chondrocytes	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Col2a1-ERT2-cre	Cyphose, scoliose, métachondromatose	↘ ERK1/2 dans le cartilage	Kim et al., 2013; Bowen et al., 2014
Cellules de la crête neurale	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Wnt1-cre	Altération développement cellules de Schwann, hypomyélinisation des nerfs périphériques, défaut du système nerveux entérique, défauts craniofacial, malformations artérielles	↘ ERK1/2 (crête neurale), ↘ FAK, ERK1/2 (cellules de Schwann)	Grossmann, et al., 2009; Nakamura et al., 2009
Cortex embryonnaire	electroporation sh RNA in utero	Diminution neurogénèse, augmentation gliogénèse		Gauthier et al., 2007
Progéniteurs mésenchymateux/ostéo clastes	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Cathepsin K-cre	Métacondromatose		Yang et al., 2013
Système nerveux central	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Nestin-cre	Altération corticogénèse, diminution neurogénèse, augmentation gliogénèse, létalité post-natale	↘ ERK1/2, ↗ FAK dans neurones du cervelet sous SDF1-α	Ke et al., 2007; Hagihara et al., 2009
Progéniteurs du télencéphale et oligodendrocytes	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Olig2-cre	Diminution des progéniteurs oligodendrocytes, hypomyélinisation	↘ ERK1/2 dans zone ventriculaire	Ehrman et al., 2014
Neurones	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x CRE3	Obésité, diabète, hyperphagie, résistance à l'insuline et leptine, néphropathie		Krajewska et al., 2008
Neurones POMC	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x POMC-cre	Obésité, altération métabolisme du glucose, résistance à la leptine, diminution dépenses énergétiques		Banno et al., 2010; Do Carmo et al., 2014
Souris chimères	<i>Ptpn11</i> ^{-/-} /RAG-2 blastocyste	Absence de progéniteurs érythroïdes et myéloïdes, défauts squelettiques, intestinaux, pulmonaires et cutanés		Qu et al., 2001
Cellules souches hématopoïétiques	<i>Ptpn11</i> ^{fl/fl} x Mx1-cre	Apoptose des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs	↘ ERK1/2, AKT en réponse au SCF et TPO dans	Chan et al., 2011

Cellules T	Ptpn11 ^{fl/fl} x Lck-cre	Altération maturation/différenciation cellules T	↳ ERK1/2	Nguyen et al., 2006
	Ptpn11 ^{fl/fl} x CD4-cre	Stimulation progression mélanome, augmentation sécrétion cytokines pro-inflammatoires, tumeurs cartilagineuses		Zhang et al., 2013 ; Miah et al., 2017
Mastocytes	Ptpn11 ^{fl/fl} x Mcpt5-cre	Diminution survie mastocytes, altération du chimiotactisme induit par SCF	↳ AKT, ERK1/2, Lyn sous SCF	Sharma et al., 2012; Sharma et al., 2014
Mégacaryocytes/Plaquettes	Ptpn11 ^{fl/fl} x PF4-cre	Diminution ploïdie mégacaryocyte, macrothrombocytopénie, augmentation clairance plaquette et CLEC-2	↳ ERK1/2 sous TPO et Intégrine α IIb β 3, ↳ SFK lorsque adhérents sur fibrinogène	Mazharian et al., 2013
Hépatocytes	Ptpn11 ^{fl/fl} x Alb-cre	Altération régénération foie, augmentation progression tumeur, amélioration sensibilité insuline, tolérance glucose, résistance obésité, augmentation dépenses énergétiques	↳ ERK1/2, p90RSK, PKC sous stimulation FGF19, ↳ STAT3, ↳ PI3K/AKT et ↳ ERK1/2 sous insuline	Bard-Chapeau et al., 2006; Matsuo et al., 2010; Bard-Chapeau et al., 2011; Nagata et al., 2012; Li et al., 2014; Luo et al., 2016
Epithélium intestinal	Ptpn11 ^{fl/fl} x Villin-cre	Colite sévère, infiltration cellules immunitaires, diminution cellules goblet, augmentation perméabilité intestinale	↳ STAT3, NF- κ B	Coulombe et al., 2013; Heuberger et al., 2014
Cellules épithéliales pulmonaires	Ptpn11 ^{fl/fl} x (tetO)7-CMV-cre	Fibrose pulmonaire	↳ ERK1/2 sous FGF	Zhang et al., 2012
Glande mammaire	Ptpn11 ^{fl/fl} x MMTV-cre	Altération de la morphologie des structures alvéolaires pendant la lactation	↳ STAT5, ↳ STAT3	Ke et al., 2006
Rein	Ptpn11 ^{fl/fl} x Hoxb7-cre	Altération développement cortex et médulla, diminution du nombre de tubules et de glomérules		Willecke et al., 2011
Tissu adipeux	Ptpn11 ^{fl/fl} x Adiponectine-cre	Pas de phénotype		Bettaieb et al., 2011
	Ptpn11 ^{fl/fl} x aP2-cre	Sévère lipodystrophie, altération adipogénèse, mort prématurée	↳ p38	He et al., 2012
Pancréas	Ptpn11 ^{fl/fl} x Pdx1-cre	Altération sécrétion insuline, tolérance glucose		Zhang et al., 2009
Cellules souches musculaire	Ptpn11 ^{fl/fl} x Pax7-cre	Altération réparation musculaire, diminution prolifération cellules souches musculaires	↳ ERK1/2	Griger et al., 2017

Ainsi, les études montrent que SHP2 joue un rôle prépondérant dans la formation osseuse. De plus, nous verrons par la suite que le rôle de SHP2 dans l'homéostasie osseuse est tel que sa dérégulation conduit à des tumeurs cartilagineuses chez l'Homme. Le KO de SHP2 au niveau cardiaque provoque une cardiomyopathie dilatée sévère et sa délétion au niveau de l'intestin induit une sévère colite associée à une infiltration de cellules immunitaires, des niveaux de cytokines augmentés ainsi qu'une diminution de cellules caliciformes (cellules sécrétrices de mucus protégeant la surface de l'épithélium intestinal) conduisant à une importante létalité. De plus, une étude montre que, via la voie MAPK, SHP2 oriente le choix du devenir des progéniteurs entre cellules de Paneth et cellules caliciformes au profit de ces dernières (Heuberger et al., 2014). Enfin, SHP2 favorise la croissance du muscle squelettique et a un rôle protecteur en permettant la régénération du foie lors de dommages tissulaires. De façon intéressante, malgré sa fonction pro-proliférative, SHP2 agit au niveau du foie comme un suppresseur de tumeur (Bard-Chapeau et al., 2011; Luo et al., 2016).

IV. Implication de SHP2 dans l'inflammation

1. Différenciation des cellules hématopoïétiques

Étant donné le rôle fondamental de SHP2 dans le développement, son implication dans l'hématopoïèse a été étudiée très tôt. L'hématopoïèse est un processus qui, à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH), donne des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes qui par la suite se différencient pour former les diverses cellules sanguines (Figure 18).

L'hématopoïèse commence au septième jour du développement embryonnaire au niveau du sac vitellin, puis dans une région sous l'aorte dorsale nommée aorte-gonade méso-néphros (AGM) et le placenta, puis dans le foie fœtal et enfin dans la moelle osseuse. En revanche, chez l'adulte, l'hématopoïèse ne se déroule plus que dans la moelle osseuse (pour revue, voir Ivanovs et al., 2017). Cependant, plusieurs travaux montrent qu'il existe également de l'hématopoïèse dans le tissu adipeux mais l'origine de ces cellules reste encore imprécise (Charrière et al., 2003; Puissant et al., 2005; Prunet-Marcassus et al., 2006; Han et al., 2010; Eto et al., 2013; Luche et al., 2015).

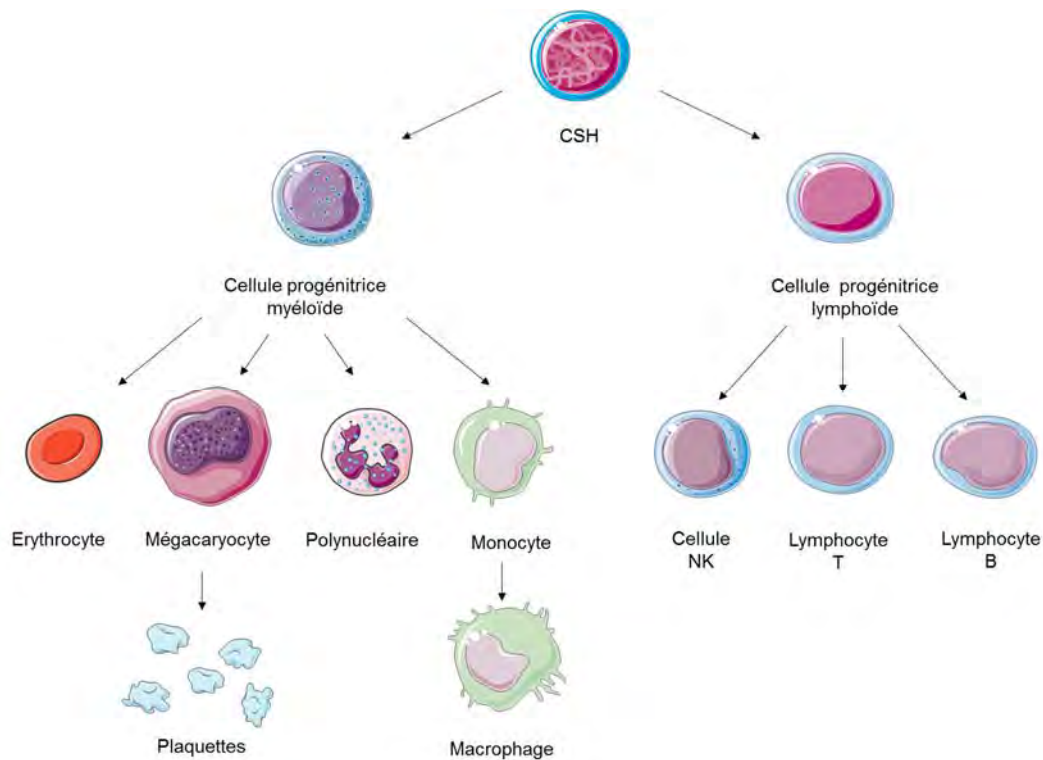


Figure 18 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) se différencient en progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes qui eux-mêmes se différencient pour former les différentes cellules sanguines ou immunitaires.

La différenciation des CSHs en cellules progénitrices lymphoïdes ou myéloïdes est dépendante de plusieurs facteurs dont les cytokines. Classiquement, il est décrit que l'IL-7 oriente la différenciation des CSHs vers les lignées lymphoïdes, et des souris délétées pour le récepteur à l'IL-7 montre une sévère hypoplasie de tout le lignage lymphoïde (Peschon et al., 1994). Par la suite, l'IL-4 induit une différenciation en lymphocyte B, alors que l'IL-2 oriente la différenciation des cellules T et l'IL-15 celle en cellules NK. La différenciation des CSHs en cellules myéloïdes fait par contre intervenir le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et l'IL-3. La différenciation en monocytes est sous la dépendance du M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor).

2. Impact sur la lignée lymphoïde

Il a été montré que SHP2 est impliquée dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes T intra-thymiques, le KO conditionnel de SHP2 dans les thymocytes provoquant un blocage de la prolifération et de la différenciation de ces cellules ainsi qu'une réduction de

l'expansion des cellules T CD4⁺ (Nguyen et al., 2006). La genèse d'une souris exprimant un mutant SHP2 catalytiquement inactif spécifiquement dans les cellules T est associée avec une augmentation de cytokines anti-inflammatoires suggérant que SHP2 supprime la différenciation des cellules T en Th2 (cellules productrices de cytokines anti-inflammatoires) (Salmond et al., 2005).

3. Impact sur la lignée myéloïde

SHP2 est connue pour avoir un rôle prépondérant dans la différenciation du lignage myéloïde. En effet, il a été montré que des mutations hyperactivatrices de SHP2 (E76K, D61V, D61Y) rendent les progéniteurs hématopoïétiques hypersensibles au GM-CSF, induisant leur hyperprolifération (Chan, 2005). L'importance de SHP2 dans l'hématopoïèse est telle qu'une dérégulation de SHP2 dans les CSHs est fréquemment retrouvée dans des leucémies myéloïdes chez l'humain. En effet, des mutations activatrices sporadiques de SHP2 sont retrouvées dans 30% des Leucémies Myélo-Monocytaires Juvéniles (LMMJ) (Loh et al., 2005; Tartaglia et al., 2005). De plus, les LMMJ sont retrouvées dans le syndrome de Noonan (SN) causé par une mutation germinale de *PTPN11* (voir partie III) (Strullu and Cavé, 2017)

Plusieurs études montrent également que SHP2 a un rôle très important au niveau des macrophages et en particulier au niveau de leur polarisation. En effet, SHP2 a été montrée pour supprimer la polarisation des macrophages vers le type M2 (anti-inflammatoires) en réponse à l'IL-4 aussi bien *in vitro* sur des lignées de macrophages murins (RAW264.7) que *ex vivo* sur des BMDM (Bone Marrow Derived Macrophages) (Tao et al., 2014). Ces auteurs montrent également que la transduction d'un mutant SHP2 hyperactif (D61G) diminue la polarisation M2 alors que celle d'un mutant hypoactif (T468M) augmente la polarisation M2. En plus de diminuer la polarisation M2, SHP2 promeut la polarisation des macrophages vers le type M1 pro-inflammatoire. En effet, après stimulation, des BMDM traités avec un inhibiteur de SHP2 (PHPS1) montrent une diminution de marqueurs M1 ainsi qu'une diminution de cytokines pro-inflammatoires (Zhao et al., 2016).

Une étude récente a montré qu'en plus de son rôle dans les macrophages, la mutation de SHP2 dans le microenvironnement de la moelle osseuse a de profondes conséquences sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et est suffisante pour induire la leucémogénèse à travers des effets importants sur les CSHs (Dong et al., 2016).

4. SHP2 et inflammation

D'un point de vue mécanistique, le rôle de SHP2 dans l'inflammation est encore mal compris. Il est connu que SHP2 intervient dans la voie NF- κ B et augmente son activité (You et al., 2001; Neznanov et al., 2004; Zhao et al., 2016) mais le mécanisme impliqué est encore inconnu. A l'heure actuelle, il a été montré que SHP2 peut agir sur cette voie indépendamment des MAPK (You et al., 2001 ; Zhao et al., 2016), et SHP2 a été détectée au niveau du complexe IKK ainsi qu'au niveau du récepteur à l'IL-1 (You et al., 2001).

V. Implication de SHP2 dans le métabolisme

Étant donnés les rôles pléiotropiques des voies de signalisation régulées par SHP2 et son expression ubiquitaire, SHP2 est également impliquée dans de nombreux processus métaboliques, qui ont notamment été révélés par le développement des modèles animaux tissu-spécifiques (Tableau 2).

1. Dans le cerveau

En 2008, une souris SHP2 KO dans les neurones a été générée (Krajewska et al., 2008). Ces souris présentent une obésité et une importante hyperphagie associée à une résistance à la leptine (hormone provoquant la satiété). De plus, les animaux présentent une intolérance au glucose qui est évolutive dans le temps et probablement causée par l'obésité sévère. Ces résultats sont cohérents avec une autre étude présentant un modèle de souris qui expriment un mutant SHP2 catalytiquement hyperactif dans les neurones. Dans ce modèle, les souris sont résistantes à l'obésité quand nourries avec un régime gras et présentent une diminution de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation des dépenses énergétiques. Ce phénotype s'accompagne d'une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'à la leptine (He et al., 2012). De plus, en 2010, un autre groupe a réalisé un KO de SHP2 cérébral cette fois-ci au niveau des neurones POMC (neurones cibles de la leptine et impliqués dans la satiété) et confirme la relation entre SHP2 et la leptine, puisque leur souris présentent une augmentation de l'adiposité, une diminution des dépenses énergétiques et une diminution de la sensibilité à la leptine (Banno et al., 2010). Collectivement, ces études montrent que SHP2, de par son rôle sur la sensibilité à la leptine au niveau cérébral, est un important régulateur de l'homéostasie énergétique.

2. Dans le pancréas

C'est en 2009 que le KO de SHP2 dans le pancréas a été réalisé (Zhang et al., 2009). Les auteurs montrent que, de façon cohérente avec son rôle primordial dans le développement, le KO de SHP2 dans le pancréas induit une diminution de la biosynthèse d'insuline dans la cellule β . En plus de son impact sur la biosynthèse d'insuline, la délétion de SHP2 abolit la sécrétion d'insuline en réponse au glucose aussi bien *in vitro* que *in vivo*, induisant ainsi une intolérance au glucose.

D'un point de vue mécanistique, les auteurs montrent que la délétion de SHP2 affecte le facteur de transcription PDX1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1), un activateur majeur du gène codant pour l'insuline (Ahlgren et al., 1998). Ici, la délétion de SHP2 diminue l'activation des voies PI3K/AKT/FOXO1 et ERK1/2 en réponse au glucose qui sont connues pour stimuler l'expression de PDX1 (Kitamura et al., 2002), aboutissant à la diminution de l'expression de PDX1 et des gènes codant pour l'insuline.

SHP2 a donc un rôle fondamental dans la biosynthèse et la sécrétion d'insuline.

3. Dans le foie

En 2010, le KO de SHP2 dans les hépatocytes a été réalisé et a permis de mieux comprendre l'implication de SHP2 dans le métabolisme glucidique (Matsuo et al., 2010). Ces souris présentent une meilleure tolérance au glucose ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Cette meilleure sensibilité à l'insuline se traduit également par une glycémie à jeun diminuée avec des niveaux d'insuline plasmatiques équivalents. De plus, les auteurs observent que la délétion de SHP2 induit une diminution de l'expression d'enzymes impliquées dans la néoglucogenèse comme PECK et G6P traduisant une meilleure insulino-sensibilité.

D'un point de vue mécanistique, la délétion de SHP2 est associée à une augmentation des phosphorylations sur tyrosine d'IRS-1 permettant un recrutement plus intense de la PI3K et aboutissant à une augmentation de la phosphorylation d'AKT.

SHP2 a donc un effet néfaste sur la sensibilité à l'insuline au niveau du foie et il a été proposé que cet effet soit dû à des déphosphorylations de résidus tyrosines sur IRS-1 par SHP2, diminuant ainsi le signal insulinique. De plus, il a été montré que chez des souris nourries en régime gras, la délétion hépatique de SHP2 améliore la sensibilité à l'insuline (Nagata et al., 2012). De façon intéressante, cette étude montre également que l'expression de SHP2 dans

le foie est dépendante du statut nutritionnel, et qu'en situation d'obésité, l'expression de SHP2 hépatique est augmentée. Ceci suggère que SHP2 pourrait être une cause d'insulino-résistance hépatique en situation d'obésité.

4. Dans le muscle squelettique

En 2009, un KO de SHP2 dans le cœur et les muscles squelettiques a été généré sous contrôle du promoteur de la créatine kinase musculaire (Princen et al., 2009), qui conduit à une létalité précoce à deux semaines post-natale associée à une cardiomyopathie dilatée. De façon intéressante, ces souris présentent une diminution de la sensibilité à l'insuline ainsi que de leur tolérance au glucose.

D'un point de vue mécanistique, le KO musculaire de SHP2 est associé avec une augmentation de la phosphorylation sur tyrosines d'IRS-1 et un recrutement plus intense de la PI3K. Cependant, à la différence du KO hépatique, ce recrutement plus intense de la PI3K n'est pas associé à une hyper-activation d'AKT.

Cependant, dans le muscle, le captage de glucose n'est pas uniquement sous la dépendance d'AKT. En effet, l'activation de l'AMPK induit également le captage de glucose (indépendamment de l'insuline) et un activateur de l'AMPK (la metformin) est couramment utilisé contre le DT2. De façon intéressante, le KO musculaire de SHP2 diminue l'activation de l'AMPK sous stimulation par la metformin entraînant ainsi une diminution de captage de glucose aboutissant à une intolérance au glucose.

De plus, la PKC ζ (Protein kinase C zeta) a été montrée comme étant impliquée dans la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique sous stimulation à l'insuline (Braiman, 2001). Ici, les auteurs montrent que le KO musculaire de SHP2 induit également une hypoactivation de la PKC ζ pouvant être la cause de l'insulino-résistance.

Ainsi, à la différence du KO hépatique de SHP2 améliorant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, le KO musculaire est quant à lui insulino-résistant et intolérant au glucose. Cette différence d'effet de SHP2 peut s'expliquer par un effet sur des voies de signalisation différentes entre ces deux tissus (PI3K pour le foie, AMPK et PKC ζ pour le muscle).

5. Dans le tissu adipeux

Un premier KO de SHP2 dans le tissu adipeux a été généré sous le promoteur Adiponectine (Bettaieb et al., 2012). Dans ce modèle, la délétion de SHP2 est sans effet sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline bien qu'il y ait une augmentation de la phosphorylation d'AKT au niveau du tissu adipeux.

Plus tard, un autre KO de SHP2 dans le tissu adipeux a été réalisé, cette fois-ci sous le contrôle du promoteur aP2 (He et al., 2013). Ce modèle est associé à une lipodystrophie sévère et une mort prématurée. De plus, ce modèle présente une glycémie et une insulinémie à jeun diminuées par rapport aux souris contrôles qui sont normalisées suite à une greffe de tissu adipeux. Cependant, les auteurs n'ont pas pu caractériser la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de ce modèle, les souris étant trop faibles pour ces tests métaboliques.

Cependant, le promoteur aP2 étant peu spécifique de l'adipocyte, on ne peut pas exclure une participation d'autres cellules à ce phénotype comme par exemple les macrophages. En effet, Bettaieb et al., montrent également que l'exposition au HFD induit une augmentation de l'expression de SHP2 dans tous les tissus adipeux, suggérant une fonction de SHP2 au cours de l'obésité et éventuellement de l'insulino-résistance du tissu adipeux, mais que contrairement au modèle aP2-cre, la délétion de SHP2 sous le promoteur adiponectine n'impacte pas les macrophages. Ceci suggère que, dans le tissu adipeux, le rôle de SHP2 sur le métabolisme glucidique ne soit pas dépendant de l'adipocyte mais plutôt des cellules de la fraction stromale et en particulier des macrophages.

En conclusion, étant donné l'implication de SHP2 dans de nombreuses voies de signalisation, et son rôle crucial dans le développement, l'effet de SHP2 sur le métabolisme glucidique est indéniable. Cependant, son effet est très dépendant du tissu concerné, avec un rôle négatif sur l'action de l'insuline au niveau du foie et positif au niveau du muscle et un rôle plus ambiguë au niveau du tissu adipeux. La différence d'effet de SHP2 sur l'action de l'insuline au niveau de ces différents tissus pourrait s'expliquer par des partenaires/substrats de SHP2 différents.

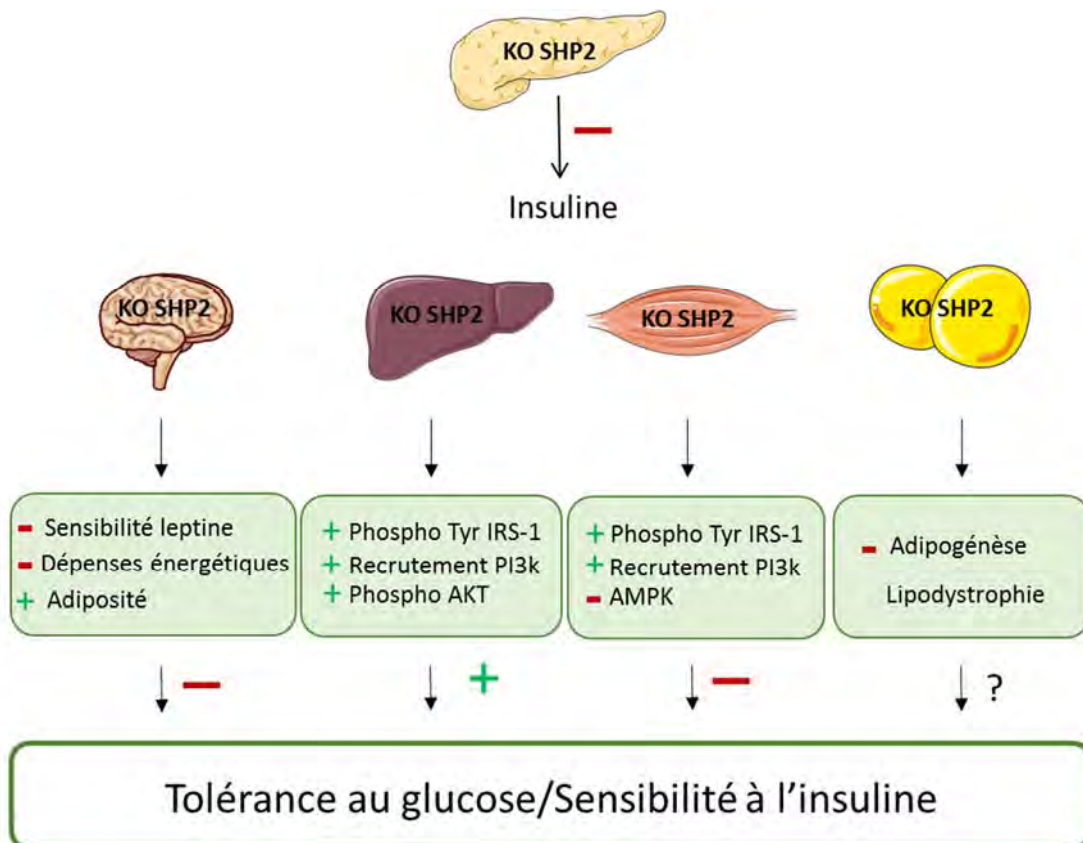


Figure 19 : Schéma-bilan de l'impact des délétions de SHP2 dans les différents tissus métaboliques sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline

Ainsi, SHP2 apparaît comme une protéine aux multiples facettes qui, de par son rôle régulateur dans des voies de signalisation canoniques, joue des rôles importants dans des processus cellulaires fondamentaux, expliquant ses fonctions tant dans le développement que dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie. Bien que de nombreuses inconnues demeurent quant aux liens entre ces différents mécanismes, leur contribution relative et les mécanismes de contrôle sous-jacents, l'importance de SHP2 s'illustre par le fait que sa dérégulation, positive ou négative, a des conséquences physiopathologiques importantes, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Partie 3 : Mutations de SHP2 et physiopathologie

Les multiples rôles de SHP2 dans la régulation de processus cellulaires très fondamentaux (prolifération, différenciation) et dans la fonction de multiples tissus et organes confèrent assez intuitivement des conséquences physiopathologiques importantes à sa dérégulation. Ainsi, des mutations somatiques « gain de fonction » (GOF) de *PTPN11* sont à l'origine de leucémies et dans une moindre mesure de tumeurs solides, conduisant à définir *PTPN11* comme un proto-oncogène. De plus, depuis plusieurs années, un intérêt grandissant s'est centré sur l'étude de SHP2 avec la découverte de mutations germinales GOF mais aussi « perte de fonction » (LOF) de *PTPN11* provoquant plusieurs maladies génétiques. Ainsi, les mutations LOF de *PTPN11* ont été récemment identifiées comme la cause de la métachondromatose (MC, OMIM #156250), une maladie rare caractérisée par des tumeurs cartilagineuses. D'autres mutations sont à l'origine de deux syndromes polymalformatifs appelés Syndrome de Noonan (SN, OMIM #163950) et Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples (SN-LM, anciennement appelé LEOPARD, OMIM #151100). Ces syndromes font partie d'une famille de maladies rares appelée RASopathies, dont les mutations concernent essentiellement des composants de la voie RAS/MAPK (Paccoud et al., 2018). Enfin, les études de polymorphisme ont également révélé un possible rôle de SHP2 dans certaines maladies métaboliques. Outre les évidences génétiques, diverses études pré-cliniques, notamment pharmacologiques, ont permis d'illustrer des rôles physiopathologiques de SHP2 dans la résistance aux anti-cancéreux, dans des maladies auto-immunes ou dans la virulence de certains pathogènes.

I. SHP2 et tumorigénèse

Nous avons précédemment vu que SHP2 est un régulateur clé des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie (Ras/MAPK, PI3K/AKT), et il est largement établi que la dérégulation de ces voies est un facteur causal du développement tumoral. De façon cohérente, de multiples données attestent du rôle important de SHP2 dans le processus de tumorigénèse, si bien que son gène *PTPN11* a été défini comme un authentique proto-oncogène. Ainsi, des mutations somatiques de *PTPN11* ont été identifiées comme la principale cause (35% des cas) de leucémies myélo-monocytaires juvéniles (LMMJ), une malignité myéloïde rare et agressive de la petite enfance caractérisée par une prolifération excessive de

monocytes et de macrophages (Tartaglia et al., 2003; Loh, 2004). Les mutations de SHP2 associées aux LMMJ se trouvent principalement au niveau des domaines N-SH2 et PTP impliqués dans le processus d'auto-inhibition de la protéine, résultant en une augmentation de son activité basale et portant donc le terme de GOF (Tartaglia et al., 2003; Keilhack et al., 2005; Niihori et al., 2005). L'expression de mutants GOF (D61Y, E76K) dans les progéniteurs hématopoïétiques favorise la progression du cycle cellulaire de ces cellules en réponse au GM-CSF et leur survie *in vitro*. Ces deux événements sont associés avec une hyperactivation des voies PI3K/AKT et Ras/MAPK, et résultent *in vivo* en des désordres myéloprolifératifs létaux (Mohi et al., 2005; Yang et al., 2008; Chan et al., 2009; Xu et al., 2011). Mécanistiquement, il est probable que ces mutations oncogéniques de SHP2 conduisent au développement de LMMJ via une hyper-activation de la voie Ras/MAPK, étant donné que des mutations oncogéniques de la protéine RAS et des mutations hypoactivatrices de RasGAP et de la Neurofibromine ont aussi été retrouvées chez des patients atteints de LMMJ (Tartaglia et al., 2003; Loh, 2004; de Vries et al., 2010). Ainsi, il a récemment été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de MEK diminue significativement la croissance de progéniteurs hématopoïétiques de cellules issues de patients atteints de LMMJ (Tasian et al., 2018). De plus, il a été proposé que ces mutations GOF de *PTPN11* induisent une déphosphorylation excessive de STAT3, ayant pour conséquence une hypersensibilité au GM-CSF et résultant en une stimulation des progéniteurs myéloïdes, qui pourrait agir en synergie avec l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK (Zhang et al., 2009). Plus récemment, il a été découvert que des iPSCs (cellules souches pluripotentes induites) issues de patients porteurs de mutations de *PTPN11* atteints de LMMJ présentent une induction très importante du miR-223 et du miR-15a par rapport à des patients atteints de LMMJ mais sans mutation de *PTPN11*. Cette association a également été trouvée au niveau de cellules mononuclées de la moelle osseuse, suggérant que ces deux miRNA pourraient être utilisés comme des biomarqueurs de LMMJ pour des patients avec mutation de *PTPN11* (Mulero-Navarro et al., 2015).

En plus des LMMJ, des mutations de SHP2 sont trouvées dans d'autres néoplasies myéloïdes comme les leucémies myéloïdes aiguës ou encore les leucémies myélomonocytaires chroniques. Cependant, alors que les fréquences de ces néoplasies sont importantes chez les enfants, elles sont presque inexistantes chez les adultes présentant les mêmes troubles myéloïdes (Hugues et al., 2005). Des mutations de SHP2 ont aussi été

caractérisées (bien que plus rares) dans des cas de tumeurs solides comme des neuroblastomes, des adénocarcinomes pulmonaires ou encore dans des carcinomes hépatocellulaires (Bentires-Alj et al., 2004 ; Miyamoto et al., 2008 ; Siegfried et al., 2017).

Outre l'identification de mutations oncogéniques de SHP2, différentes études attestent du rôle positif de SHP2 dans la tumorigenèse puisqu'une augmentation de l'expression de SHP2 est reconnue comme un marqueur prédictif dans des cancers de l'estomac, du sein, des poumons, de la thyroïde, du foie, du pancréas et de la peau (Zhang et al., 2016). De plus, SHP2 est également impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux anti-cancéreux (Fedele et al., 2018 ; Wong et al., 2018). Ainsi de plus en plus d'études s'intéressent à l'utilisation d'inhibiteurs de SHP2 dans les thérapies anti-cancéreuses et convergent sur le fait que SHP2 serait une cible d'intérêt dans le traitement contre le cancer (Chen et al., 2016 ; Dardaei et al., 2018 ; Fedele et al., 2018).

Si l'hyperactivation de SHP2 retrouvée dans plusieurs types de cancers permet de définir son gène comme un proto-oncogène, il est à noter qu'elle peut également agir comme un suppresseur de tumeur dans le foie (Bard-Chapeau et al., 2011; Luo et al., 2016). Cette différence d'effet pourrait être due au rôle anti-inflammatoire de SHP2 dans le foie qui aurait un ainsi un effet protecteur sur l'hépatocarcinogénèse induite par la NASH.

II. SHP2 et maladies génétiques

1. La Métachondromatose

La métachondromatose (MC) est une maladie rare (moins de 50 cas ont été rapportés) autosomique dominante caractérisée par la présence de tumeurs bénignes de l'os. Ces tumeurs associent des exostoses (tumeurs à la surface de l'os qui apparaissent comme des excroissances osseuses sur un os normal) au niveau des mains et des pieds ainsi que des enchondromes (tumeurs à l'intérieur de l'os) au niveau de la crête iliaque et de la métaphyse des os longs (Figure 20).



Figure 20 : Enchondromes présents dans la métachondromatose

Fisher et al., 2013

Une complication fréquente des enchondromes est une nécrose vasculaire de la tête fémorale lorsqu'ils sont localisés au niveau de celle-ci. Ils peuvent également causer des déformations des mains et des pieds. Cependant les lésions exostatiques peuvent diminuer de taille spontanément et complètement régresser (Bowen et al., 2011; Fisher et al., 2013).

En 2010, des analyses génétiques ont conduit à l'identification de mutations hétérozygotes LOF de *PTPN11* chez la plupart des patients atteints de métachondromatose. Ces mutations, de type décalage de phase ou faux sens, résultent en la perte d'expression de SHP2 ou en la génération d'une forme tronquée de sa partie C-terminale, notamment tout ou partie de son domaine catalytique. De plus, ces mutations sont associées à une perte d'hétérozygotie de l'allèle sauvage au niveau des tumeurs exostatiques suggérant que l'apparition des tumeurs localisées chez les patients MC serait due à un deuxième événement génétique entraînant la perte de l'allèle sauvage restant, conformément à la théorie de Knudson (Sobreira et al., 2010 ; Bowen et al., 2011). En accord avec cette hypothèse, les souris *Ptpn11^{+/-}* ne développent pas de tumeurs alors que l'inactivation totale de SHP2 dans les chondrocytes ou dans les progéniteurs mésenchymateux induit des tumeurs cartilagineuses (Bowen et al., 2014 ; Kim et al., 2014). Selon Bowen et al., les exostoses seraient causées par une croissance

désorganisée des chondrocytes et un retard de leur différenciation terminale, alors que les enchondromes proviendraient d'une chondrogénèse ectopique de cellules fibroblastiques entourant l'os (Bowen et al., 2014). De plus, il est à noter que la MC est associée à une hypoactivation de la voie Ras/MAPK dans les chondrocytes et dans les progéniteurs mésenchymateux chondroïdes ainsi que dans les tumeurs cartilagineuses des souris *Ptpn11*^{-/-} au niveau chondrocytaire (Bowen et al., 2014). Cette hypoactivation est cohérente avec le rôle activateur de SHP2 sur cette voie. De plus, la voie ERK1/2 étant impliquée dans la différenciation terminale des chondrocytes (Bowen et al., 2014), son hypoactivation dans les cellules *Ptpn11*^{-/-} pourrait participer au développement de tumeurs cartilagineuses.

2. Le Syndrome de Noonan

a. Description clinique du Syndrome de Noonan

Le Syndrome de Noonan (SN) a été nommé ainsi après sa découverte par Jacqueline Noonan en 1968. Le SN est une maladie génétique autosomique dominante assez fréquente avec une prévalence estimée à 1/1000 à 1/2500 naissances (Noonan, 1968). Il est caractérisé par une triade phénotypique associant un retard de croissance, une dysmorphie faciale et des cardiopathies (sténose de la valve pulmonaire, cardiomyopathie hypertrophique). A cette triade peut également s'ajouter d'autres défauts développementaux comme des anomalies squelettiques, un cryptorchidisme chez les hommes, un retard de développement léger à modéré ou des troubles de l'apprentissage, ainsi qu'une prédisposition aux désordres myéloprolifératifs. À cause de l'hétérogénéité entre les patients et de la redondance phénotypique avec les autres Rasopathies, le SN peut être difficile à diagnostiquer (Tartaglia et al., 2010, 2011).

La dysmorphie faciale

Les patients SN présentent des anomalies morphologiques du visage et du cou qui évoluent avec l'âge. En effet, cette dysmorphie faciale est marquée pendant l'enfance jusqu'au début de l'adolescence et devient plus subtile à l'âge adulte. Les caractéristiques faciales associées au SN comprennent un front haut, un hypertélorisme, un ptosis, des fentes palpébrales tombantes (antimongoloïdes), des oreilles basses et/ou en rotation postérieure, un cou court/palmé (Figure 21).

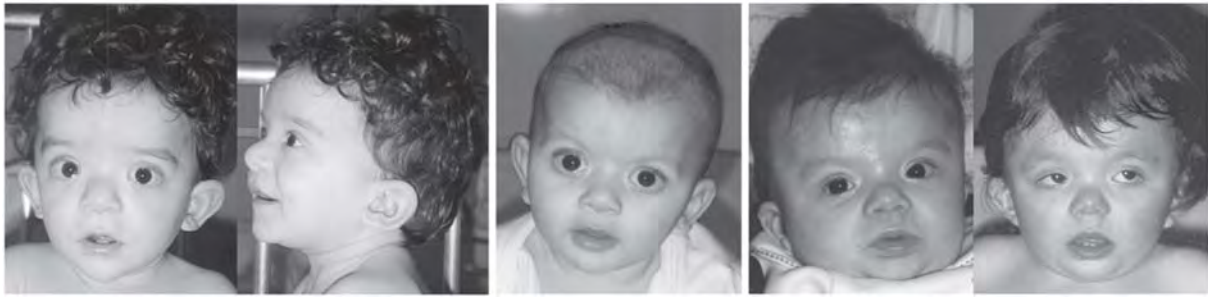


Figure 21 : Anomalies faciales retrouvées dans le Syndrome de Noonan (SN)

Tartaglia et al., 2010

Le retard de croissance

Une caractéristique fondamentale du SN est le retard de croissance post-natal (défini par une taille avec un SD < -2) affectant plus de 70% des patients. La croissance prénatale est habituellement normale avec un poids et une taille à la naissance normaux, le retard statural s’installant dans les premières années de la vie (Malaquias et al., 2012). Ce retard de croissance peut être lié à des difficultés d’alimentation qui sont retrouvées dans 70% des nourrissons, nécessitant une alimentation par voie entérale dans 20% des cas (Sharland, 2012).

A l’âge adulte, la taille des hommes est de $157,4 \pm 8,0$ cm (-2,4 SD) et celle des femmes est de $148,4 \pm 5,6$ cm (-2,2 SD) dans une population brésilienne (Malaquias et al., 2012). De plus, les auteurs montrent que ce retard de croissance est associé à un IMC diminué aussi bien chez les hommes ($18,8 \pm 2,2$ kg/m² ; -0,9 SD) que chez les femmes ($19,9 \pm 3,5$ kg/m² ; -0,5 SD), et que les patients SN ont une plus faible prévalence de surpoids et d’obésité que la population générale (Binder et al., 2012).

Les cardiopathies

Avec 80% de patients présentant un défaut cardiaque congénital, le SN est la deuxième cause syndromique de cardiopathies congénitales après la trisomie 21. Les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont une sténose de la valve pulmonaire (50-60% des cas) ainsi qu’une cardiomyopathie hypertrophique (20%). Cependant on retrouve également d’autres lésions incluant des défauts du septum atrial, du septum ventriculaire, une coarctation aortique, des anomalies de la valve mitrale, ou encore une persistance du canal artériel (Shaw et al., 2006 ; Prendiville et al., 2014). Étant donnée la haute prévalence et la mortalité des

atteintes cardiaques, des électrocardiogrammes ainsi que des échographies doivent être réalisés chez tous les patients atteints du SN.

Autres symptômes

En plus de cette triade phénotypique, le SN est associé à d'autres symptômes notamment une prédisposition aux LMMJ. En effet, une incidence plus importante de LMMJ est associée avec les mutations de *PTPN11* dans le SN en particulier concernant les mutations sur les résidus D61 et E76 (Strullu and Cavé, 2017). De plus les patients atteints du SN ont un risque huit fois plus élevé de développer un cancer (Kratz et al., 2015).

De nombreux autres défauts, incluant des troubles hématologiques, lymphatiques, psychomoteurs, neurologiques, neurosensoriels, urogénitaux ont également été reportés dans cette maladie (Tartaglia et al., 2010)(pour revue, voir Paccoud et al., 2018, annexe 2).

b. Génétique du SN

Le SN est une maladie génétique autosomique dominante d'origine familiale ou apparaissant de façon sporadique dans la moitié des cas (Jamieson et al., 1994). La haute prévalence de ces mutations *de novo* semble pouvoir s'expliquer, au moins en partie, par le fait que les mutations associées aux maladies développementale, offrent un avantage sélectif aux cellules germinales, en particulier aux spermatogonies (concept de sélection spermatogonale égoïste) (Goriely et al., 2003 ; Maher et al., 2016). C'est en 2001 que Tartaglia et al., ont découvert la mutation du gène *PTPN11* codant pour la protéine SHP2 comme causant le SN (Tartaglia et al., 2001). Cette mutation est retrouvée dans plus de 50% des cas et est donc la principale mutation responsable du SN. Depuis, d'autres gènes ont été identifiés comme responsable du SN : *SOS1*, *SOS2*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *BRAF*, *MEK1*, *SHOC2*, *CBL*, *RIT1*... (Aoki et al., 2013 ; Roberts et al., 2013). La fréquence d'apparition de ces mutations dans le SN est beaucoup plus faible que celle de *PTPN11*, avec 10% pour *SOS1* et *RAF1*, et moins de 2% pour les autres (Tartaglia et al., 2010 ; Roberts et al., 2013). La grande majorité de ces gènes codent pour des protéines intervenant dans la voie RAS/MAPK, et leurs mutations résultent le plus souvent en l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK (Tartaglia et al., 2010).

c. Conséquences des mutations SN de SHP2 sur sa structure et son activité

Des données structurales, biochimiques et fonctionnelles ont permis de comprendre les conséquences des mutations de SHP2 associées au SN sur sa structure et son activité (Keilhack

et al., 2005; Tartaglia et al., 2010; Darian et al., 2011; Martinelli et al., 2012; Qiu et al., 2014) (Figure 22). La majorité des mutations (D61G, D61Y, E76K) se concentrent au niveau ou à proximité des résidus impliqués dans l'interaction entre les domaines N-SH2 et PTP de SHP2, qui permettent à la protéine d'être maintenue dans une conformation auto-inhibée. Ces mutations perturbent ainsi la conformation de SHP2, la maintenant dans une conformation ouverte et donc active même au repos, induisant une augmentation de son activité plus ou moins intense suivant les mutants (Keilhack et al., 2005; Niihori et al., 2005; Tartaglia et al., 2006). D'autres mutations (T42A, D106A, E139D) sont retrouvées au niveau de résidus intervenant dans la liaison des domaines SH2 aux phosphotyrosines des protéines partenaires de SHP2. Ces mutations augmentent l'affinité des domaines SH2 pour les tyrosines phosphorylées les rendant ainsi plus sensibles à une stimulation donnée. Certaines mutations localisées entre les domaines SH2 affectent la flexibilité du domaine N-SH2 et sa capacité d'interaction avec le domaine PTP (Martinelli et al., 2008; Qiu et al., 2014).

Ainsi, quelle que soit leur localisation, toutes les mutations de SHP2 associées au SN favorisent la conformation ouverte active de la phosphatase provoquant son hyperactivation. Ces mutations sont donc des mutations GOF mais ne sont pas aussi hyper-activatrices que les mutations retrouvées dans les LMMJ (Tartaglia et al., 2006). Ceci pourrait expliquer le fait que les mutations associées au SN se retrouvent au niveau germinale mais pas celles associées aux LMMJ. En effet, l'expression hétérozygote globale de deux mutants associée aux LMMJ est létale dès le stade embryonnaire (Chan et al., 2009 ; Xu et al., 2011). De plus, si l'on en revient au concept de sélection égoïste, l'impact de la mutation pourrait être encore plus précoce, puisqu'il a été proposé que les mutations « trop » oncogéniques, induisant un potentiel prolifératif important aux progéniteurs germinaux, ne leur permettent plus de produire des gamètes fonctionnels, interdisant la transmission de ce type de mutations.

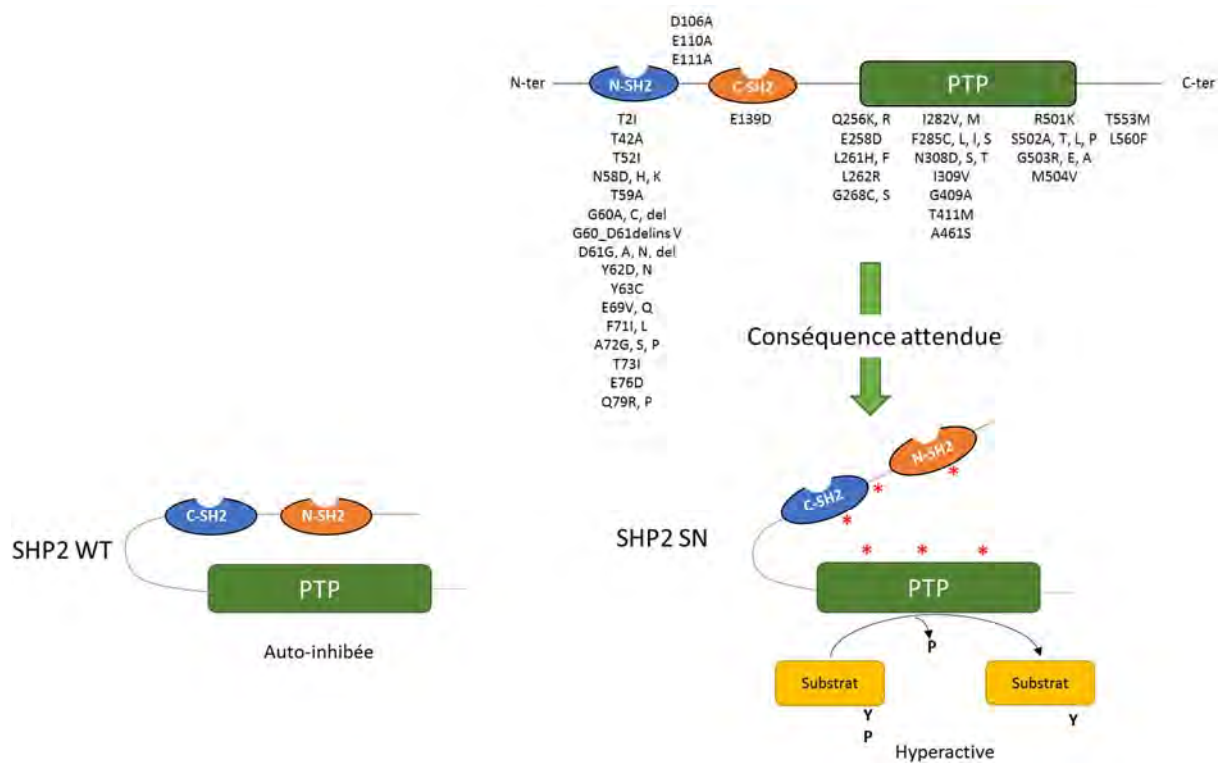


Figure 22 : Conséquences des mutations de Ptpn11 dans le SN sur la conformation de SHP2

d. Conséquences fonctionnelles des mutations SN de SHP2 sur la signalisation et le développement

Signalisation

De façon cohérente avec le rôle activateur de SHP2 sur la voie RAS/MAPK, de nombreuses analyses fonctionnelles ont démontré que l'hyperactivation de SHP2 associée au SN induit une hyperactivation de ERK1/2. Cette hyperactivation a été montrée aussi bien *in vitro* que *in vivo*, dans différents types cellulaires, en condition basale comme sous stimulation par plusieurs agonistes, alors que les mécanismes moléculaires impliqués sont toujours peu décrits (Araki et al., 2004; Fragale et al., 2004; Krenz, 2005; Oishi et al., 2006; Eminaga and Bennett, 2008; Bonetti et al., 2014). De façon intéressante, plusieurs modèles animaux du SN ont montré que la dérégulation de ERK1/2 était causalement liée aux différents traits cliniques de la maladie.

Signes cliniques

Le premier modèle murin du SN a été généré en 2004, il s'agit d'un knock in portant à l'état hétérozygote la mutation D61G (*Ptpn11*^{D61G/+}) retrouvée chez les patients (Araki et al., 2004). Ce modèle récapitule les principaux symptômes de la maladie comme les cardiopathies, le retard de croissance, les malformations cardio-faciales ainsi que les désordres myéloprolifératifs. Par la suite, de nombreux modèles du SN ont été générés aussi bien chez la souris, que le poisson-zèbre ou encore la drosophile.

- **Cardiopathies** : La physiopathologie des défauts cardiaques induits par le SN a été étudiée dans plusieurs modèles animaux de la maladie. En effet, l'expression de mutants de SHP2 associés au SN chez la souris ou le poisson-zèbre entraîne le développement de défauts cardiaques (Araki et al., 2004 ; Jopling and van Geemen, 2007 ; Krenz et al., 2008 ; Bonetti et al., 2014). Mécanistiquement, ces défauts cardiaques ont été associés à l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK, et l'inhibition de cette voie par des approches génétiques ou pharmacologiques permet de corriger les malformations cardiaques (Nakamura et al., 2007 ; Krenz et al., 2008 ; Araki et al., 2009).

- **Retard de croissance et malformations cranio-faciales** : Tous les modèles murins du SN avec mutation de SHP2 développés présentent une petite taille (Araki et al., 2004, 2009; Fragale et al., 2004; Krenz, 2005; Eminaga and Bennett, 2008; Nakamura et al., 2009). Une étude chez la souris SHP2^{D61G/+} révèle que le retard de croissance apparaît en post-natal avec un poids et une taille normaux à la naissance (Serra-Nedelec et al., 2012). De façon intéressante, cette souris présente une hyperphosphorylation de ERK1/2 dans plusieurs tissus, et le traitement par un inhibiteur sélectif de MEK (inhibant donc ERK1/2) améliore significativement la vitesse de croissance chez la souris SHP2^{D61G/+} ainsi que la souris transgénique Wnt1Cre:Q79R (Nakamura et al., 2009; Serra-Nedelec et al., 2012). Mécanistiquement, il a été montré que le retard de croissance chez la souris SHP2^{D61G/+} et chez les patients SN était dû à des niveaux d'IGF-1 réduits qui étaient en partie normalisés sous inhibition chronique de MEK (Serra-Nedelec et al., 2012). De plus, une étude récente montre que l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK au niveau de l'os et du cartilage participe à la dysfonction de la plaque de croissance et ainsi au retard de croissance, comme démontré pour d'autres maladies associées à une petite taille comme l'achondroplasie (Yamashita et al., 2014; Tajan et al., 2018).

En ce qui concerne les malformations cranio-faciales, les modèles SN souris et poisson-zèbres exprimant un mutant SHP2 présentent des défauts cranio-faciaux rappelant ceux retrouvés chez les patients (Araki et al., 2004, 2009; Jopling and van Geemen, 2007; Nakamura et al., 2009). De façon intéressante, ces malformations peuvent être réversées chez des souris SN avec un inhibiteur de MEK durant la gestation montrant que l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK est à l'origine de ces défauts (Nakamura et al., 2009).

- **Désordres cognitifs**

Les modèles animaux ont également été utiles pour décrypter les mécanismes sous-jacents aux troubles cognitifs associés aux Rasopathies. Les phénotypes comportementaux des modèles SN, notamment les déficits d'apprentissage et de mémoire et les défauts de plasticité synaptique, apparaissent liés au dysfonctionnement de l'hippocampe, notamment à l'altération de la mémoire à long terme et aux défauts dans la différenciation des progéniteurs neuronaux. Ces effets sont associés à une hyperactivation de ERK1/2 et un traitement visant à réduire la signalisation RAS/MAPK restaure les défauts cognitifs (Pagani et al., 2009; Lee et al., 2014).

- **Hématopoïèse**

L'hyperactivation de la voie RAS/MAPK a été mesurée dans des cellules hématopoïétiques exprimant des mutants SHP2 associés au SN/LMMJ, et cette dérégulation contribue à la leucémogénèse, mais d'autres mécanismes ont été identifiés. L'hypophosphorylation de STAT3 a été proposée pour contribuer à la leucémogénèse dans le contexte des mutants SHP2 associés au SN/LMMJ (Araki et al., 2004; Zhang et al., 2009) Une déphosphorylation accrue de STAT3 a également été récemment décrite chez la souris présentant une expression neuronale du mutant SHP2 E76K, entraînant le développement d'une hydrocéphalie (Zheng et al., 2018). Il est intéressant de noter que Mulero-Navarro et al. ont identifié une hyperactivation de STAT5 en tant que signature leucémogène, associée à une augmentation de miARN spécifiques (Mulero-Navarro et al., 2015). En outre, il a été démontré que les mutants SHP2 associés au SN favorisent les désordres myéloprolifératifs par des altérations du métabolisme aérobie mitochondrial et de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Xu et al., 2013). Les études physiopathologiques ont montré que le mutant SHP2 D61G favorise les désordres myéloprolifératifs en déclenchant le cycle des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et en augmentant le pool de cellules souches, un effet qui pourrait être médié par les cytokines pro-

inflammatoires sécrétées par les monocytes au voisinage des CSH (Xu et al., 2011; Dong et al., 2016).

3. Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples

a. Description clinique du Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples

Le Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples (SN-LM) encore appelé LEOPARD en référence aux principaux symptômes de la maladie (multiples Lentigines, ECG conduction abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonic stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth and sensorineural Deafness), est très proche phénotypiquement du SN, et s'en différencie par la présence plus commune d'anomalies cutanées et d'une surdité. La prévalence de ce syndrome est estimée à 1/100000, ce qui en fait une maladie très rare. Cependant, le diagnostic de ce syndrome pourrait être sous-évalué du fait de sa redondance phénotypique avec d'autres syndromes et de la difficulté de poser le diagnostic en absence de lentigines (Sarkozy et al., 2008).

Tout comme le SN, il est caractérisé par la triade phénotypique associant la dysmorphie faciale, le retard de croissance et les cardiopathies, à laquelle vient s'ajouter les anomalies cutanées.

Dysmorphie faciale

La dysmorphie faciale développée par les patients NS-LM évolue avec l'âge et est similaire à celle retrouvée chez les patients SN, bien qu'elle semble plus modérée. Cette dysmorphie est généralement discrète dans les premières années de vie, mais elle devient plus marquée durant l'enfance. Elle se traduit chez la quasi-totalité des patients par un hypertélorisme et moins fréquemment par un cou court, des lèvres épaisses et des oreilles basses en rotation postérieure (Sarkozy et al., 2008) (Figure 23).



Figure 23 : Phénotype de patients atteints du Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples (SN-LM)
On retrouve les oreilles basses en rotation postérieure (A), un cou court (B) ainsi que les lentigines multiples (C-D). (Sarkozy et al., 2008)

Retard de croissance

Le poids et la taille à la naissance sont habituellement dans la moyenne bien qu'un tiers des nouveaux nés ont un poids plus haut que la normale (Digilio et al., 2006). Le retard de croissance affecte seulement 30% des patients, ce qui en fait un trait moins marqué que pour les patients SN (Carcavilla et al., 2013 ; Sarkozy et al., 2008). Peu de données sont disponibles sur la composition corporelle des patients SN-LM, mais il a été reporté dans une petite cohorte que la majorité des patients SN-LM présentent un IMC plus bas que la moyenne (Tajan et al., 2014).

Cardiopathies

La grande majorité des patients atteints de SN-LM (80%) présentent une cardiomyopathie hypertrophique, faisant ainsi de ce symptôme une caractéristique du SN-LM (Sarkozy, 2004; Limongelli et al., 2007; Sarkozy et al., 2008). Ces cardiomyopathies hypertrophiques affectent en général le ventricule gauche avec une obstruction de sortie dans 40% des cas et peuvent être congénitales ou se développer pendant la petite enfance. Étant donné l'important risque d'arrêt cardiaque et de mort subite, un suivi cardiologique est nécessaire (Woywodt et al., 1998; Limongelli et al., 2007, 2008; Lauriol et al., 2015).

Anomalies cutanées

Les lentigines sont la principale caractéristique du SN-LM trouvées chez plus de 90% des patients (Martínez-Quintana and Rodríguez-González, 2012) (Figure 23). Ce sont des macules planes et brunâtres, généralement de 2 à 8 mm de diamètre, qui sont associées à une accumulation de pigments dans le derme et à une augmentation du nombre de mélanocytes dans la couche basale épidermique. Ils peuvent être présents dès la naissance ou apparaître durant l'enfance principalement sur le visage, le coup et les membres inférieurs. Leur nombre augmente jusqu'à plusieurs milliers au moment où les patients atteignent l'adolescence. Des spots « café-au-lait » sont aussi présents chez la moitié des patients.

Autres anomalies

De nombreuses autres anomalies ont également été décrites dans le SN-LM, comme des défauts squelettiques (*pectus carinatum* ou *excavatum*), des altérations génitales notamment une cryptorchidie, un retard mental modéré ou des difficultés d'apprentissage ainsi qu'une surdité. De plus, une prédisposition tumorale a également été suggérée bien que le trop faible

nombre de cas ne permet pas de tirer des conclusions formelles (Choi et al., 2003; Uçar et al., 2006; Seishima et al., 2007; Laux et al., 2008).

b. Génétique du SN-LM

Le SN-LM est majoritairement causé par des mutations ponctuelles du gène *PTPN11*, résultant en une hypoactivation de SHP2 (Digilio et al., 2002; Legius, 2002). Les mutations de *PTPN11* sont retrouvées dans environ 90% des patients SN-LM et sont toutes localisées au niveau du domaine catalytique de SHP2 (Keren, 2004; Sarkozy, 2004; Sarkozy et al., 2008). Les mutations les plus fréquemment retrouvées chez les patients sont les mutations T468M et Y279C qui sont retrouvées dans 65% des cas (Martínez-Quintana and Rodríguez-González, 2012).

Le SN-LM est également causé par des mutations sur les gènes *RAF1* et *BRAF*, deux gènes codant pour des protéines intervenant dans la voie RAS/MAPK (Pandit et al., 2007; Koudova et al., 2009; Sarkozy et al., 2009). Ces mutations sont retrouvées dans environ 5% des patients SN-LM, suggérant que la liste des gènes causant le SN-LM pourrait s'agrandir.

c. Conséquences des mutations SN-LM de SHP2 sur sa structure et son activité

Toutes les mutations de SHP2 associées au SN-LM sont localisées dans le domaine catalytique PTP et en particulier sur des résidus conservés qui sont nécessaires pour l'activité PTP comme le résidu Y279 qui définit la spécificité du substrat et le résidu T468 intervenant dans le motif signature (Sarkozy et al., 2008; Lauriol and Kontaridis, 2011) (Figure 24).

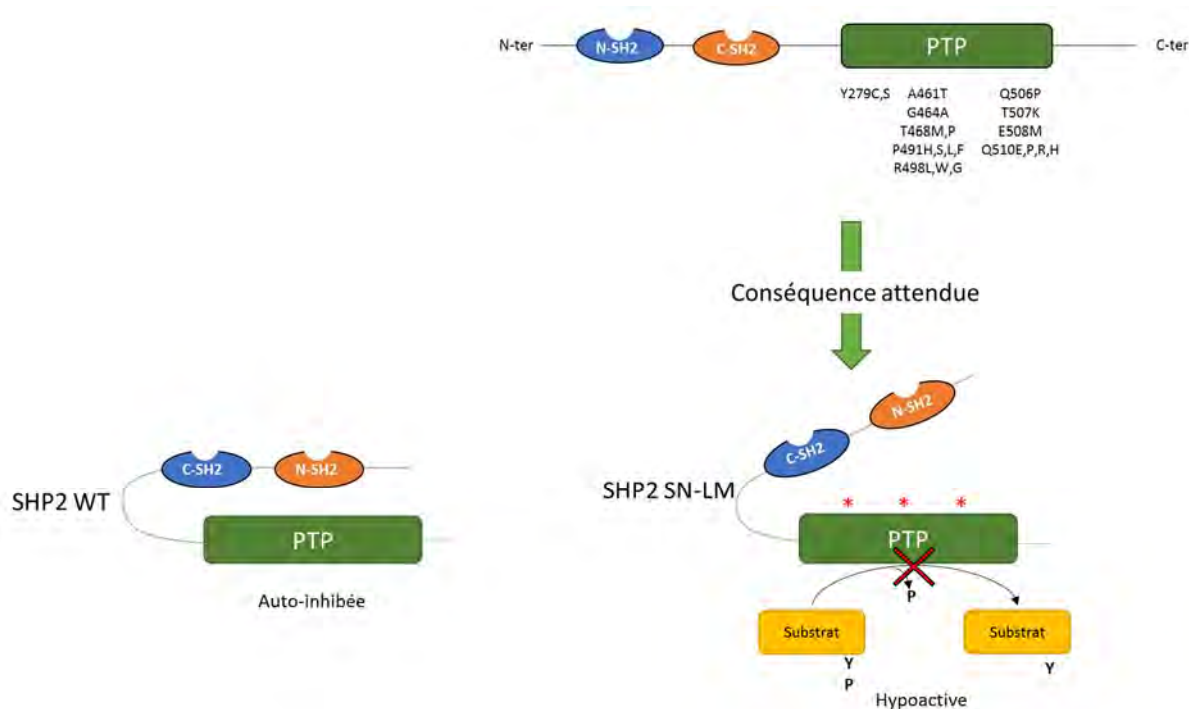


Figure 24 : Conséquences des mutations de PTPN11 associée SN-LM sur la conformation de SHP2

Les mutations SN-LM se retrouvent au niveau du domaine PTP et induisent une hypoactivation de la protéine.

Ainsi il a clairement été montré que les mutations SN-LM de SHP2 induisent un effondrement de son activité phosphatase que ce soit à l'état basal ou sous stimulation par divers phosphopeptides ou agonistes (Hanna et al., 2006; Kontaridis et al., 2006; Tartaglia et al., 2006; Martinelli et al., 2008; Edouard et al., 2010; Marin et al., 2011). En effet, Yu et al., ont montré que la constante catalytique d'hydrolyse d'un substrat (pNPP) par les domaines catalytiques des mutants Y279C et T468M était respectivement 26 et 46 fois plus faible que celle du domaine catalytique sauvage (Yu et al., 2013).

De plus, la modélisation structurale des mutants Y279C et T468M de SHP2 associés au SN-LM montre que ces mutations favorisent la conformation ouverte de la phosphatase et son association avec ses partenaires en déstabilisant l'interaction entre le domaine PTP et le domaine N-SH2 (Kontaridis et al., 2006 ; Yu et al., 2013 ; Qiu et al., 2014). Cette capacité accrue des mutants SN-LM à adopter une conformation ouverte suggère qu'ils pourraient interagir préférentiellement avec leurs activateurs exerçant ainsi un effet dominant négatif sur la forme WT de SHP2. En effet, il a été décrit que ces mutants présentent une plus grande affinité de liaison à des phospho-peptides test comparativement à la forme sauvage de SHP2 (Martinelli et al., 2008 ; Yu et al., 2013). De plus, il a été montré que les mutants Y279C et T468M

s'associent plus précocement, plus fort et plus longtemps que la forme sauvage de SHP2 à la protéine adaptatrice GAB1, sous stimulation par l'EGF (Kontaridis et al., 2006 ; Yu et al., 2013). Enfin, une autre étude révèle une liaison soutenue du mutant Y279C de SHP2 à la protéine adaptatrice IRS-1 à l'état basal et sous stimulation par l'IGF-1 (Marin et al., 2011).

Ainsi, les mutations SN-LM de SHP2 induisent une profonde altération de son activité catalytique et à une destabilisation de sa structure favorisant une conformation ouverte de la protéine. Ceci conduirait la forme de SHP2 associée au SN-LM à exercer un effet dominant négatif sur la forme sauvage en se fixant préférentiellement aux protéines adaptatrices.

d. Conséquences fonctionnelles des mutations SN-LM sur la signalisation et le développement

Signalisation

- **Voie RAS/MAPK** : L'impact des mutations SN-LM de SHP2 sur la signalisation est encore débattu en particulier au niveau de la voie RAS/MAPK.

En effet, il a tout d'abord été rapporté que l'expression de mutants de SHP2 associés au SN-LM (Y279C, T468M et A461T) dans des HEK (cellules rénales embryonnaires humaines) ou dans des embryons de poisson-zèbre provoque une hypo-activation de ERK1/2 en réponse à divers facteurs de croissance comme l'EGF, le FGF ou le PDGF (Kontaridis et al., 2006 ; Stewart et al., 2010). De plus, dans le premier modèle murin de SN-LM portant à l'état hétérozygote la mutation Y279C, Marin et al., ont également observé une hypo-activation de ERK1/2 dans le cœur en réponse à plusieurs agonistes (Marin et al., 2011). Mécanistiquement, cette hypo-activation pourrait résulter du recrutement préférentiel de la forme mutée de SHP2 à celle sauvage diminuant ainsi l'activation de la voie RAS/MAPK (Kontaridis et al., 2006 ; Qiu et al., 2014).

Cependant, plusieurs études ont également montré que les mutants de SHP2 associés au SN-LM pouvaient avoir un effet positif sur l'activation de la voie RAS/MAPK. Ainsi, chez la drosophile et le poisson-zèbre, l'expression de mutants SN-LM conduisent à une hyperactivation de ERK1/2 (Oishi et al., 2006, 2009 ; Bonetti et al., 2014). De plus, Yu et al., montrent que l'expression de ces mutants dans HEK provoque une hyper-activation de ERK1/2 en réponse à l'EGF, ce qui est en contradiction avec l'étude de Kontaridis et al., décrite

précédemment (Choi et al., 2003 ; Kontaridis et al., 2006). Cette différence de réponse pourrait s'expliquer par la dose d'agoniste utilisée, ou par le niveau d'expression des mutants. Enfin il a été montré que dans un modèle murin de SN-LM portant à l'état hétérozygote la mutation T468M, la stimulation à l'insuline induit une hyperactivation de ERK1/2 au niveau du foie, du muscle et des tissus adipeux blancs (Tajan et al., 2014). Cet effet activateur pourrait s'expliquer par le fait qu'un recrutement plus stable de la forme mutée compenserait la faible activité de ce type de mutants (Yu et al., 2013).

- **Voie PI3K** : Le rôle des mutations de SHP2 associées au SN-LM est mieux établi au niveau de la voie PI3K. En effet, il a été montré aussi bien dans des cellules transfectées que dans des fibroblastes de patients ou encore au niveau de cardiomyocytes de rat que les mutants SN-ML induisent une hyperactivation de la voie PI3K en réponse à l'EGF se traduisant par une hyperactivation d'AKT et de ses cibles en aval comme GSK3 β , mTOR, RPS6KB1/p70S6K ou Ribosomal S6 protein (Edouard et al., 2010; Ishida et al., 2011; Schramm et al., 2012, 2013). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* où une hyperactivation d'AKT ou de ses cibles a été mesurée dans des cœurs de poisson-zèbre SN-LM ainsi que dans des cœurs hypertrophiques de modèle murins SN-LM (Marin et al., 2011 ; Schramm et al., 2012).

Développement

- **Cardiopathies** : Comme pour le SN, plusieurs modèles animaux ont permis d'étudier les conséquences de mutation de SHP2 sur les cardiopathies dans le contexte du SN-LM. Ainsi, dans des modèles de poisson-zèbres, alors que la dysfonction cardiaque était initialement associée avec une hypoactivation de ERK1/2, une étude a démontré qu'un traitement avec un inhibiteur de MEK pouvait réverser le phénotype cardiaque de poisson-zèbre exprimant les mutants de SHP2 associés au SN-LM. Ceci suggère que l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK pourrait participer aux cardiopathies associées au SN-LM (Stewart et al., 2010; Bonetti et al., 2014). Ces différences apparentes pourraient s'expliquer par le fait qu'altérer positivement ou négativement la régulation de la voie MAPK durant le développement cardiaque pourrait résulter en des défauts similaires étant donné qu'un niveau ou une durée précise d'activité MAPK est nécessaire pour provoquer des réponses prolifératives ou de différenciation spécifiques. De plus, une autre étude a montré que l'inhibition de MEK pouvait partiellement réverser le phénotype d'hypertrophie cardiaque dans des cardiomyocytes exprimant le

mutant Q510E. Cependant, étant donné l'absence d'hyperactivation des MAPK dans leur modèle, les auteurs ont attribué cet effet aux relations croisées entre les voies RAS/MAPK et PI3K/mTOR (Schramm et al., 2013). En effet, plusieurs études ont identifié un rôle causal de l'hyperactivation PI3K dans la cardiomyopathie hypertrophique associée au SN-LM. La surexpression de mutants de SHP2 associés au SN-LM dans des embryons de poulet, des lignées cellulaires de cardiomyocytes ou dans des cardiomyocytes isolés de rats nouveau-nés résulte en une hypertrophie des cellules cardiaques dépendant de PI3K (Edouard et al., 2010; Ishida et al., 2011; Schramm et al., 2013). De plus, un traitement à la rapamycine reverse l'hypertrophie cardiaque dans des un modèles souris du SN-LM (Marin et al., 2011 ; Schramm et al., 2013), si bien que la rapamycine a été proposée comme traitement palliatif chez un enfant atteint de SN-LM et présentant une cardiomyopathie hypertrophique sévère, en attendant une greffe cardiaque (Hahn et al., 2015).

- **Lentigines et surdité** : Une étude a montré que les lentigines des patients SN-LM contiennent une plus grande proportion de mélanosomes (organites dans lesquels sont synthétisées les mélanines) et que ces mélanosomes sont également de plus grande taille. De façon intéressante, les auteurs associent cette augmentation d'activité des mélanosomes à l'hyperactivation de la voie PI3K/AKT (Motegi et al., 2015). Bien que la physiopathologie de la surdité n'ait jamais été explorée, il est intéressant de noter qu'une population de mélanocytes participe au fonctionnement de l'oreille interne et qu'une corrélation existe entre anomalies de pigmentation et surdité. Un mécanisme commun pourrait donc être impliqué dans ces deux symptômes.

Ainsi l'ensemble de ces données démontre que la dérégulation de l'activité de SHP2, en positif ou en négatif, a des conséquences physiopathologiques importantes (Figure 25).

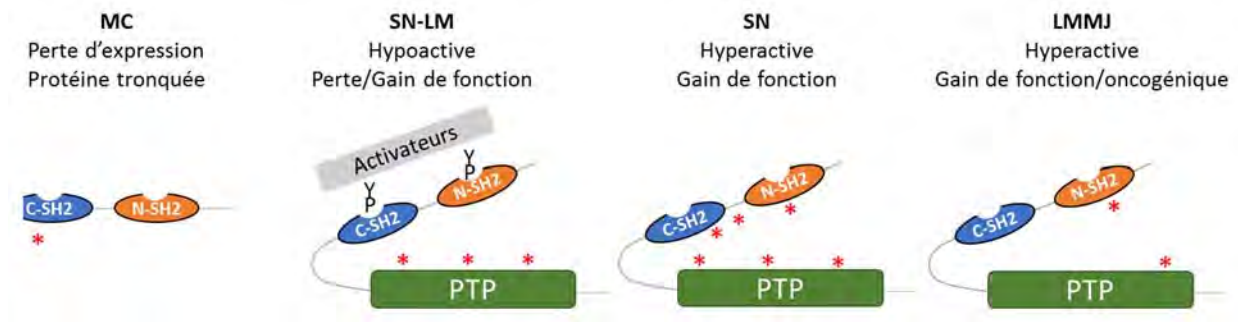


Figure 25 : Association déséquilibre catalytique de SHP2 et maladies

La perte d'expression de SHP2 provoque la Métachondromatose (MC), son hypoactivation le Syndrome de Noonan avec Lentiginos Multiples (SN-LM), son hyperactivation le Syndrome de Noonan (SN) et une hyperactivation encore plus forte les Leucémies Myélomonocytaires Juvéniles (LMMJ).

III. SHP2 et maladies auto-immunes

SHP2 est connue pour augmenter le statut pro-inflammatoire dans plusieurs contextes pathologiques. C'est notamment le cas au niveau d'une maladie auto-immune, le lupus érythémateux systémique, qui a été montré pour être associé à une augmentation de l'activité de SHP2 dans les cellules sanguines mononuclées périphériques (Wang et al., 2016). De plus, l'inhibition de SHP2 augmente la survie d'un modèle murin de lupus en diminuant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Dans un autre contexte, l'expression de SHP2 est augmentée dans des BMDM de souris avec une inflammation pulmonaire aiguë et son inhibition diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Zhao et al., 2016). Il a récemment été montré qu'un modèle d'endotoxémie chez le poisson zèbre induit une importante létalité suite à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, le traitement avec un inhibiteur de SHP2 (11a-1) réduit drastiquement l'expression des cytokines pro-inflammatoires et diminue presque totalement la létalité induite par le LPS avec un effet encore plus prononcé qu'un traitement immunosuppresseur à base de corticostéroïdes (Hsu et al., 2018).

Plusieurs études émettent un parallèle entre le SN et les maladies auto-immunes. En effet, plusieurs cas de patients SN atteints de maladies auto-immunes en particulier de Lupus Érythémateux Systémique (LES) et de Thyroïdite auto-immune ont été rapportés (Tableau 3). Cette association semble importante puisque dans une étude regroupant 37 patients SN, 14% d'entre eux présentent des désordres auto-immuns alors que la fréquence de maladies auto-

immunes dans la population générale aux États-Unis est de 5 à 8% (Quaio et al., 2012). Malheureusement, le manque de test génétique dans ces études ne permet pas de faire d'association entre les maladies auto-immunes et les mutations de SHP2.

Tableau 3 : Liste des cas cliniques de patients atteints à la fois de SN et de maladies auto-immunes (NT : Non Testé ; LES : Lupus Érythémateux Systémique)

Cas	Sexe	Gène muté	Maladie auto-immune	Référence
11 ans	Male	NT	LES	Alanay et al., 2004
20 ans	Male	NT	LES	Martin et al., 2001
5 ans	Femelle	Non Ptpn11	LES	Lopez-Rangel et al., 2005
24 ans	Femelle	NT	LES	Cerpa-Cruz et al., 2013
3 ans	Femelle	Kras	LES	Leventopoulos et al., 2010
28 ans	Male	NT	LES, thyroïdite auto-immune	Lisbona et al., 2009
26 ans	Femelle	NT	LES, maladie cœliaque, thyroïdite auto-immune	Amoroso et al., 2003
32 ans	Femelle	Ptpn11 ^{F285S/+}	LES, thyroïdite auto-immune	Quaio et al., 2012
54 ans	Male	Ptpn11 ^{N308D/+}	Vitiligo	Quaio et al., 2012
8 ans	Femelle	Ptpn11 ^{Y63C/+}	Maladie cœliaque, thyroïdite auto-immune	Quaio et al., 2012
8 ans	Femelle	Ptpn11 ^{D106A/+}	Syndrome anti-phospholipide	Quaio et al., 2012
12 ans	Femelle	NT	Syndrome anti-phospholipide	Yamashita et al., 2004
6 ans	Femelle	Ptpn11 ^{N308D/+}	Hépatite auto-immune	Loddo et al., 2015

Cependant, il a récemment été montré dans un modèle souris de LES que l'activité de SHP2 est fortement augmentée dans cette maladie (Wang et al., 2016). Ces auteurs montrent également que l'inhibition de SHP2 diminue la production de cytokines associées au LES, réduit la taille de la rate, diminue les lésions de la peau améliorant ainsi la survie. Les auteurs identifient donc SHP2 comme un régulateur critique de la pathogénèse du LES et une potentielle cible thérapeutique.

IV. SHP2 et métabolisme

Comme nous l'avons vu précédemment, SHP2 est fortement impliquée dans le métabolisme, que ce soit au niveau de l'adiposité, de la dépense énergétique ou encore du métabolisme glucidique. Ainsi, plusieurs études montrent que les patients SN et SN-LM (avec mutation de *PTPN11*) présentent un IMC diminué (Binder et al., 2012; Malaquias et al., 2012).

Récemment, des travaux du laboratoire ont caractérisé un modèle murin du SN-LM qui porte la mutation T468M à l'état hétérozygote. Dans ce modèle, les animaux ont une adiposité réduite et sont résistants à l'obésité quand nourris avec un régime gras. Cette adiposité réduite est associée avec une adipogénèse défectueuse, une augmentation de la dépense énergétique ainsi qu'une augmentation de l'activité et de la biogénèse mitochondriale. La réduction de l'adiposité étant réversée suite à un traitement par un inhibiteur de MEK, cela suggère que l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK est responsable de ce phénotype (Tajan et al., 2014).

Cette caractérisation a également mis en évidence une hyperphosphorylation d'AKT au niveau du foie, des muscles et des tissus adipeux blancs sous stimulation à l'insuline induisant une augmentation de l'uptake de glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline (Tajan et al., 2014). L'hypoactivation de SHP2 semble donc avoir un rôle positif sur la sensibilité à l'insuline.

Ainsi, étant donné les nombreux rôles de SHP2 dans la régulation du métabolisme glucidique, on peut se demander si elle pourrait participer à l'apparition de l'obésité et/ou des désordres associés comme l'insulino-résistance ou le diabète de type 2. En effet, nous avons vu précédemment que SHP2 est surexprimée (et possiblement hyperactive) dans le foie et les tissus adipeux en situation d'obésité (Bettaieb et al., 2011; Nagata et al., 2012). De façon intéressante, des polymorphismes de *PTPN11* ont été liés au niveau plasmatique de lipides (Jamshidi et al., 2007; Lu et al., 2008; Jia et al., 2013), et *PTPN11* fait également partie des 25 gènes associés au syndrome métabolique (Kraja et al., 2014) suggérant un rôle de SHP2 dans la survenue de l'insulino-résistance liée à l'obésité.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résultats expérimentaux

SHP2 plays a direct role in inflammation-triggered insulin resistance

I. Introduction

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, comprendre les mécanismes de l'insulino-résistance, en tant que cause majeure du DT2, est un enjeu de santé publique afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter la cause, et non les conséquences de cet état. L'état de l'art sur la tyrosine phosphatase SHP2 nous permet d'envisager qu'elle puisse être une cible prometteuse dans ce contexte. En effet, outre son implication cruciale au cours du développement, de nombreuses études montrent un rôle prépondérant, mais complexe, de SHP2 dans la régulation du métabolisme glucidique. Cette phosphatase intervient dans la signalisation insulinique, participe à la biosynthèse d'insuline dans le pancréas et régule positivement la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle mais négativement au niveau du foie. De plus, les précédents travaux de l'équipe ont montré qu'un modèle murin exprimant une forme hypoactive de SHP2 (souris SN-LM) présente une meilleure tolérance au glucose associée à une hyperactivation de la voie PI3K en réponse à l'insuline. Ces données suggèrent, à l'échelle de l'organisme, un rôle négatif de SHP2 dans la régulation du métabolisme glucidique et la possibilité qu'elle puisse promouvoir l'insulino-résistance. A l'appui de cette hypothèse, plusieurs études ont rapporté que l'expression de SHP2 était induite en situation d'obésité au niveau du foie, et du tissu adipeux. Cependant, il reste à démontrer si et comment SHP2 joue un rôle dans le développement de l'insulino-résistance.

Pour aborder cette question, nous avons choisi de tirer parti d'une maladie génétique, appelée le syndrome de Noonan, causée par une mutation hyper-activatrice de SHP2. Les maladies génétiques, véritables « expériences de la nature », représentent en effet des conditions uniques pour évaluer le potentiel physiopathologique d'une protéine et évaluer l'impact au long terme de sa manipulation dans un système pertinent au regard de la maladie humaine.

L'étude du métabolisme glucidique de patients atteints de ce syndrome, de pair avec l'analyse d'un modèle murin de cette maladie, nous a permis de déterminer l'impact de l'hyperactivation de SHP2 dans le développement de l'insulino-résistance et les mécanismes mis en jeu. Les résultats obtenus sont regroupés sous la forme d'un manuscrit qui sera très prochainement soumis pour publication.

II. Résultats

SHP2 plays a direct role in inflammation-triggered insulin resistance.

Romain Paccoud¹, Thomas Edouard², Mylène Tajan¹, Alizée Dortignac¹, Ophélie Péreira¹, Maxime Branchereau¹, Jean Personnaz¹, Sophie Branka¹, Simon Deleruyelle¹, Sophie Le Gonidec¹, Mickael Canouil³, Jacques Weill³, Benjamin G, Neel⁴, Toshiyuki Araki⁴, Christophe Heymes¹, Rémy Burcelin¹, Isabelle Castan¹, Philippe Valet¹, Cédric Dray¹, Jean-Philippe Pradère^{1,*}, Armelle Yart^{1,*}

1Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM UMR 1048, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

2Endocrine, Bone Diseases, and Genetics Unit, Children's Hospital, Toulouse University Hospital, Toulouse France

3Institut Pasteur de Lille, CNRS UMR 8199, Université de Lille Lille, European Genomic Institute for Diabetes, Lille, France France

4Laura and Isaac Perlmutter Cancer Center, NYU-Langone Medical Center, NY 10016, USA

Abstract

With a constantly growing number of affected patients, identifying potent therapeutic strategies for type 2 diabetes represents a major challenge ahead. Within the ominous octet synergizing to hyperglycemia, resistance of peripheral tissues (*i.e.* liver, muscle and adipose tissue) to insulin action is a key event in diabetes onset. Therefore, therapeutic strategies aiming at restoring insulin sensitivity are highly relevant, with the prerequisite of understanding insulin resistance-promoting mechanisms. Some data evidenced the tyrosine phosphatase SHP2 plays key roles in the regulation of glucose metabolism in several models. However, whether SHP2 can promote insulin resistance and be a therapeutical target is unknown. Using Noonan syndrome (NS), a rare disease caused by activating mutations of SHP2, as a system model, we found that activating SHP2 mutations triggers glucose intolerance both in human and in mice. This phenotype is uncoupled from unbalanced lipid management (*e.g.* obesity, ectopic lipid deposits), but correlates with constitutive inflammation of metabolic tissues. Importantly, strategies aiming at reverting metaflammation in NS mice, by the mean of wild type (WT) bone marrow transplantation or clodronate-mediated macrophage depletion, improved glucose tolerance. Mechanistically, we identified that activating SHP2 mutation curves macrophage behaviour towards a pro-inflammatory phenotype. Supporting a primary role of SHP2 hyperactivation in promoting inflammation-triggered insulin resistance, oral treatment of obese/diabetic mice with the SHP2 inhibitor SHP099 reverted their glucose intolerance, while reducing the inflammation of their metabolic tissues. Taken together these results reveal SHP2 activation directly promotes inflammation-triggered insulin resistance and modulation of SHP2 activity has an important impact on glucose homeostasis *in vivo*.

Introduction

Despite reaching an epidemic status worldwide, type 2 diabetes (T2D) still misses efficient and specific therapeutic strategies because of its multifactorial origin. Indeed, many defects -the so-called ominous octet- contribute to T2D-causing hyperglycemia: decreased insulin/increased glucagon secretion by pancreas, decreased incretin effect at intestine level, increased hepatic glucose production (HGP), neurotransmitter dysfunction, decreased glucose uptake by the muscle, increased lipolysis by adipose tissue and increased renal glucose reabsorption. So far, most of the available treatments are symptomatic, aiming to reduce hyperglycemia, either by improving insulin sensitivity in peripheral tissues (*e. g.* metformin, thiazolidinediones), stimulating insulin secretion (*e.g.* GLP1 agonists, sulfonylureas) or glucose excretion (*e.g.* SGLT2). However, these glucose-lowering therapies are often associated to adverse effects, notably hypoglycemia, weight gain and liver toxicity (Zheng et al., 2018).

A major challenge ahead is to develop therapeutic strategies that could target the causal mechanism(s) of the disease. While behavioural management of obesity/excess weight has proven to efficiently prevent T2D, drug-based therapies represent an important, sometimes necessary, alternative. In this setting, resistance of peripheral tissues to insulin action is a key event in diabetes onset, so that therapeutic strategies aiming at restoring insulin sensitivity are highly relevant, with the prerequisite of understanding insulin resistance-promoting mechanisms.

The tyrosine phosphatase SHP2, encoded by the *PTPN11* gene, has been identified as a master regulator of glucose metabolism. SHP2 is a ubiquitous protein tyrosine phosphatase that regulates, negatively but also positively, key signalling pathways (*e.g.* RAS/MAPK, PI3K/AKT) in response to a wide range of growth factors, cytokines and hormones, thereby playing pleiotropic functions during development and homeostasis (Tajan et al., 2015). *In vitro* studies have shown that SHP2 negatively regulates insulin signaling, where it can dephosphorylate the PI3K binding sites borne by IRS1 or promote ERK1/2 -dependent IRS1 phosphorylation, both resulting in PI3K/AKT signaling downregulation (Lima et al., 2002; Myers et al., 1998). However, tissue-specific invalidation of *Ptpn11* in mice aiming at elucidating the role of SHP2 in glucose metabolism regulation *in vivo* gave rise to contradictory results. Indeed, SHP2 knock out in liver improved insulin sensitivity, but its invalidation in muscle, pancreas or brain impaired glucose metabolism, possibly because of different

pathophysiological mechanisms (*e.g.* obesity in central SHP2 invalidation, ectopic lipid deposits in muscle KO, differential signaling defects in liver vs muscle KO) (Banno et al., 2010; do Carmo et al., 2014; Krajewska et al., 2008; Maegawa et al., 1999; Princen et al., 2009; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2009). However, systemic expression of a hypoactive mutant of SHP2 resulted in improved insulin sensitivity, suggesting a global role of SHP2 in promoting insulin resistance (Tajan et al., 2014). Supporting this hypothesis, SHP2 overexpression has been detected in metabolic tissues of several animal models of obesity/diabetes, possibly in line with the feeding/fasting status and SHP2 association with IRS1 negatively correlates with AKT phosphorylation in animal models of insulin resistance (Ahmad and Goldstein, 1995; Bettaieb et al., 2011; Bonini et al., 1995; Lima et al., 2002; Nagata et al., 2012). In addition, *PTPN11* has been identified as one of the 25 candidates for metabolic syndrome in human (Kraja et al., 2014).

A powerful approach to firmly establish the role of a protein in a pathology and the potency of its targeting is to take advantage of genetic diseases. Indeed, as unique conditions being caused by single genetic events, they can be highly invaluable to assess the pathophysiological power of a gene product and can provide important insights into the effects of manipulating specific proteins or pathways in a system that is directly relevant to human diseases. Therefore, such ‘experiments of nature’ can highlight powerful targets, predict potential adverse long-term effects and provide insights into treatment indication.

Thus, to understand the role of SHP2 in the pathophysiology of insulin resistance, we used Noonan syndrome (NS) as a system model. NS is a relatively frequent (1/2000 live birth) autosomal dominant genetic disease characterized by a distinctive phenotypical triad, associating cranio-facial features, cardiopathies, and growth retardation, as well as predisposition to myeloproliferative disorders (*i.e.* juvenile myelomonocytic leukaemia, JMML). NS is mainly caused by activating mutations of SHP2, representing a valuable model to assess the consequences of systemic SHP2 hyperactivation (Tajan et al., 2018).

In this study, we explored the metabolic status of NS, both in NS patients carrying mutations on *PTPN11*, and in a mouse model of the disease, heterozygously expressing the D61G mutant of SHP2 (SHP2^{D61G/+}) (Araki et al., 2004). Our data highlights that hyperactive SHP2 mutants promote an insulin resistance condition uncoupled from unbalanced lipid management and triggered by constitutive metaflammation, through direct alterations of

macrophage behaviour. Consistent with this direct role of SHP2 in promoting inflammation-mediated insulin resistance, SHP2 pharmacological inhibition improves glucose tolerance and reduces inflammation in obese/diabetic mice.

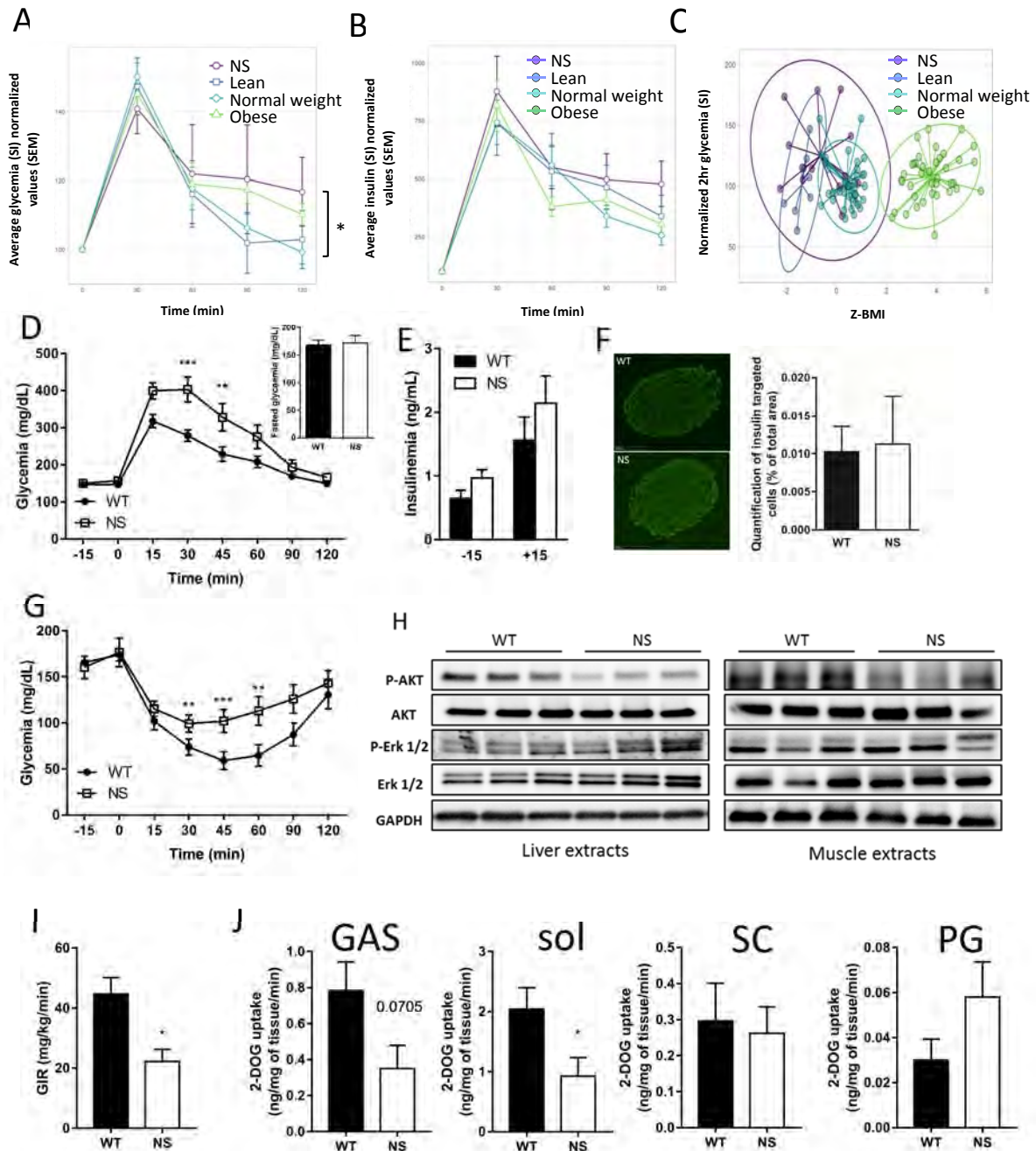


Figure 1: Systemic SHP2 hyperactivation is associated to glucose intolerance

(A-C) NS-PTPN11 patients and age and gender-matched normal weight, lean and obese patients were subjected to OGTT. (A) OGTT curve. (B) Insulinemia curve. (C) Scatter plots of normalized 2hr glycemia/Z-BMI. Values are expressed as mean \pm SEM, $n = 13-39$ in each group, mixed model, $*p < 0,05$, for NS versus normal weight. (D-H) Phenotyping of NS *Ptpn11*^{D61G/+} mice. (D) Oral glucose tolerance test on 10-12 week-old WT and NS animals. (E) Fasting and Glucose-induced insulinemia during OGTT. (F) Insulin immunofluorescence on pancreas section. (G) Insulin tolerance test on 10-12 weeks WT and NS animals (H) Immunoblotting in hepatic and muscle tissue after insulin injection (10 min) in 6 hr fasted WT and NS mice (20 weeks old) on normal diet. (I, J) NS and WT animals were subjected to a hyperinsulinemic euglycemic clamp and glucose infusion rate was determined (I), then glucose uptake was measured in gastrocnemius (GAS) and soleus (sol) muscles, and in subcutaneous (SC) and perigonadal (PG) adipose tissues (J). Values are expressed as mean \pm SEM, $n = 9-12$ in each group, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, Bonferroni post test when 2-way ANOVA was significant or unpaired Student t-test when necessary.

Results

Systemic expression of hyperactive SHP2 is associated to glucose intolerance and insulin resistance

To get first insights into the metabolic impact of SHP2 hyperactivation, we analyzed clinical data of a cohort of 21 paediatric patients with NS with genetic confirmation for *PTPN11* mutation (Table S1). Body mass index (BMI) was significantly lower in NS-PTPN11 patients when compared to age and gender-matched subjects (control), confirming previous results (Cessans et al., 2016). Fasted glycemia and fasted insulinemia were in the normal range. When challenged for oral glucose tolerance test (OGTT), NS-PTPN11 patients displayed similar rise in glycemia and insulinemia as normal weight subjects (Tables 1 and S2). However, normalized (*i.e.* expressed as % of fasted value) glycemia kept more elevated after 2hrs and normalized 2hrs insulinemia was also increased in NS-PTPN11 patients (Figure 1A and 1B, Tables 1 and S2). Global analysis of the glycemia and insulinemia profiles revealed a significant difference between NS-PTPN11 patients and age- and gender-matched normal weight subjects (Figure 1 A and B). We next compared the metabolic profile of NS-PTPN11 patients to the one of obese patients. As expected, obese patients displayed increased fasted glycaemia, as well as significantly higher fasted insulinemia, resulting in higher HOMA-IR and QUICKI (Tables 1 and S1). Despite diametrically opposite BMI values in NS-PTPN11 and obese patients, 2hrs glycemia and 2hrs insulinemia, as well as normalized parameters, remained high in the 2 groups compared to normal weight subjects, and their glycemia curves were very similar (Figure 1A-B, Tables 1 and S1). Thus, these results reveal that NS-PTPN11 patients present similar features of glucose intolerance as obese subjects despite opposite BMI, although neither NS-PTPN11 nor obese patients displayed obvious impaired fasted hyperglycemia levels or impaired glucose tolerance (IGT) (Figure 1C). Importantly, this profile was not observed in a small group of lean, BMI-matched subjects, who displayed fasted hyperglycemia but normalized their glycemia during OGTT as efficiently as normal weight individuals (Tables 1 and S1).

We next assessed glucose management in SHP2^{D61G/+} mice (referred to as NS mice). For this, 10-12-week-old WT and NS animals were first assayed for OGTT. Upon normal chow, NS animals displayed normal fasted glycemia but significantly decreased glucose tolerance when compared to their WT littermates (Figure 1D, B). Glucose intolerance pattern was also found

in 20-old NS mice, although to a lesser extent (Figure S1A). Fasted insulinemia and glucose-induced insulinemia were similar between both groups, as was insulin immunostaining of pancreas section (Figure 1E, F). However, insulin tolerance test revealed insulin intolerance in NS animals (Figure 1G) and insulin-evoked AKT phosphorylation was markedly decreased in metabolic tissues from NS mice (Figure 1H). Then, whole-body glucose utilization was determined in conscious mice during a euglycemic-hyperinsulinemic clamp. Glucose infusion rate (GIR) was half reduced in NS mice compared to WT littermates, which came along with decreased glucose uptake in muscle (Fig. 1I, J). This reduced response to insulin stimulation was normalized when using higher dose of insulin (Figure S1B-D).

Altogether, these results reveal that systemic expression of hyperactive SHP2 is associated to glucose intolerance and insulin resistance in mouse and human.

Table 1: OGTT parameters of NS-PTPN11 patients and lean, normal weight and obese individuals

	NS	lean	NS/lean. p	Normal weight	NS/norm. p	obese	NS/obese.p
n	10	8	-	30	-	30	-
Male-Female (% of female)	6-4 (40)	4-4 (50.0)	1.000	18-12 (40)	1.000	18-12 (40)	1.000
Age (years) (mean (sd))	11 (3.41)	14.09 (3.42)	0.075	12.23 (2.56)	0.31	11.31 (2.88)	0.8
Z-BMI (mean (sd))	-0.72 (1.07)	-1.32 (0.36)	0.12	0.36 (0.54)	0.01	3.89 (0.81)	<0.0001
Fasted Glycaemia (SI) (mean (sd))	4.59 (0.58)	4.94 (0.53)	0.2	4.74 (0.51)	0.46	4.83 (0.37)	0.23
Fasted Insulinemia (SI) (mean (sd))	49.16 (35.1)	58.08 (37.44)	0.62	48.13 (30.36)	0.94	107.02 (75.42)	0.003
2hr Glycaemia (SI) (mean (sd))	5.29 (1.34)	5.05 (1.19)	0.68	4.65 (0.74)	0.18	5.33 (0.93)	0.94
2hr Insulinemia (SI) (mean (sd))	258.35 (145.75)	190.55 (188.96)	0.48	102.7 (107.96)	0.07	323.38 (340.16)	0.48
Normalized 2hr Glycaemia (%) (mean (sd))	116.76 (33.13)	102.90 (25.48)	0.33	99.25 (19.41)	0.14	110.22 (17.14)	0.56
Normalized 2hr Insulinemia (%) (mean (sd))	478.04 (242.74)	339.06 (273.85)	0.36	256.09 (239.04)	0.11	304.74 (199.03)	0.19
HOMA-IR (mean (sd))	1.54 (1.2)	1.92 (1.43)	0.56	1.5 (1.04)	0.93	3.34 (2.35)	0.005
QUICKI (mean (sd))	0.16 (0.02)	0.16 (0.02)	0.52	0.16 (0.02)	0.94	0.14 (0.01)	0.017

Hyperactive SHP2-associated glucose intolerance is not due to adipose tissue dysfunction

It is well established that glucose intolerance/insulin resistance can arise from adipose tissue dysfunction, resulting in ectopic lipid deposits in metabolic tissues (*e.g.* liver, muscle) and lipotoxicity. Such situation classically occurs during obesity but also in lipoatrophic/lipodystrophic diseases, because adipose tissue storage capacities are outreached or insufficient, respectively. We thus explored adiposity and lipid distribution in NS-PTPN11 patients, and found they displayed lower-than-average adiposity. Plasma triglycerides and LDL were in the normal range, but cholesterol and HDL levels were significantly reduced. Further analysis revealed that almost all patients have hypoleptinemia, in accordance with their reduced adiposity (Table S1). SHP2^{D61G/+} mice displayed reduced body weight as well as decreased absolute fat and lean masses when compared with their SHP2^{+/+} littermates, consistent with their short stature (Figure S2A-D). Interestingly, while lean mass

proportion was similar in both genotypes, fat proportion was significantly reduced in NS animals, as was the weight of perigonadic fat pads and leptinemia, highlighting reduced adiposity (Figure 2A-C). The differences in weight, body composition, and leptinemia were further enhanced when animals were high fat-fed, suggesting that NS animals were resistant to high-fat diet (HFD)-induced obesity (Figure S3A-D). Importantly, high-fat fed NS and WT mice display similar glucose and insulin intolerance, although WT, but not NS mice, developed fasted hyperglycaemia and hyperinsulinemia (Figure S3E-H). Plasma triglycerides of NS mice were normal under standard diet or HFD (Figures 2D and S3I). In contrast, cholesterol levels were significantly lower in NS mice due to lower HDL levels, and free fatty acids were similar in WT and NS animals, whatever the diet was (Figures S2E-H and S3I). Triglyceride quantification in metabolic tissues from NS mice showed normal or reduced lipid deposits in muscle and liver, respectively (Figure 2E-G), a difference that widened upon HFD (Figure S3J, K). Altogether, these data reveal that NS condition is associated to reduced adiposity, normal or lower-than-average plasma lipids and reduced ectopic lipids deposits, suggesting that hyperactive SHP2-triggered glucose intolerance/insulin resistance is not caused by defects in lipid storage and subsequent lipotoxicity.

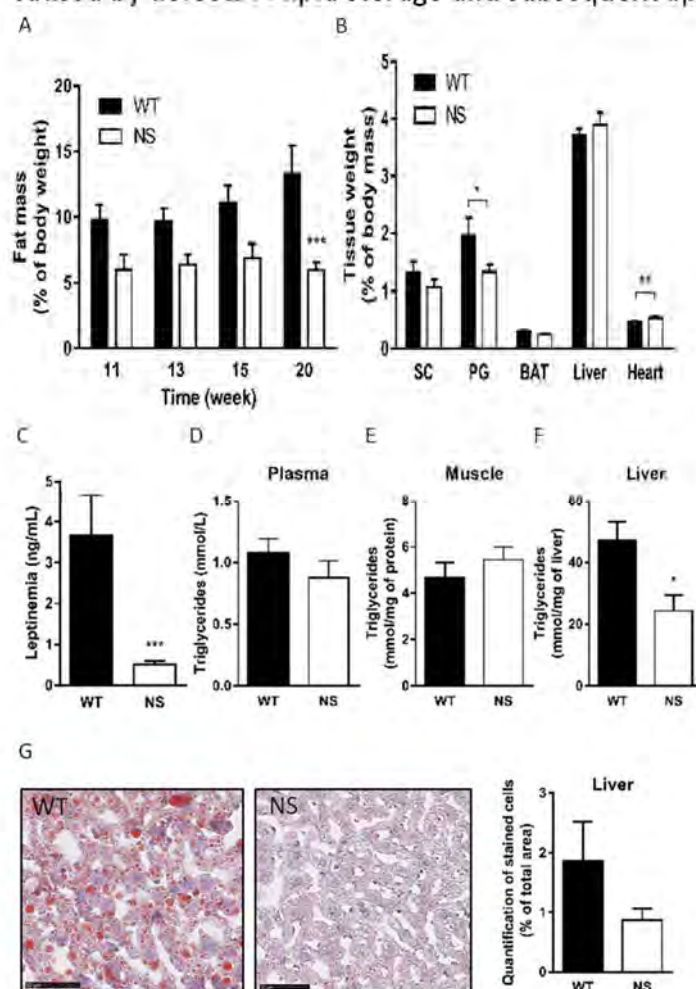


Figure 2: Hyperactive SHP2 - associated insulin resistance is not related to impaired lipid metabolism

(A) WT and NS mice have been kept in normal diet, and their proportion of fat mass has been measured with EchoMRI at different ages. (B-E) At 20 weeks of age, overnight fasted animals were euthanized and the following analyses were performed. (B) Weight of different tissues, (C) Leptinemia determined by ELISA, (D-F) Triglycerides quantification in plasma, muscle, and liver. (G) Red oil O staining on liver sections and quantification.

Values are expressed as mean \pm SEM $n = 8-12$ in each group * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Mann & Whitney test.

Reduced adiposity, but not glucose intolerance, is reverted by chronic MEK inhibition.

It is well known that a large part of SHP2's biological activity relies on its capability to promote RAS/MAPK activation. Consistently, works over the past years performed in patient cells or in mouse models have clearly demonstrated that NS-PTPN11-associated clinical traits, including cardiopathies, cranio facial defects or growth retardation are causally linked to RAS/MAPK hyperactivation (Araki et al., 2009; Araki et al., 2004; De Rocca Serra-Nedelec et al., 2012; Lee et al., 2014; Nakamura et al., 2007; Nakamura et al., 2009; Wu et al., 2011). We thus investigated whether RAS/MAPK hyperactivation also promotes the metabolic phenotype found in the SHP2^{D61G/+} mice. Chronic treatment with PD0325901 efficiently reduced ERK1/2 hyperphosphorylation in those animals (Figure S5A). This treatment resulted in a significant increase in body weight, fat mass and leptinemia of NS mice (Figure S5B-D). In contrast, glucose intolerance was not improved in PD0325901-treated NS mice compared to vehicle-injected animals (Figure S5E). Thus, these results suggest that the impaired glucose tolerance promoted by hyperactive SHP2 is not due to RAS/MAPK hyperactivation, and further exemplify the uncoupling between adiposity and glucose intolerance in this model.

Hyperactive SHP2 mutant drives a pro-inflammatory phenotype in the metabolic tissues

It is well established that low-grade inflammation can drive glucose intolerance and insulin resistance, for instance in an obesity setting and also in chronic inflammatory conditions (Bahtiyar et al., 2004; Wellen and Hotamisligil, 2005). Because several reports have shown that SHP2 can drive a pro-inflammatory phenotype (Tao et al., 2014; Xu et al., 2017; Zhao et al., 2016), we assessed the inflammatory status in metabolic tissues from SHP2^{D61G/+} mice. Gene expression analysis revealed a significant increase of several immune cell markers (CD45, CD8), in particular macrophages (F4/80, CD11b, CD11c), notably in liver and white adipose tissue (WAT), as well as an upward trend for gene expression of several pro-inflammatory cytokines (IL6, IL1 β , MCP1, TNF α) (Figure 3A, S4A-C). Chronic treatment with PD0359201 did not modify this inflammatory profile (Figure S5F). Plasma IL6 and TNF α followed a similar pattern, associated to higher circulating leucocytes and monocytes (Figure 3B and C). Quantification of pro-inflammatory macrophages (F4/80+, CD11b+, CD11c+ cells) in stromal

fractions from WAT, muscle and liver by flow cytometry (Figure 3D-F) confirmed significant pro-inflammatory macrophage infiltrates in the different metabolic tissues of NS mice.

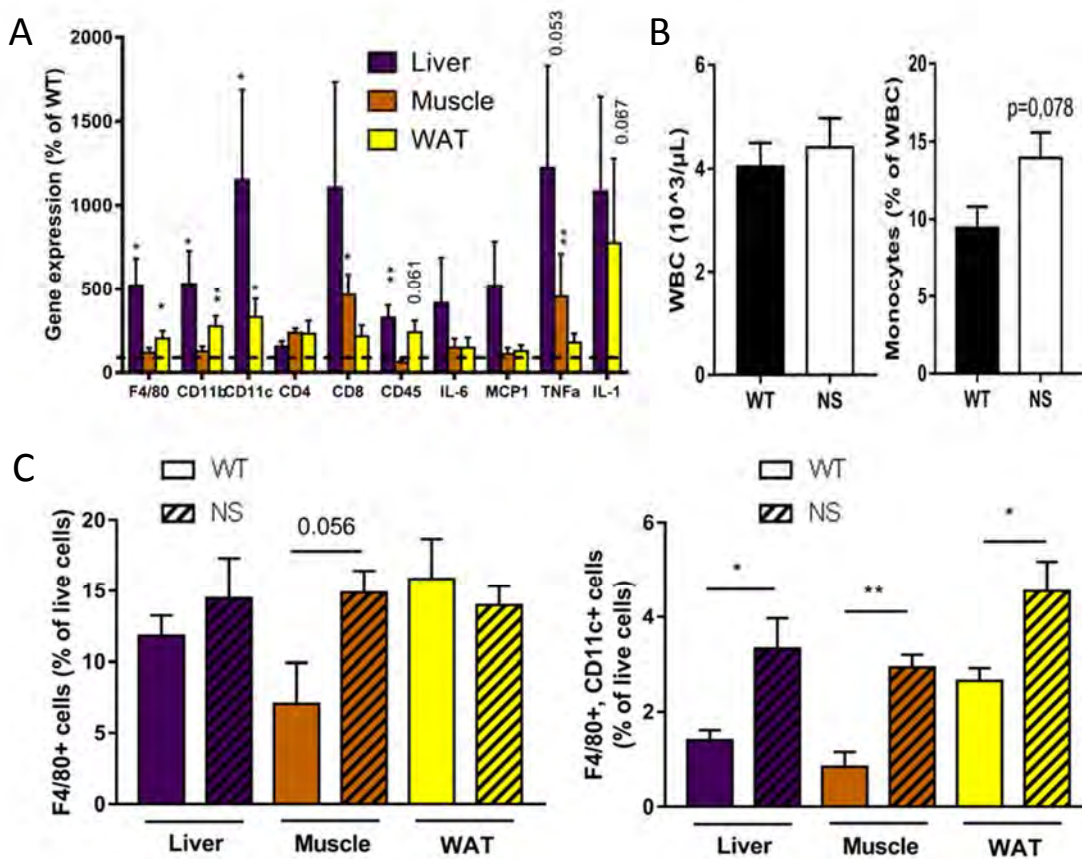


Figure 3: Mice with hyperactive SHP2 display a metaflammation phenotype

(A) Expression of inflammation markers was quantified by qRT-PCR on liver, white adipose tissue and muscle from 20 week-old WT and NS mice. (B) Leucocytes and monocytes quantification using a blood analyzer. (D-F) Quantification by flow cytometry of F4/80+ and CD11c+ cells (defined as viable CD45+, F4/80+ and CD11b+) from liver (D), muscle (E) and WAT (F) derived stromal cells from WT and NS mice. Values are expressed as mean \pm SEM n=7-10 in each group, * p < 0,05, ** p < 0,01. Student t-test.

Reduction of metaflammation alleviates glucose intolerance in SHP2^{D61G/+} mice.

As a first attempt to evaluate if this inflammatory profile contributes to glucose intolerance in SHP2^{D61G/+} mice, we performed bone marrow (BM) transplantation (Figure 4A, B). Repopulation of NS mice with WT BM (NW) resulted in a significant reduction of the inflammatory markers in the metabolic tissues, associated with a reduction of IL6 and TNF α levels (Figure 4C-E). Interestingly, this decreased metaflammation came along with an

improvement of the glucose tolerance of NW mice when compared to NS reconstituted (NN) animals (Figure 4F, G), suggesting that SHP2^{D61G/+} hematopoietic cells were necessary to promote glucose intolerance.

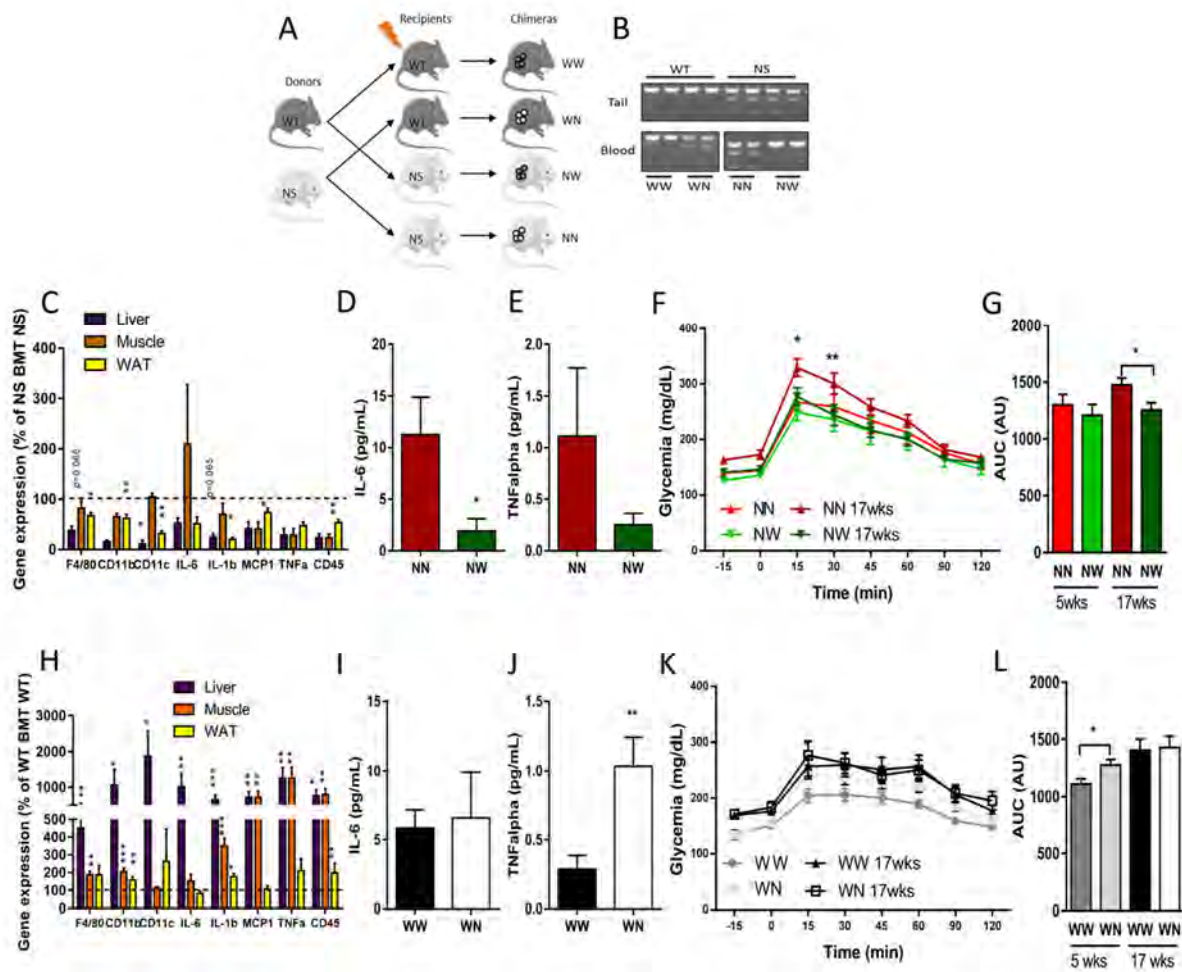


Figure 4: The glucose intolerance phenotype of SHP2^{D61G/+} mice is transferred with hematopoietic cells

(A) Scheme of bone marrow transplantation (BMT). At 10 weeks of age, WT and NS recipient mice were irradiated, then repopulated with WT or NS bone marrow cells. (B) Representative genotyping using DNA from blood or tail as templates. (C-G) Comparison of WN vs WW mice: mRNA expression of tissues inflammation markers (C), cytokine plasma levels (D, E), OGTT (F, G). (H-L) Comparison of NW vs NN mice: mRNA expression of tissues inflammation markers (H), cytokine plasma levels (I, J), OGTT (K, L). Values are expressed as mean \pm SEM n=8-14 in each group, 2-way ANOVA with Bonferroni post test when 2-way ANOVA was significant for OGTT curve and unpaired Student t-test, *p< 0,05, **p< 0,01, ***, p<0,001.

Conversely, transplantation of NS BM in WT mice (WN) significantly increased their inflammatory status (Figure 4H-J), which was associated with an impairment of their glucose tolerance (Figure 4 K, L), suggesting that SHP2^{D61G/+} hematopoietic cells can trigger glucose

intolerance in a WT environment. Of note, the difference between WN and WW shrunk over time, possibly because of a repopulation with host hematopoietic cells or as a result of the important fat mass gain (data not shown).

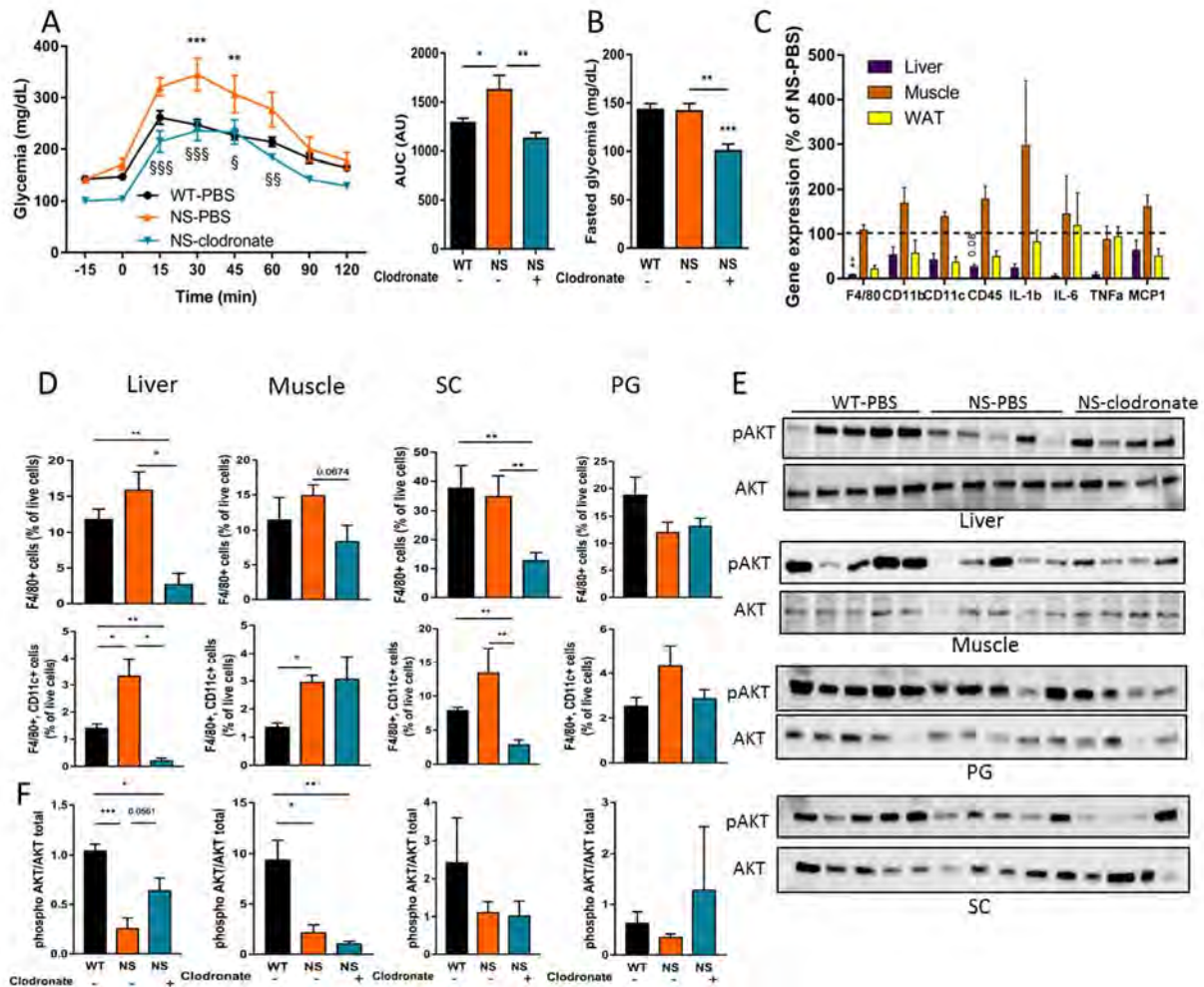


Figure 5: Macrophage depletion reverses glucose intolerance in *SHP2^{D61G/+}* mice

NS mice were injected with clodronate or vehicle over a 10 days period, then the following analyses were performed. (A) Oral glucose tolerance test. Values are expressed as mean \pm SEM, $n=8-10$ in each group 2-way ANOVA with Bonferroni post test, **, $p<0,01$, *** $p<0,001$ for WT versus NS, §, $p<0,05$, §§, $p<0,01$, §§§ $p<0,001$ for NS-vehicle versus NS-clodronate, and Student t-test for AUC values. (B) Fasted glycemia was measured. (C) mRNA expression of inflammation markers was determined by qRT-PCR in tissues from clodronate-treated NS mice compared to PBS-injected NS animals. (D) Quantification of F4/80+ and CD11c+ cells (defined as viable CD45+, F4/80+ or viable CD45+, F4/80+ and CD11b+) in stromal fractions from liver, WAT (SC: subcutaneous and PB: perigonadic) and muscle after clodronate treatment. Values are expressed as mean \pm SEM, $n=4$ in each group, unpaired Student t-test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$. (E) Insulin-evoked AKT phosphorylation in liver, muscle and WATs from WT and NS mice injected with vehicle or clodronate. (F) Quantification of phospho-AKT western blots. Values are expressed as mean \pm SEM, $n=4-5$ in each group, unpaired Student t-test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

We next assessed the specific role of macrophages on NS-associated glucose intolerance. Macrophage depletion by the mean of clodronate injection had no effect on WT animals (data not shown), but significantly improved glucose tolerance of NS mice (Figure 5A) at least in part through an effect on fasted glycaemia (Figure 5B). Expression of inflammation markers was markedly reduced in the liver, and to a lesser extent in the adipose tissue, of clodronate-treated NS mice, but not in their muscle (Figure 5C). Moreover, clodronate almost abolished F4/80+ and CD11c+ cells infiltration in the liver and strongly reduced it in the perigonadal adipose tissue, but had no effect on CD11c+ cell infiltrate in muscle or in subcutaneous WAT (Figure 5D). Consistent with this, insulin-evoked AKT phosphorylation was restored in the liver but not in the muscle of clodronate-treated SHP2^{D61G/+} mice, while this parameter was very heterogeneous in subcutaneous and perigonadal WAT (Figure 5E, F). Since perigonadal AT has a limited contribution on whole-body glucose uptake (Figure 1J), the improvement of glucose tolerance upon clodronate treatment may be limited to a specific effect on insulin sensitivity in the liver, possibly through restored HGP suppression, which could also explain the strong effect of clodronate treatment on fasted glycaemia. Altogether, these results demonstrate that the metaflammation phenotype displayed by SHP2^{D61G/+} mice is responsible, at least in part, for their glucose intolerance.

Hyperactive SHP2 shifts macrophage identity towards a pro-inflammatory profile.

We next investigated the direct impact of hyperactivating SHP2 mutation on macrophage function. To this aim, bone marrow derived macrophages (BMDMs) were prepared from WT and SHP2^{D61G/+} mice. Expression of pro-inflammatory markers was significantly increased (Figure 6A), suggesting that activating SHP2 mutation curves macrophages towards a pro-inflammatory phenotype. We next assessed macrophage activation following LPS treatment by monitoring p65 phosphorylation and iKB accumulation over time by western blot. As shown in Figure 6B and C, BMDMs derived from SHP2^{D61G/+} mice were pre-activated and more sensitive to LPS stimulation than WT BMDMs.

We next performed an in depth characterization of macrophages, F4/80 positive cells, from liver stromal fraction, using single cell RNA sequencing. Among the differentially expressed genes, several markers of macrophage differentiation and (Egr1, Jun, Fos) were down-

regulated in NS, and markers of Kupffer cells (*Clec4f*, *Vsig4*, *Fabp7*) and of activated macrophages (*Fcna*, *Cd163*, *Cd5l*) were upregulated. Interestingly, upregulated genes were found in a NS-specific cluster of cells (cluster 6) that also express surface markers of recruited hepatic macrophages (*C1qa*, *C1qc*, *Apoc1*, *Tim4d*). Ingenuity pathway analysis of differentially expressed genes suggested cluster 6 has LXR/RXR pathway and complement signature, which are associated to maintenance of Kupffer cells identity and macrophage activation and survival. Altogether, these results reveal expression of hyperactive SHP2 mutant changes hepatic macrophage behavior, which could account for the associated metaflammation.

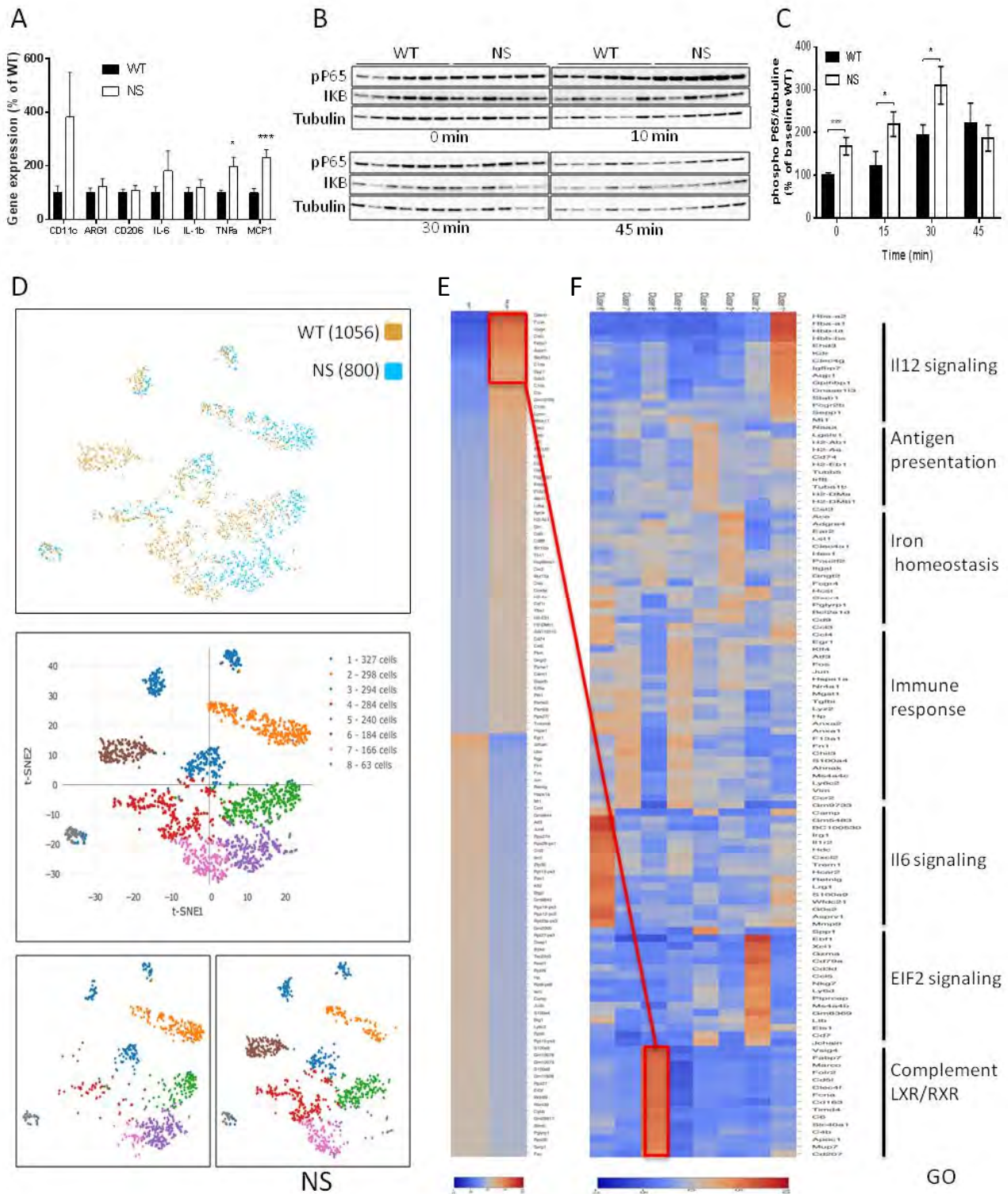


Figure 6: Hyperactive SHP2 mutant shifts macrophages towards a proinflammatory phenotype

(A-C) BMDM were prepared from WT and NS mice and differentiated during 1 week. (A) mRNA expression of inflammation markers was determined by qRT-PCR. (B) After overnight starvation, BMDM were treated for indicated time with LPS (1ng/mL), then p65 phosphorylation and iKB expression were assessed by western blot. (C) Quantification of p65 phosphorylation, values are expressed as mean \pm SEM, 2-way ANOVA with Bonferroni test post test, when 2-way ANOVA was significant, or unpaired Student t-test when necessary, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (D-F) F4/80+ cells were isolated from liver stromal fractions from WT and NS mice (pool of 6 animals per condition) then processed for single cell RNA sequencing. (D) t-SNE diagram. (E) Heat-map of differentially expressed genes in the entire population. (F) Heat-map of differentially expressed genes in the different clusters.

Pharmacological inhibition of SHP2 improves glucose tolerance and reduces metaflammation in obese/diabetic mice.

Given the primary role of hyperactive mutant of SHP2 in promoting inflammation-driven glucose intolerance, we next hypothesized that SHP2 inhibition could improve carbohydrate metabolism in non-genetic, chronic metabolic diseases. For this, high fat fed, obese/diabetic mice were taken as a standard model of insulin resistance associated to low-grade inflammation of their metabolic tissues. These mice were treated with a specific, orally bioavailable SHP2 inhibitor for 2 weeks, or the vehicle as a control, and their glucose tolerance was assessed. Both groups were indistinguishable in term of weight, adiposity, fasted glycemia and glucose intolerance profile prior to the treatment (Figure S6). Quite strikingly, SHP099 treatment significantly improved glucose tolerance, fasted glycemia and fasted insulinemia (Figure 7A-C), without modifying body weight and composition (Figure 7D-F), although liver weight was significantly reduced (Figure 7G). Importantly, metaflammation was decreased in SHP099-treated mice, as demonstrated by reduced inflammation markers in metabolic tissues (Figure 7H, I). Altogether, these results highlight that SHP2 inhibition can improve glucose tolerance, possibly by reducing the inflammatory load of the metabolic tissues.

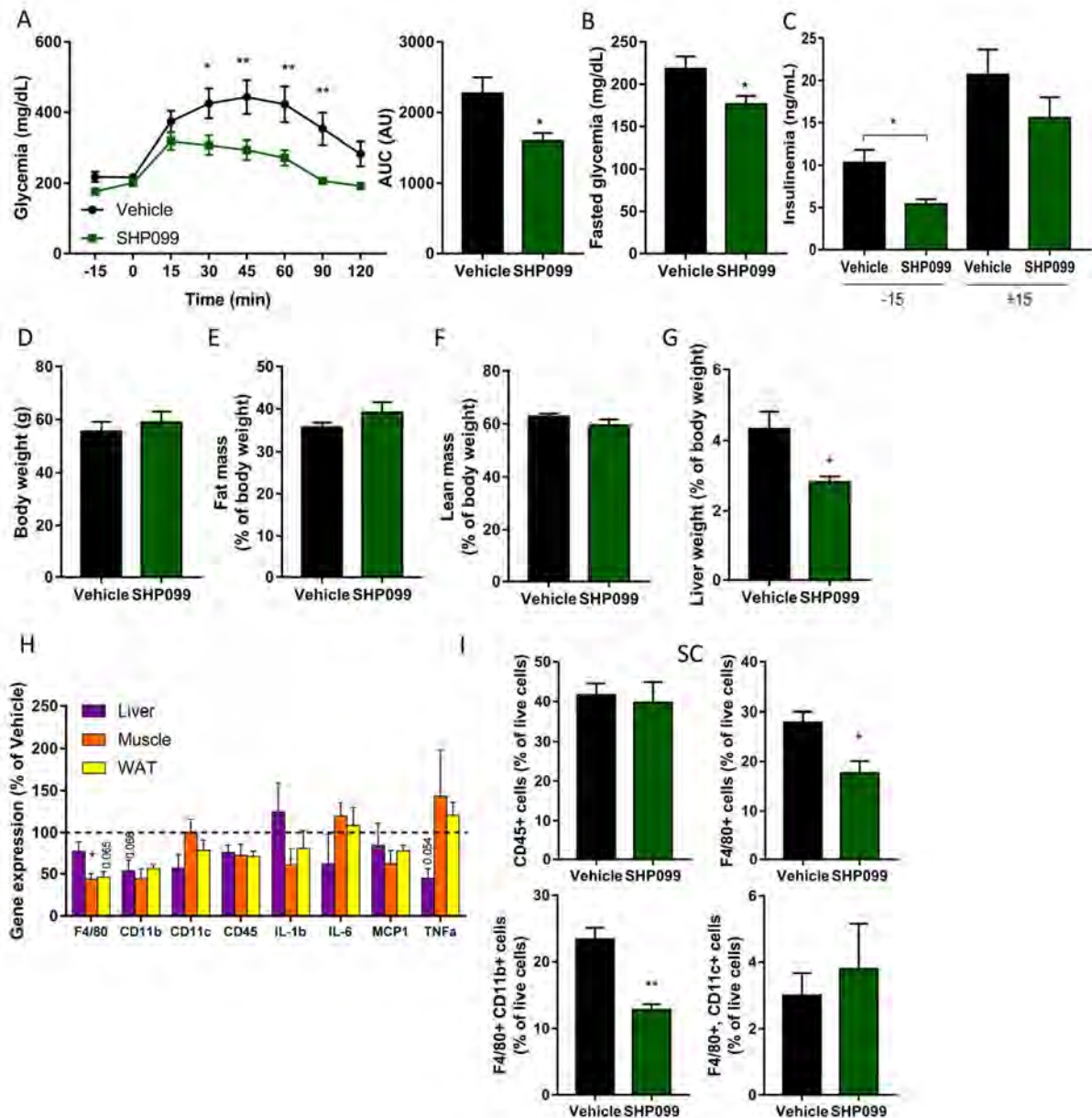


Figure 7: Pharmacological inhibition of SHP2 improves glucose intolerance in obese/diabetic mice

HFD fed C57B6 animals were treated by oral gavage with SHP099 (50mg/kg/d) or vehicle as a control during 2 weeks and the following analyses were performed. (A-D) post treatment OGTT with glycemia curve and AUC (A), fasted glycemia (B), fasted and glucose-induced insulinemia (C). (D-G) post treatment body composition with weight (D), fat (E) and lean (F) mass proportions, liver weight (G). (H, I) Expression of inflammation markers was quantified by qRT-PCR on liver, white adipose tissue and muscle (H) and flow cytometry analysis of stromal fraction from subcutaneous WAT (I). Values are expressed as mean \pm SEM n=8-14 in each group, 2-way ANOVA with Bonferroni post test when 2 way ANOVA was significant for OGTT curve and unpaired Student t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Discussion

In this study, we identified for the first time an adipose tissue-independent, inflammation-driven insulin resistance mediated by SHP2 hyperactivation. Indeed, consistent with previous results showing that a mouse model expressing a hypoactive mutant of SHP2 displays improved glucose tolerance and insulin sensitivity (Tajan et al., 2014), we hereby demonstrate that systemic SHP2 overactivation results in insulin resistance in human and in mouse model, suggesting that SHP2 has a global negative function on glucose metabolism. These results are at odds with the different tissue-specific KO or KI of SHP2 developed so far which highlighted a protective role of SHP2 towards insulin resistance, with the exception of liver-specific KO (Banno et al., 2010; do Carmo et al., 2014; Krajewska et al., 2008; Maegawa et al., 1999; Princen et al., 2009; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2009). However, the contribution of SHP2 in hematopoietic cells, in particular in macrophages, to glucose metabolism regulation was never determined. Thus, our original finding of a key role of the inflammation status in the NS-associated insulin resistance also allows hierarchising the relative contribution of SHP2 within the different tissues, with a more prominent role of SHP2 in the macrophage in promoting insulin resistance. Assessing the metabolic impact of SHP2 invalidation or hyperactive SHP2 mutants in immune lineage or macrophage will be necessary to validate this hypothesis.

We report that NS-PTPN11 condition is associated to reduced adiposity, but without any sign of ectopic lipid deposits nor lipotoxicity, highlighting that insulin resistance triggered by systemic expression of hyperactive SHP2 is not secondary to impaired lipid distribution. In this setting, this clinical picture is somewhat reminiscent of chronic inflammatory conditions, such as autoimmune diseases or infection, which are at increased risk of diabetes and led to the concept of obesity-independent, inflammation-driven insulin resistance (Bahtiyar et al., 2004; Wellen and Hotamisligil, 2005).

In accordance with this, our data identify an important role of SHP2 in promoting a pro-inflammatory phenotype in macrophages with profound consequences on immuno-metabolism. Consistent with this, SHP2 deletion in the myeloid lineage (LysM-Cre dependent recombination in monocyte/macrophage) results in an anti-inflammatory profile (M2 polarization) promoting pulmonary fibrosis or emphysema, or impairing host immunity during bacterial infection (Tao et al., 2014; Xu et al., 2017; Zhao et al., 2016). Moreover, treatment with selective SHP2 inhibitors reduced inflammatory response associated to *Haemophilus*

influenzae infection, systemic lupus erythematosus or endotoxemia in mouse or zebrafish models (Hsu et al., 2018; Wang et al., 2016; Zhao et al., 2016). Conversely, a compound with anti-inflammatory properties was recently identified as a selective SHP2 inhibitor (Chen et al., 2017). Furthermore, *in vitro* experiments revealed expression of hyperactive, NS- or leukemia-associated, SHP2 mutants trigger a M1 phenotype, while expression of a hypoactive mutant of SHP2 or treatment with SHP2 inhibitor is associated to a M2 pattern (Li et al., 2015; Park et al., 2017; Tao et al., 2014). Of note, other studies have proposed that SHP2 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines, by acting on the NLRP3 inflammasome or on the TLR3/TRIF signaling (An et al., 2006; Guo et al., 2017). Such differences could reflect stimulus specificity or define negative feedback loops to avoid a too important inflammatory response, which could also explain why NS is associated to mild, not severe, inflammatory phenotypes.

A key question raised by these findings is to understand how hyperactive SHP2 promote such a pro-inflammatory phenotype. Hyperactivating SHP2 can certainly drive cell autonomous mechanisms, ranging from enhanced M1 polarization to increased sensitivity to pro-inflammatory signals. Supporting this view, analysis of hepatic macrophage identified a specific subpopulation harboring markers of Kupffer cells (KC) and infiltrated monocytes/macrophages. Interestingly, a similar population was recently described in the context of HFD-induced insulin resistance (Morinaga et al., 2015). Whether hyperactive SHP2 modifies the identity of one or another of these cell subtypes, by affecting KC progenitors, curving the gene expression program of KC to a pro-inflammatory pattern or favoring the recruitment of monocytes derived macrophages, remains to be determined. Importantly, in the setting of JMML, Dong *et al.* reported the importance of the microenvironment to the myeloid lineage phenotype (Dong et al., 2016).

Besides an effect of hyperactive SHP2 on macrophage activity, one cannot exclude that unbalanced monocyte homeostasis could participate to the NS-associated pro inflammatory phenotype since it is well established that NS-causing SHP2 mutations drives monocytosis, which can evolve to myeloproliferative disorder (Araki et al., 2004; Chan et al., 2009; Xu et al., 2010). Indeed, it is known that monocytosis can result in increased macrophage infiltration in peripheral tissues, leading to insulin resistance (Beliard et al., 2017; Du et al., 2016; Nagareddy et al., 2014; Nagareddy et al., 2013; Tang et al., 2016). One may also

consider that additional, non hematopoietic, defects could contribute to insulin resistance/glucose intolerance, such as decreased drainage or enhanced chemo-attractive properties of metabolic tissues. Moreover, since SHP2 can directly downregulate insulin-evoked PI3K signaling (Matsuo et al., 2010; Zhang et al., 2002), NS-causing SHP2 mutant might exacerbate this effect, thereby promoting insulin resistance. Supporting the contribution of such mechanisms, our transplantation experiments suggest a role of peripheral tissues, the glucose intolerance being only partly reverted in chimaeric mice (Figure 6), and NS is characterized by lymphedema, that could result in overcrowding/accumulation of inflammatory cells and factors in metabolic tissues (Joyce et al., 2016). In favor of a direct signaling defect, overexpression of NS-causing SHP2 mutants *in vitro* dampens down AKT phosphorylation in response to insulin in some cell lines and using low level of insulin (unpublished data). However, at least in the liver, the macrophage defect certainly prevails, since clodronate treatment restores hepatic insulin signaling. Experiments using tissue specific KI models, but also metabolic profiling of *PTPN11* JMML patients, will certainly help evaluating the contribution of these different mechanisms to the global phenotype.

This study also highlights that SHP2 hyperactivation can promote inflammation driven-insulin resistance. This model is consistent with previous data showing SHP2 overexpression in metabolic tissues of obese and/or diabetic mice and association between *PTPN11* variants with metabolic syndrome and inflammation (Ahmad and Goldstein, 1995; Bettaieb et al., 2011; Bonini et al., 1995; Kraja et al., 2014; Nagata et al., 2012). In light of our results, one may wonder if these observations could indirectly reflect an overexpression of SHP2 in macrophages combined with increased infiltration of these cells in metabolic tissues. Moreover, since it has been shown that SHP2 expression is linked to the feeding status, a key question will be to understand the mechanisms that drive SHP2 overexpression in the context of metabolic diseases. Importantly, our data also reveals that systemic inhibition of SHP2 by the mean of the orally bioavailable specific inhibitor SHP099 can efficiently reduce glucose intolerance in preclinical models of T2D, possibly in part by reducing metaflammation. Although several reports have recently documented the safety of this molecule in acute treatments (Chen et al., 2016; Dardaei et al., 2018; Garcia Fortanet et al., 2016; Kostallari et

al., 2018; Sun et al., 2018), further studies will be required to exclude major side effects, considering both the need for long term treatment and the ubiquitous nature of SHP2.

The characterization of this metabolic phenotype in NS-PTPN11 also raises important questions regarding the pathophysiology of NS and related syndromes. Firstly, such metabolic imbalance could contribute to the development or worsening of other symptoms of the disease, notably cardiopathies or growth retardation. Secondly, NS is a genetically heterogeneous disease, with more than a dozen of causal genes identified to date, and is closely related to other disorders (*e.g.* NS with multiple lentigines (NS-ML), Costello syndrome, cranio-facio-cutaneous syndrome), forming the Rasopathies family, that share similar symptoms and are caused by mutations hitting genes encoding actors or regulators of the RAS/MAPK (Tajan et al., 2018). Since hyperactive, NS-, and hypoactive, NS-ML-associated SHP2 mutations seem to drive mirror glucidic phenotypes but similar alterations of their adipose tissue (Tajan et al., 2014), one may argue that the glucose intolerance could represent a specific feature of *PTPN11*-associated NS, while reduced adiposity could be a common trait of all Rasopathies. Supporting this view, reduced adiposity, but not glucose intolerance, is reverted by RAS/MAPK inhibition, as are canonic Rasopathies' symptoms (*e.g.* growth retardation, cardiopathies...) (Araki et al., 2009; Araki et al., 2004; De Rocca Serra-Nedelec et al., 2012; Lee et al., 2014; Nakamura et al., 2007; Nakamura et al., 2009; Wu et al., 2011). While additional experiments are required to address this question, the identification of glucose intolerance/insulin resistance may require specific follow up, at least in *PTPN11*-associated NS patients, since it can evolve to diabetes condition with age or depending on diet quality

Material and Methods

Patients: The data collection and functional exploration for NS patients was performed in the Endocrinology, Bone diseases and Genetics unit from the Children Hospital of Toulouse, France. This protocol was approved by Institutional Review Boards (Biomedical Research Protocol, NCT: 02383316). Lean, normal weight and obese patients were from population studies recruited in Lille University Hospital, Lille, France (Morandi et al., 2016). The study protocols were approved by local ethics committees. Oral assent was obtained from all

patients and legal guardians signed a written informed consent form. Body mass index (BMI) was calculated as the ratio of weight in kg divided by the square of height in meters and BMI measurements were converted to age- and sex-specific z-scores on the basis of French reference data (Rolland-Cachera et al., 1991). Fat body mass was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) analysis using a Lunar Prodigy device (GE Healthcare), expressed as a percentage of total body mass and transformed to age-specific z-scores (van der Sluis et al., 2002). Plasma parameters were obtained using standard hospital procedures and were transformed to age-specific z-scores. For oral glucose tolerance test, fasting patients received 1.75 g/Kg (max 75 g) glucose per os, then glucose and insulin levels were measured at indicated time points. HOMA-IR, HOMA-B and QUICKI index were calculated using the following formula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin (mUI/L)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$$

$$\text{HOMA-B} = 20 \times \text{fasting insulin (\mu UI/ml)} / \text{fasting glucose (mmol/ml)} - 3.5$$

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log(\text{fasting insulin (mUI/l)}) + \log(\text{fasting glucose (mmol/l)})]$$

Mouse phenotyping: Breeding and experimental procedures were performed in accordance with institutional guidelines for animal research and were approved by the Animal Care and Use Ethics Committee US006 CREFRE - CEEA-122 (protocols 10/563/G/02 and 16/1048/03/18, authorization 5739-2016061417177039-v8). The mouse model carrying the point mutation D61G on SHP2 (referred to as *Ptpn11*^{D61G/+} or NS mouse) has been previously described (Araki et al., 2004). Mice were housed under specific pathogen-free conditions in a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) animal room, with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) and free access to food and water. To determine body composition, EchoMRI analyses (Echo MedicalSystems) were performed by following manufacturer's instructions. For oral glucose tolerance test or insulin tolerance test, after 6-h fasting, mice were fed with glucose (3 g/kg) or i.p. injected with insulin (0.5 IU/kg), then blood was taken from the tail vein and glucose levels were monitored over time using a glucometer (Accu-check; Roche Diagnostics). Hyperinsulinemic euglycemic clamp procedure was performed as described in (Dray et al., 2008). Briefly, a catheter was indwelled into the femoral vein under anesthesia with an exit point between scapula. The mice were housed individually and allowed to recover for 3–4 days. On the day of the experiment the mice were 6 hr fasted. In basal state,

HPLC purified D-[3H]-glucose (Perkin Elmer; Boston, MA) was continuously infused in the femoral vein at a rate of 16 $\mu\text{Ci}/\text{kg}/\text{min}$ for 90 min. Under hyperinsulinemic conditions, insulin was infused at a rate of 18 or 1,5 mU/kg/min for 3 hr. To ensure a sufficient plasma D-[3H]-glucose enrichment the tracer was infused at 16 $\mu\text{Ci}/\text{kg}/\text{min}$. Plasma glucose concentrations and D-[3H]-glucose-specific activity were determined in 5 μl of blood. To determine the insulin-stimulated glucose utilization in tissues, a flash of intravenous injection of 50 μCi 2-deoxy-D-[3H] glucose (D-[3H]-2DG) (NEN LifeScience) was performed in the femoral vein 60 min before the end of the clamp. Plasma D-[3H]-2DG disappearance and glucose concentration were determined in 5 μl blood sampled from the tail vein at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, and 60 min after injection. Different tissues were dissected out and treated as previously described to determine D-[3H]-2DG uptake (Kamohara et al., 1997). Plasma leptin (Quantikine; R&D Systems) and insulin (Mercodia) were determined by ELISA in the fasted state or at indicated times. At the time of sacrifice, tissues and organs were dissected, weighted and directly processed for further analyses. For gene expression and Western blot analyses, samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Interventional experiments: For chronic treatment with PD0325901 (Selleckchem), animals were daily injected i.p. with 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ PD0325901 or vehicle as a control for 1 mo. For treatment with SHP099 (CT-SHP099, Indianapolis, IN 46256, USA), animals were high fat fed (HFD 60%, Research diet) during 10 weeks, then they were daily fed by gavage with 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ SHP099 or vehicle as a control for 2 weeks. Metabolic parameters were determined before and after treatment. For bone marrow transplantation (BMT), recipient mice (12 weeks) were irradiated with a dose of 9 Gy radiation. The next day, bone marrow cells were sterilely isolated by flushing femurs and tibiae of WT and NS donor mice (12 weeks) with DMEM/F12. Red blood cells were lysed with erythrocyte lysis buffer (ELB) (EDTA 126 mM, KH_2PO_4 7.3 mM, NH_4Cl 165 mM), then counted and resuspended in saline solution. 10×10^6 bone marrow cells were intravenously injected into recipient mice. Reconstitution efficiency was assessed 6 and 17 weeks after the BMT by genotyping on genomic DNA from blood cells. Metabolic parameters were assessed before BMT and at indicated times after BMT. For macrophage depletion, 10 week-old mice were i.p. injected with clodronate-liposomes or PBS-

liposomes (Liposoma, 1098 XH Amsterdam, Netherland) (100 mg/kg) every three days for 10 days. At day 10, glucose tolerance test was performed.

Liver and muscle triglyceride content: Tissues were homogenized using Precellys sample lyser, resuspended with ethanol and incubated 1hr at room temperature. Samples were centrifugated 1 min at 2000 rpm, and free glycerol (free glycerol reagent, Sigma Aldrich) was quantified. Then triglycerides were hydrolyzed (Triglyceride reagent, Sigma Aldrich) and total glycerol was determined. Tissue triglyceride content is calculated by subtracting free glycerol to total glycerol.

Histology and immunohistochemistry: Tissue samples were fixed in 10% formalin for 24 hrs, then incubated at 4°C in 70% ethanol before being paraffin-embedded or in 30% sucrose before being cryo-embedded with OCT. For histology, sections were stained with haematoxylin/eosin (H/E) or red oil O following standard procedures. For immunohistochemistry, insulin was detected using an anti-cobaye Insulin antibody (Biogenex) followed by an anti-cobaye Cy2 antibody (Invitrogen). F4/80 was detected using an anti-mouse F4/80 antibody (Invitrogen) followed by a biotinylated anti-rat antibody (Vector laboratories) and streptavidin-HRP (R&D systems) with DAB as substrate (Sigma-Aldrich).

Western blot: Tissues were homogenized in tissue lysis buffer (TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, TRITON X100 1%, Tetra-Sodium Pyrophosphate 2.5 mM, B-Glycerophosphate 1 mM, Sodium orthovanadate 1 mM) containing proteases and phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich) mixtures using Precellys sample lyser. Cells were homogenized in cold lysis buffer (HEPES 20 mM, glycerol 25%, NaF 15 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, NPO₄ 1 mM). Protein concentration was determined by the Bradford method (BioRad), then lysates aliquots were processed for immunoblotting through standard procedure.

BMDM generation, stromal fraction preparation and flow cytometry: To generate BMDM, freshly isolated bone marrow cells were plated in DMEM/F12 medium containing M-CSF (20

ng/mL, Peprotech), 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Invitrogen). Medium was replaced every 2 days and on day 7 cells were harvested after LPS stimulation (1ng/mL, Sigma-Aldrich). For stromal fraction preparation, mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg), then perfused with PBS to wash out blood from tissues. Mice were euthanized and tissues were taken off. Adipose tissue (AT) and muscle were digested with collagenase A (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) during 25 min for AT and 2hr for muscle. After centrifugation at 600g for 10 min, the pellet containing stromal fraction was incubated with Erythrocyte Lysis Buffer (ELB) for 10 min followed by another centrifugation (600g, 10 min) and resuspension in PBS. Liver was digested with collagenase D (2,5 mg/mL, Roche Diagnostics, IN, USA) during 20 min at 37°C. After centrifugation at 600g for 10 min, stromal cells were separated in 30% percoll and pellet containing stromal cells were incubated with ELB as described above. Stromal fraction cells were incubated with Fc block (BD Biosciences) for 5 min at room temperature before staining with Livedead (Invitrogen) and fluorescent dye-conjugated antibodies (CD45-BV421, F4/80-APC, CD11b-PE, CD11c-BV711, BD Biosciences) or control isotypes (BD Biosciences) for 25 min at 4°C. Data were acquired on a cytometer (BD Fortessa) and analyzed with Diva8 software.

Gene expression analysis: Total mRNAs were isolated using GeneJET RNA purification kit (Thermo Scientific) and DNase (Qiagen) then reverse transcribed using High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Next, Real Time-qPCR was performed using indicated primer pairs (Table S1) and gene expression was normalized to 36B4, GAPDH and Beta 2 microglobulin housekeeping genes.

Single cell RNA sequencing: F4/80 positive cells from liver stromal fractions (pool of 6 animals per genotype) were sorted by flow cytometry, spun down and resuspended in DMEM. Single cell libraries were prepared with the Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v2 & i7 Multiplex Kit and A Chip Kit from 10X Genomics. The barcoded library was sequenced on an Illumina HiSeq3000 in 26-8-150 paired-end configuration. Raw sequencing reads were demultiplexed, mapped to the mouse reference genome (build mm10) and gene-expression matrices were generated using CellRanger (version 2.1.0). In total 168,104,667 reads were

mapped and 1191 cells were detected for WT and 149,198,265 reads were mapped and 1500 cells were detected for NS with a sequencing saturation of 93/95.6%. This gene-expression matrix was further filtered in Seurat 2.0 and cells with less than 200 genes or 1000 unique molecular identifiers (UMIs) were discarded as well as cells with more than 8000 expressed (multiplets) genes and more than 20% of mtRNA, resulting in 697 single cells. After normalization, these cells were clustered using the Seurat workflow based on dimensionality reduction by a PCA of the 1395 most variable genes. The first 8 PCs were used to identify the different clusters in the dataset and to visualize these clusters in a t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE) plot. Gene ontology analysis was performed using Ingenuity Pathway Analysis.

Statistics: For analysis of patients data, one NS patient was matched with 3 lean (male and female: Z-BMI<-1), normal weight (male: -1<Z-BMI<1.3, female : -1<Z-BMI<1.2) or obese (male: Z-BMI>2.288, female: Z-BMI>2.192) subjects using R package *MatchIt*, with method="nearest" (nearest neighbor matching) with regard to Sex (exact matching) and Age. For longitudinal analysis, a mixed model was used : $Trait_i = \beta_0 + \beta_1 Age_i + \beta_2 ZBMI_i + \beta_3 Sex_i + \beta_4 Group_i + \beta_5 Time + \beta_6 Time^2 + \epsilon_i$. All mouse data are expressed as mean \pm SEM. Except otherwise indicated, statistical significance was determined by using paired or unpaired two tailed Student t test, Mann & Withney test was used in case of unequal variances, and two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test, or two-way ANOVA with repeated measures, as appropriate. P values <0.05 were considered significant (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

Supplemental Tables and Figures legends

	NS	Lean	NS/lean.p	Normal weight	NS/norm.p	Obese	NS/obese.p
n	21	15	-	63	-	63	-
Male-Female (% of female)	14-7 (33.3)	8-7 (46.7)	0.64386	42-21 (33.3)	1	42-21 (33.3)	1
Age (years) (mean (sd))	9.61 (5.09)	11.81 (4.22)	0.16706	11.99 (2.83)	0.05	10.92 (3.51)	0.29
BMI (kg/cm2) (mean (sd))	15.89 (1.93)	15.19 (1.76)	0.26937	18.19 (2.10)	>0.0001	29.02 (6.59)	>0.0001
Z-BMI (mean (sd))	-0.93 (0.86)	-1.52 (0.44)	0.01126	0.37 (0.56)	>0.0001	4.26 (1.20)	>0.0001
Weight (kg)(mean (sd))	25.96 (13.60)	34.40 (14.27)	0.08475	41.13 (12.28)	>0.0001	67.50 (27.35)	>0.0001
Height (cm) (mean (sd))	122.72 (27.80)	146.60 (22.58)	0.00767	148.47 (14.65)	0.0005	149.45 (17.59)	0.0003
Fat mass (%) (mean (sd))	0.19 (0.07)	0.22 (0.10)	0.47667	0.23 (0.06)	0.053	0.40 (0.08)	>0.0001
Fasted glycemia (SI) (mean (sd))	4.49 (0.56)	4.85 (0.47)	0.03959	4.76 (0.48)	0.054	4.87 (0.60)	0.02
Fasted insulinemia (SI) (mean (sd))	44.77 (29.87)	50.56 (30.35)	0.59190	42.73 (26.12)	0.8	107.40 (83.93)	>0.0001
HOMAIR (mean (sd))	1.32 (0.97)	1.64 (1.14)	0.40675	1.33 (0.89)	0.9	3.49 (3.35)	>0.0001
QUICKI (mean (sd))	0.17 (0.02)	0.16 (0.02)	0.39225	0.17 (0.02)	0.84	0.15 (0.02)	0.0001
CHO (SI) (mean (sd))	3.61 (0.64)	4.32 (1.18)	0.04768	4.42 (0.88)	>0.0001	4.44 (0.80)	>0.0001
TG (SI) (mean (sd))	0.74 (0.45)	0.80 (0.25)	0.62093	0.71 (0.34)	0.78	1.05 (0.52)	0.013
HDL (SI) (mean (sd))	1.24 (0.33)	1.41 (0.35)	0.17848	1.57 (0.36)	0.0013	1.24 (0.30)	0.96
LDL (SI) (mean (sd))	1.95 (0.53)	-	-	-	-	-	-
Leptin (SI) (mean (sd))	2.04 (2.00)	4.90 (0.99)	0.07246	7.90 (7.35)	0.0003	24.82 (11.14)	>0.0001

Table S1: Metabolic parameters of NS patients and lean, normal weight and obese individuals.

	NS	Lean	NS/lean.p	Normal weight	NS/norm.p	Obese	NS/obese.p
n	10	8	-	30	-	30	-
Male-Female (% of female)	6-4 (40.0)	4-4 (50.0)	1	18-12 (40.0)	1	18-12 (40.0)	1
Age (years) (mean (sd))	11.00 (3.41)	14.09 (3.42)	0.08	12.23 (2.56)	0.31	11.31 (2.88)	0.79
Weight (kg)(mean (sd))	28.07 (10.55)	42.38 (12.09)	0.02	41.03 (10.12)	0.004	65.11 (23.62)	>0.0001
Height (cm) (mean (sd))	129.30 (19.49)	159.62 (17.81)	0.003	148.65 (11.38)	0.01	148.92 (14.44)	0.012
BMI (kg/cm2) (mean (sd))	16.08 (1.98)	16.24 (1.38)	0.84	18.26 (2.07)	0.009	28.38 (5.68)	>0.0001
Z-BMI (mean (sd))	-0.72 (1.07)	-1.32 (0.36)	0.12	0.36 (0.54)	0.01	3.89 (0.81)	>0.0001
Glucose 0 (SI) (mean (sd))	4.59 (0.58)	4.94 (0.53)	0.2	4.74 (0.51)	0.46	4.83 (0.37)	0.23
Glucose 30 (SI) (mean (sd))	6.41 (1.10)	7.28 (1.47)	0.19	7.10 (1.21)	0.11	7.02 (1.68)	0.2
Glucose 60 (SI) (mean (sd))	5.32 (1.90)	5.69 (1.25)	0.65	5.51 (1.33)	0.8	5.79 (1.88)	0.54
Glucose 90 (SI) (mean (sd))	5.43 (2.06)	5.01 (1.33)	0.66	5.00 (0.97)	0.61	5.68 (1.23)	0.76
Glucose 120 (SI) (mean (sd))	5.29 (1.34)	5.05 (1.19)	0.69	4.65 (0.74)	0.18	5.33 (0.93)	0.94
Norm Glucose 0 (SI) (mean (sd))	100.00 (0.00)	100.00 (0.00)	-	100.00 (0.00)	-	100.00 (0.00)	-
Norm Glucose 30 (SI) (mean (sd))	140.80 (24.15)	147.29 (25.14)	0.59	150.08 (22.56)	0.30	145.07 (31.81)	0.66
Norm Glucose 60 (SI) (mean (sd))	121.87 (43.29)	116.09 (28.99)	0.76	117.72 (34.13)	0.81	119.05 (33.64)	0.87
Norm Glucose 90 (SI) (mean (sd))	120.36 (44.94)	101.90 (26.73)	0.36	106.28 (22.41)	0.45	117.37 (21.42)	0.87
Norm Glucose 120 (SI) (mean (sd))	116.76 (33.13)	102.90 (25.48)	0.33	99.25 (19.41)	0.14	110.22 (17.14)	0.56
Insulin 0 (SI) (mean (sd))	49.16 (35.10)	58.08 (37.44)	0.62	48.13 (30.36)	0.94	107.02 (75.42)	0.003
Insulin 30 (SI) (mean (sd))	450.63 (242.44)	385.10 (253.36)	0.62	287.08 (155.84)	0.13	701.64 (518.78)	0.075
Insulin 60 (SI) (mean (sd))	255.11 (239.53)	236.65 (151.58)	0.87	203.33 (130.85)	0.62	446.12 (473.75)	0.16
Insulin 90 (SI) (mean (sd))	246.41 (198.02)	221.11 (151.22)	0.81	135.15 (133.07)	0.28	413.32 (370.96)	0.17
Insulin 120 (SI) (mean (sd))	258.35 (145.75)	190.55 (188.96)	0.48	102.70 (107.96)	0.07	323.38 (340.16)	0.48
Norm Insulin 0 (SI) (mean (sd))	100.00 (0.00)	100.00 (0.00)	-	100.00 (0.00)	-	100.00 (0.00)	-
Norm Insulin 30 (SI) (mean (sd))	877.31 (433.07)	739.39 (420.62)	0.54	742.50 (535.12)	0.49	813.81 (596.87)	0.75
Norm Insulin 60 (SI) (mean (sd))	548.17 (241.63)	530.48 (496.43)	0.93	558.07 (487.53)	0.94	380.52 (233.28)	0.16
Norm Insulin 90 (SI) (mean (sd))	496.77 (276.30)	463.78 (282.54)	0.84	338.52 (265.17)	0.28	409.66 (238.51)	0.53
Norm Insulin 120 (SI) (mean (sd))	478.04 (242.74)	339.06 (273.85)	0.36	256.09 (239.04)	0.11	304.74 (199.03)	0.19
HOMAIR (mean (sd))	1.54 (1.20)	1.92 (1.43)	0.56	1.50 (1.04)	0.93	3.34 (2.35)	0.005
QUICKI (mean (sd))	0.16 (0.02)	0.16 (0.02)	0.52	0.16 (0.02)	0.95	0.14 (0.01)	0.017
MPercent (%) (mean (sd))	0.21 (0.07)	0.23 (0.11)	0.72	0.24 (0.07)	0.28	0.41 (0.06)	>0.0001
CHO (SI) (mean (sd))	3.36 (0.52)	3.85 (0.70)	0.12	4.27 (1.03)	0.001	4.44 (0.93)	>0.0001
TG (SI) (mean (sd))	0.56 (0.24)	0.73 (0.25)	0.17	0.71 (0.33)	0.16	0.98 (0.41)	0.0005
HDL (SI) (mean (sd))	1.32 (0.35)	1.28 (0.22)	0.79	1.58 (0.35)	0.07	1.21 (0.31)	0.38
LDL (SI) (mean (sd))	1.79 (0.50)	-	-	-	-	-	-
Leptin (SI) (mean (sd))	2.13 (1.61)	4.9 (0.99)	0.07	9.23 (9.07)	0.01	26.59 (10.88)	>0.0001

Table S2: Metabolic parameters of NS patients and lean, normal weight and obese individuals subjected to OGTT. Values presented in Table 1 are italicized.

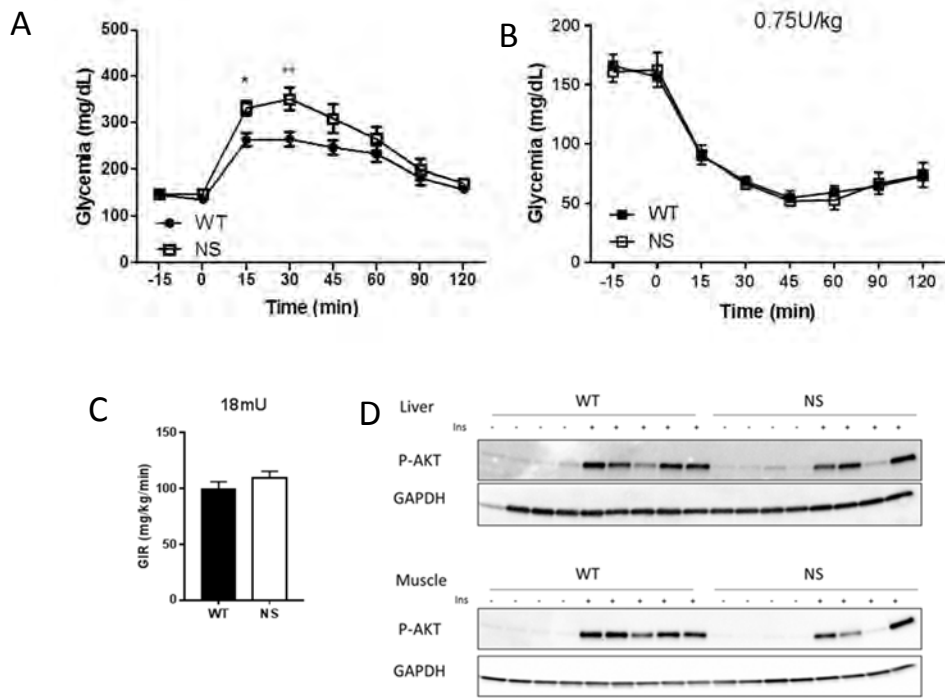


Figure S1: Glucose metabolism parameters of NS mice

(A) Oral glucose tolerance test on 20 week-old WT and NS animals. (B) Insulin tolerance test at 0.75U/kg of insulin. (C) GIR during 18 mU hyperinsulinemic euglycemic clamp. (D) AKT phosphorylation in metabolic tissues from NS and WT mice injected with 10mU/kg insulin.

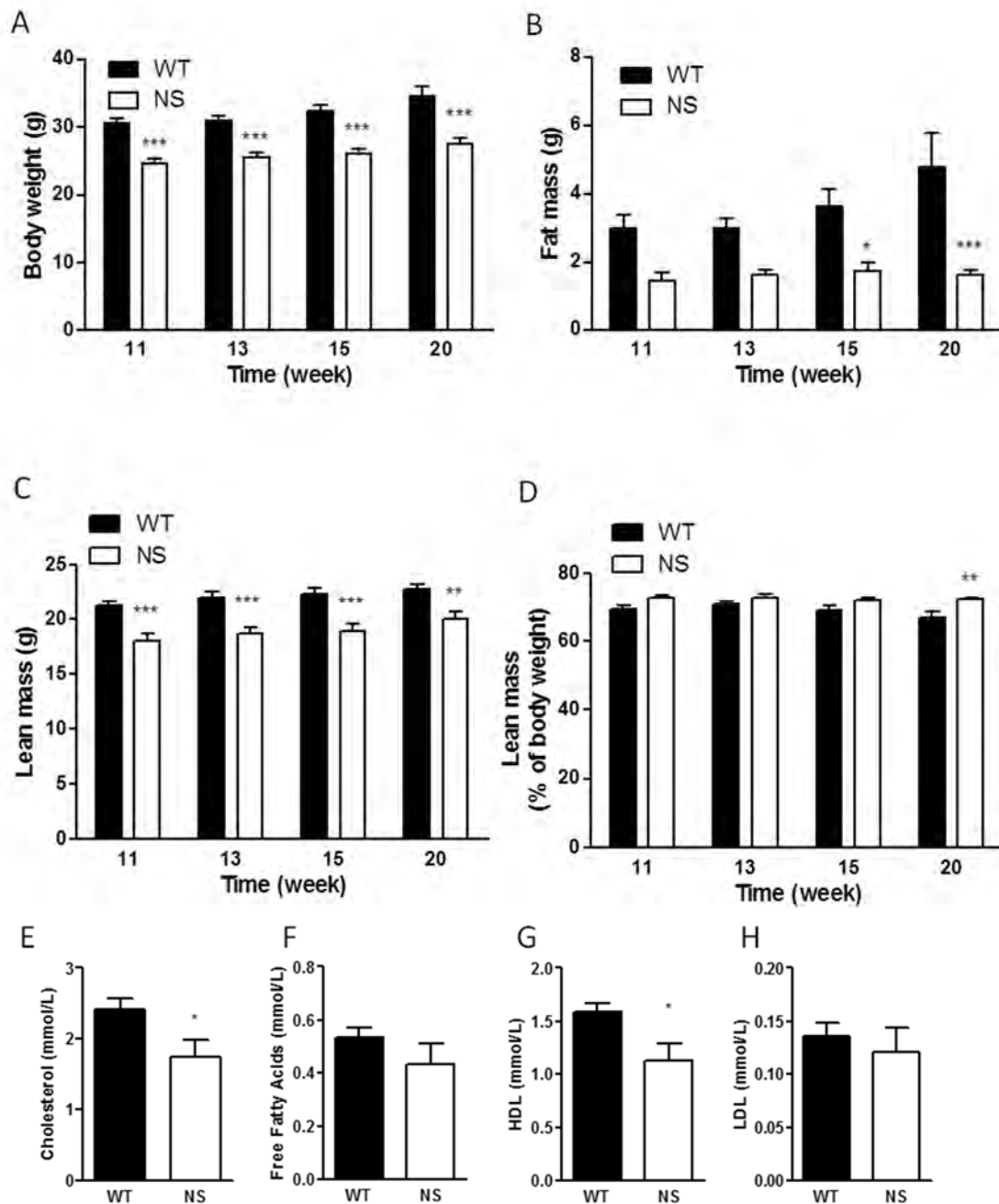


Figure S2: Metabolic parameters of NS mice

(A) Body weight measured at indicated ages. (B-D) Fat (B) and lean (C) masses were determined at indicated ages using a EchoMRI apparatus and lean mass proportion was calculated (D). (E-H) Plasma cholesterol, free fatty acids, HDL and LDL. Values are expressed as mean \pm SEM n= 8-12 in each group, *p< 0,05, **p< 0,01, ***, p<0,001, unpaired Student t-test.

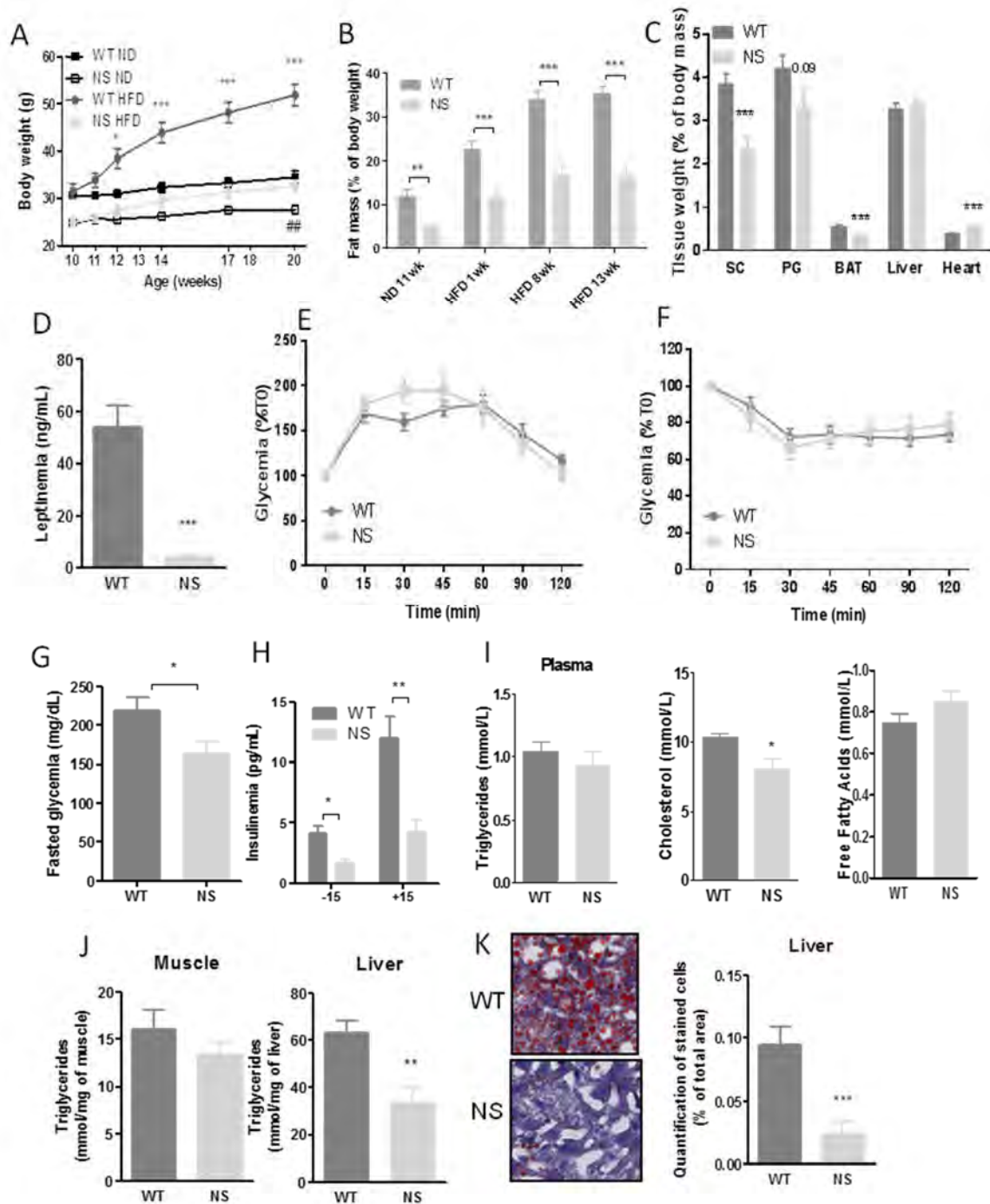


Figure S3: NS mice display similar glucose intolerance as WT animals during High Fat Diet despite being resistant to obesity

10 week-old WT and NS animals were subjected to HFD for 10 weeks. (A) Body weight curve of WT and NS mice under Normal Diet and HFD. Values are expressed as mean \pm SEM * p < 0,05, *** p < 0,001 for WT versus NS under HFD, ##, p < 0,01 for WT versus NS under ND, Bonferroni post test when 2 way ANOVA was significant. (B) Proportion of fat mass of WT and NS animals at different times of NS and HFD. Values are expressed as mean \pm SEM ** p < 0,01, *** p < 0,001 Student t-test. (C) Tissue weight of high-fat fed WT and NS mice. (D) Leptinemia of high-fat fed WT and NS mice. (E) OGTT performed on WT and NS mice at 13 weeks of HFD. (F) ITT performed on WT and NS mice at 9 weeks of HFD. (G, H) Fasting glycemia (G) and fasting and glucose-evoked insulinemia (H) during OGTT. (I) Triglycerides, cholesterol and free fatty acids in plasma from high fat -fed WT and NS mice. (J) Triglycerides quantification in muscle and liver. (K) Red Oil O staining on liver sections from high fat -fed WT and NS mice and quantification.

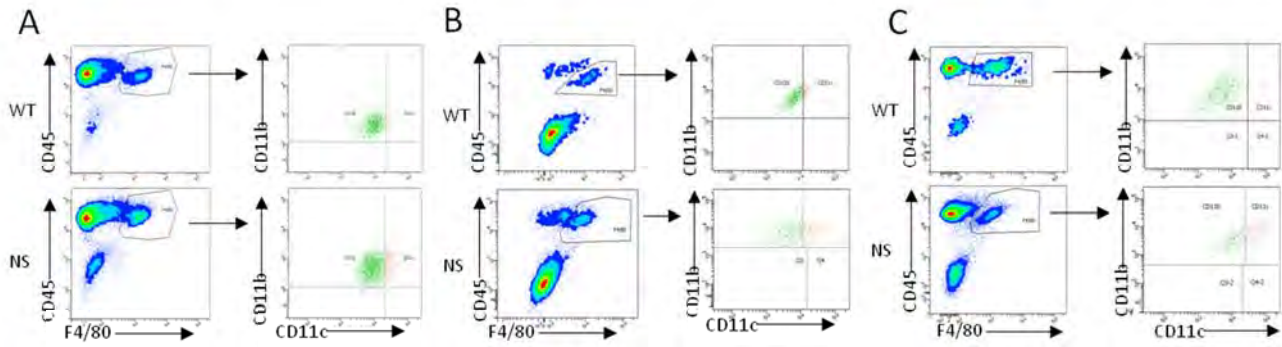


Figure S4: Representative pictures of flow cytometry

(A) Liver, (B) muscle and (C) adipose tissue stromal fractions gated on living CD45⁺, F4/80⁺, CD11b⁺, CD11c⁺ positive cells.

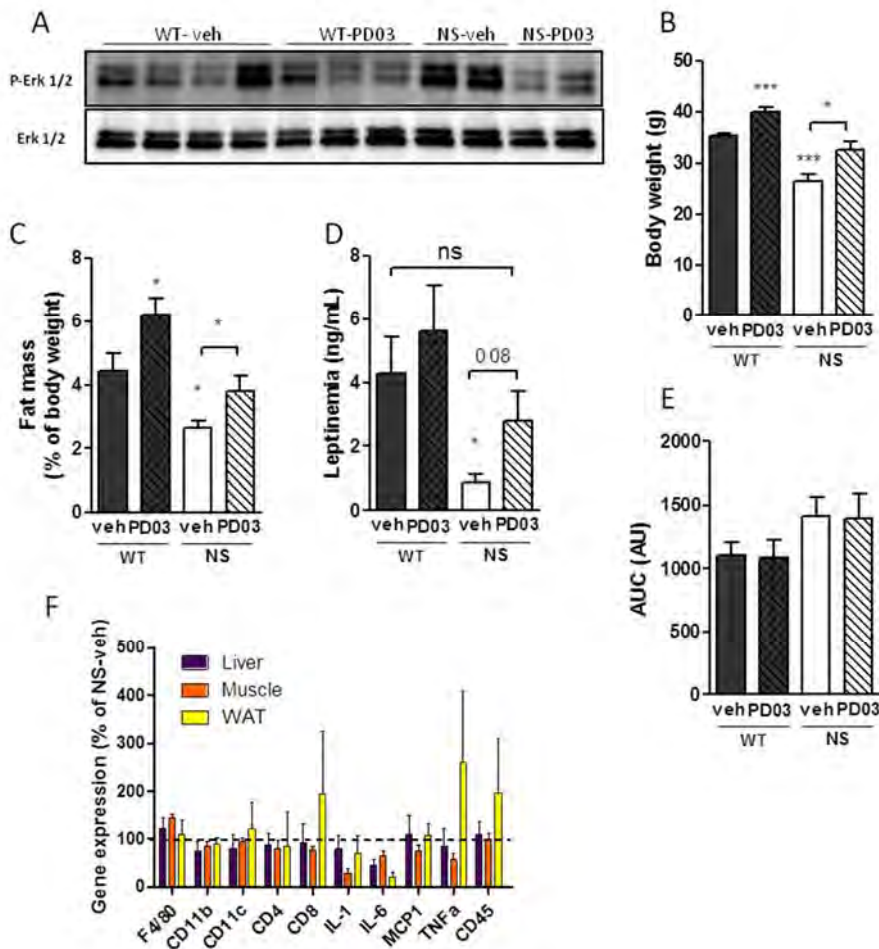


Figure S5: Reduced adiposity, but not insulin resistance, is reversed by MEK inhibitor

20 week old WT and NS mice have been treated during 4 weeks with a MEK inhibitor (PD0325901 1 mg/kg/d, injection ip) or vehicle (HPMC). (A) Immunoblotting in liver extract from fasted animals after the treatment. (B) Body weight after treatment. (C) Fat mass percentage after treatment determined by EchoMRI. (D) Leptinemia has been determined by ELISA. (E) Oral glucose tolerance test at the end of the treatment. Values are expressed as mean \pm SEM n=6-9 in each group, *p< 0,05, ***p< 0,001. Student t-test or Mann&Whitney when variances were unequal.

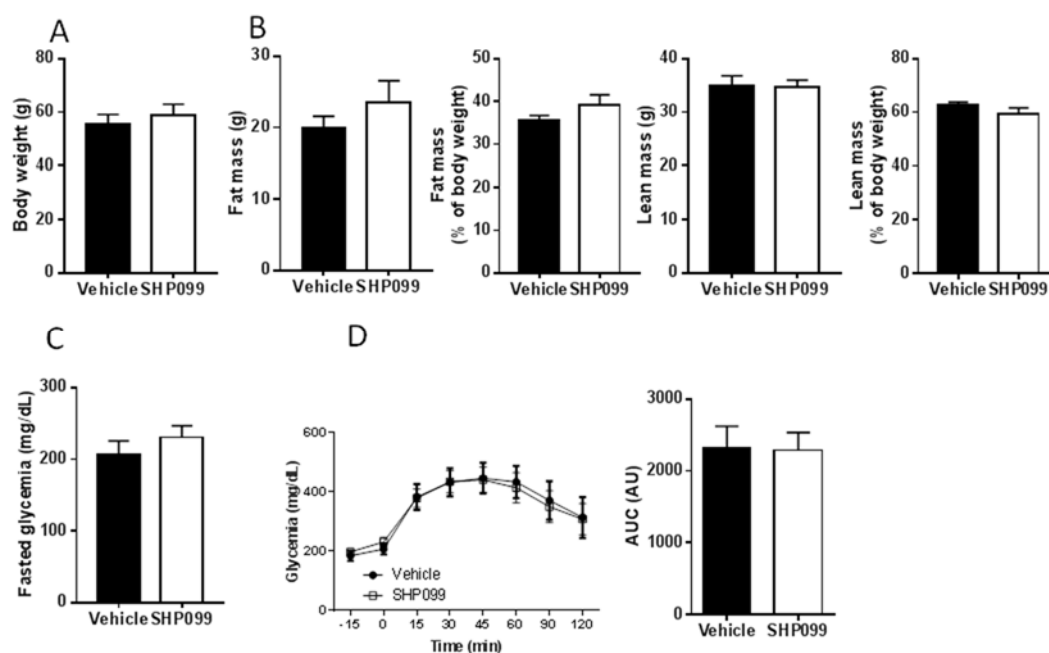


Figure S6: Metabolic parameters of obese/diabetic mice

Mice were fed a HFD during 10 weeks, then splitted into 2 groups for SHP099 or vehicle gavage and their metabolic parameters were assessed prior to treatment. (A) Body weight. (B) Body composition. (C) Fasted glycemia. (D) OGTT.

Acknowledgments:

We thank all past and present members of the Adipolab for technical and scientific support, in particular Maëlle Vomscheid and Nicolas Cottura. We are indebted to Jacques Weill for providing access to the OBE cohort. We sincerely thank F. Auriol and I. Kieffer of the Pediatric Clinical Investigation Center and C. Peyrot of the Clinical Research and Innovation Department for their valuable contribution. We are grateful to the Phenotyping platform (S. Le Gonidec), the Non-Invasive Exploration service (C. Pestourie), the medical biology service (T. Lavabre) and the mouse facility (Y. Bareira, X. Sudre) -US006/CREFRE INSERM/UPS/ENVT for *in vivo* experiments and animal handling, and to the flow cytometry (A. Zakaroff) and the histology (L. Fontaine) facilities of UMR U1048. We acknowledge the GeT-TQ (JJ. Maoret, F. Martins) and GeT-Biopuces-INSa (D. Labourdette) Genotoul services. This work was supported by grants from the University Hospital Toulouse (local grant 2014-A01712-45), H2020/E-Rare-3 JTC 2015 (NSEuroNet), Région Midi-Pyrénées (RBIO 2015- grant 14054330), and allowances from INSERM and University Paul Sabatier.

Bibliography

- Ahmad, F., and Goldstein, B.J. (1995). Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *The American journal of physiology* *268*, E932-940.
- An, H., Zhao, W., Hou, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zheng, Y., Xu, H., Qian, C., Zhou, J., Yu, Y., et al. (2006). SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* *25*, 919-928.
- Araki, T., Chan, G., Newbigging, S., Morikawa, L., Bronson, R.T., and Neel, B.G. (2009). Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4736-4741.
- Araki, T., Mohi, M.G., Ismat, F.A., Bronson, R.T., Williams, I.R., Kutok, J.L., Yang, W., Pao, L.I., Gilliland, D.G., Epstein, J.A., et al. (2004). Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nature medicine* *10*, 849-857.
- Bahtiyar, G., Shin, J.J., Aytaman, A., Sowers, J.R., and McFarlane, S.I. (2004). Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Current diabetes reports* *4*, 194-198.
- Banno, R., Zimmer, D., De Jonghe, B.C., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., and Bence, K.K. (2010). PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 720-734.
- Beliard, S., Le Goff, W., Saint-Charles, F., Poupel, L., Deswaerte, V., Bouchareychas, L., Huby, T., and Lesnik, P. (2017). Modulation of Gr1(low) monocyte subset impacts insulin sensitivity and weight gain upon high-fat diet in female mice. *International journal of obesity (2005)* *41*, 1805-1814.
- Bettaieb, A., Matsuo, K., Matsuo, I., Nagata, N., Chahed, S., Liu, S., and Haj, F.G. (2011). Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism: clinical and experimental* *286*, 9225-9235.
- Bonini, J.A., Colca, J., and Hofmann, C. (1995). Altered expression of insulin signaling components in streptozotocin-treated rats. *Biochemical and biophysical research communications* *212*, 933-938.
- Cessans, C., Ehlinger, V., Arnaud, C., Yart, A., Capri, Y., Barat, P., Cammas, B., Lacombe, D., Coutant, R., David, A., et al. (2016). Growth patterns of patients with Noonan syndrome: correlation with age and genotype. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* *174*, 641-650.
- Chan, G., Kalaitzidis, D., Usenko, T., Kutok, J.L., Yang, W., Mohi, M.G., and Neel, B.G. (2009). Leukemogenic Ptpn11 causes fatal myeloproliferative disorder via cell-autonomous effects on multiple stages of hematopoiesis. *Blood* *113*, 4414-4424.
- Chen, C., Liang, F., Chen, B., Sun, Z., Xue, T., Yang, R., and Luo, D. (2017). Identification of demethylincisterol A3 as a selective inhibitor of protein tyrosine phosphatase Shp2. *European journal of pharmacology* *795*, 124-133.

Chen, Y.N., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M.G., Antonakos, B., Chen, C.H., Chen, Z., Cooke, V.G., et al. (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* 535, 148-152.

Dardaiei, L., Wang, H.Q., Singh, M., Fordjour, P., Shaw, K.X., Yoda, S., Kerr, G., Yu, K., Liang, J., Cao, Y., et al. (2018). SHP2 inhibition restores sensitivity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors. *Nature medicine*.

De Rocca Serra-Nedelec, A., Edouard, T., Treguer, K., Tajan, M., Araki, T., Dance, M., Mus, M., Montagner, A., Tauber, M., Salles, J.P., et al. (2012). Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor 1 release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 4257-4262.

do Carmo, J.M., da Silva, A.A., Ebaady, S.E., Sessums, P.O., Abraham, R.S., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., and Hall, J.E. (2014). Shp2 signaling in POMC neurons is important for leptin's actions on blood pressure, energy balance, and glucose regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307, R1438-1447.

Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buleon, M., Cani, P.D., Attane, C., Guigne, C., Carpene, C., et al. (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell metabolism* 8, 437-445.

Du, W., Wong, C., Song, Y., Shen, H., Mori, D., Rotllan, N., Price, N., Dobrian, A.D., Meng, H., Kleinstein, S.H., et al. (2016). Age-associated vascular inflammation promotes monocyte during atherogenesis. *Aging cell* 15, 766-777.

Garcia Fortanet, J., Chen, C.H., Chen, Y.N., Chen, Z., Deng, Z., Firestone, B., Fekkes, P., Fodor, M., Fortin, P.D., Fridrich, C., et al. (2016). Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* 59, 7773-7782.

Guo, W., Liu, W., Chen, Z., Gu, Y., Peng, S., Shen, L., Shen, Y., Wang, X., Feng, G.S., Sun, Y., et al. (2017). Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation via ANT1-dependent mitochondrial homeostasis. *Nature communications* 8, 2168.

Hsu, A.Y., Gurol, T., Sobreira, T.J.P., Zhang, S., Moore, N., Cai, C., Zhang, Z.Y., and Deng, Q. (2018). Development and Characterization of an Endotoxemia Model in Zebra Fish. *Frontiers in immunology* 9, 607.

Joyce, S., Gordon, K., Brice, G., Ostergaard, P., Nagaraja, R., Short, J., Moore, S., Mortimer, P., and Mansour, S. (2016). The lymphatic phenotype in Noonan and Cardiofaciocutaneous syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* 24, 690-696.

Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M., and Charron, M.J. (1997). Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389, 374-377.

Kostallari, E., Hirsova, P., Prasnicka, A., Verma, V.K., Yaqoob, U., Wongjarupong, N., Roberts, L.R., and Shah, V.H. (2018). Hepatic stellate cell-derived PDGFRalpha-enriched extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2. *Hepatology*.

Kraja, A.T., Chasman, D.I., North, K.E., Reiner, A.P., Yanek, L.R., Kilpelainen, T.O., Smith, J.A., Dehghan, A., Dupuis, J., Johnson, A.D., et al. (2014). Pleiotropic genes for metabolic syndrome and inflammation. *Molecular genetics and metabolism* *112*, 317-338.

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

Lee, Y.S., Ehninger, D., Zhou, M., Oh, J.Y., Kang, M., Kwak, C., Ryu, H.H., Butz, D., Araki, T., Cai, Y., et al. (2014). Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nature neuroscience* *17*, 1736-1743.

Li, X.J., Goodwin, C.B., Nabinger, S.C., Richine, B.M., Yang, Z., Hanenberg, H., Ohnishi, H., Matozaki, T., Feng, G.S., and Chan, R.J. (2015). Protein-tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates macrophage oxidative burst. *The Journal of biological chemistry* *290*, 3894-3909.

Lima, M.H., Ueno, M., Thirone, A.C., Rocha, E.M., Carvalho, C.R., and Saad, M.J. (2002). Regulation of IRS-1/SHP2 interaction and AKT phosphorylation in animal models of insulin resistance. *Endocrine* *18*, 1-12.

Maegawa, H., Hasegawa, M., Sugai, S., Obata, T., Ugi, S., Morino, K., Egawa, K., Fujita, T., Sakamoto, T., Nishio, Y., et al. (1999). Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* *274*, 30236-30243.

Matsuo, K., Delibegovic, M., Matsuo, I., Nagata, N., Liu, S., Bettaieb, A., Xi, Y., Araki, K., Yang, W., Kahn, B.B., et al. (2010). Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J. Biol. Chem.* *285*, 39750-39758.

Morandi, A., Bonnefond, A., Lobbens, S., Yengo, L., Miraglia Del Giudice, E., Grandone, A., Levy-Marchal, C., Weill, J., Maffei, C., and Froguel, P. (2016). Associations Between Type 2 Diabetes-Related Genetic Scores and Metabolic Traits, in Obese and Normal-Weight Youths. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *101*, 4244-4250.

Myers, M.G., Jr., Mendez, R., Shi, P., Pierce, J.H., Rhoads, R., and White, M.F. (1998). The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* *273*, 26908-26914.

Nagareddy, P.R., Kraakman, M., Masters, S.L., Stirzaker, R.A., Gorman, D.J., Grant, R.W., Dragoljevic, D., Hong, E.S., Abdel-Latif, A., Smyth, S.S., et al. (2014). Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell metabolism* *19*, 821-835.

Nagareddy, P.R., Murphy, A.J., Stirzaker, R.A., Hu, Y., Yu, S., Miller, R.G., Ramkhalawon, B., Distel, E., Westerterp, M., Huang, L.S., et al. (2013). Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell metabolism* *17*, 695-708.

Nagata, N., Matsuo, K., Bettaieb, A., Bakke, J., Matsuo, I., Graham, J., Xi, Y., Liu, S., Tomilov, A., Tomilova, N., et al. (2012). Hepatic SRC homology phosphatase 2 regulates energy balance in mice. *Endocrinology* *153*, 3158-3169.

Nakamura, T., Colbert, M., Krenz, M., Molkenin, J.D., Hahn, H.S., Dorn, G.W., 2nd, and Robbins, J. (2007). Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *J. Clin. Invest.* *117*, 2123-2132.

- Nakamura, T., Gulick, J., Pratt, R., and Robbins, J. (2009). Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15436-15441.
- Park, J.H., Ko, R., and Lee, S.Y. (2017). Reciprocal regulation of TLR2-mediated IFN-beta production by SHP2 and Gsk3beta. *Scientific reports* *7*, 6807.
- Princen, F., Bard, E., Sheikh, F., Zhang, S.S., Wang, J., Zago, W.M., Wu, D., Diaz Trelles, R., Bailly-Maitre, B., Kahn, C.R., et al. (2009). Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Muscle Leads to Dilated Cardiomyopathy, Insulin Resistance and Premature Death. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 378-388.
- Rolland-Cachera, M.F., Cole, T.J., Sempe, M., Tichet, J., Rossignol, C., and Charraud, A. (1991). Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *European journal of clinical nutrition* *45*, 13-21.
- Sun, X., Ren, Y., Gunawan, S., Teng, P., Chen, Z., Lawrence, H.R., Cai, J., Lawrence, N.J., and Wu, J. (2018). Selective inhibition of leukemia-associated SHP2(E69K) mutant by the allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Leukemia*.
- Tajan, M., Batut, A., Cadoudal, T., Deleruyelle, S., Le Gonidec, S., Saint Laurent, C., Vomscheid, M., Wanecq, E., Treguer, K., De Rocca Serra-Nédélec, A., et al. (2014). LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E4494-4503.
- Tajan, M., de Rocca Serra, A., Valet, P., Edouard, T., and Yart, A. (2015). SHP2 sails from physiology to pathology. *European journal of medical genetics* *58*, 509-525.
- Tajan, M., Paccoud, R., Branka, S., Edouard, T., and Yart, A. (2018). The Rasopathy family: Consequences of germline activation of the RAS/MAPK pathway
Endocrine reviews, under revision.
- Tang, C., Liu, Y., Yang, W., Storey, C., McMillen, T.S., Houston, B.A., Heinecke, J.W., and LeBoeuf, R.C. (2016). Hematopoietic ABCA1 deletion promotes monocytosis and worsens diet-induced insulin resistance in mice. *Journal of lipid research* *57*, 100-108.
- Tao, B., Jin, W., Xu, J., Liang, Z., Yao, J., Zhang, Y., Wang, K., Cheng, H., Zhang, X., and Ke, Y. (2014). Myeloid-specific disruption of tyrosine phosphatase Shp2 promotes alternative activation of macrophages and predisposes mice to pulmonary fibrosis. *J Immunol* *193*, 2801-2811.
- van der Sluis, I.M., de Ridder, M.A., Boot, A.M., Krenning, E.P., and de Muinck Keizer-Schrama, S.M. (2002). Reference data for bone density and body composition measured with dual energy x ray absorptiometry in white children and young adults. *Archives of disease in childhood* *87*, 341-347; discussion 341-347.
- Wang, J., Mizui, M., Zeng, L.F., Bronson, R., Finnell, M., Terhorst, C., Kyttaris, V.C., Tsokos, G.C., Zhang, Z.Y., and Kontaridis, M.I. (2016). Inhibition of SHP2 ameliorates the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* *126*, 2077-2092.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* *115*, 1111-1119.

- Wu, X., Simpson, J., Hong, J.H., Kim, K.H., Thavarajah, N.K., Backx, P.H., Neel, B.G., and Araki, T. (2011). MEK-ERK pathway modulation ameliorates disease phenotypes in a mouse model of Noonan syndrome associated with the Raf1(L613V) mutation. *J. Clin. Invest.* *121*, 1009-1025.
- Xu, D., Wang, S., Yu, W.M., Chan, G., Araki, T., Bunting, K.D., Neel, B.G., and Qu, C.K. (2010). A germline gain-of-function mutation in Ptpn11 (Shp-2) phosphatase induces myeloproliferative disease by aberrant activation of hematopoietic stem cells. *Blood* *116*, 3611-3621.
- Xu, J., Tao, B., Guo, X., Zhou, S., Li, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Cheng, H., Zhang, X., and Ke, Y. (2017). Macrophage-Restricted Shp2 Tyrosine Phosphatase Acts as a Rheostat for MMP12 through TGF-beta Activation in the Prevention of Age-Related Emphysema in Mice. *J Immunol* *199*, 2323-2332.
- Zhang, E.E., Chapeau, E., Hagihara, K., and Feng, G.S. (2004). Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16064-16069.
- Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4062-4072.
- Zhang, S.S., Hao, E., Yu, J., Liu, W., Wang, J., Levine, F., and Feng, G.S. (2009). Coordinated regulation by Shp2 tyrosine phosphatase of signaling events controlling insulin biosynthesis in pancreatic beta-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 7531-7536.
- Zhao, L., Xia, J., Li, T., Zhou, H., Ouyang, W., Hong, Z., Ke, Y., Qian, J., and Xu, F. (2016). Shp2 Deficiency Impairs the Inflammatory Response Against *Haemophilus influenzae* by Regulating Macrophage Polarization. *The Journal of infectious diseases* *214*, 625-633.
- Zheng, Y., Ley, S.H., and Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature reviews* *14*, 88-98.

III. Conclusion

Ainsi, ces travaux de thèse visaient à étudier l'effet d'une hyperactivation de SHP2 sur la sensibilité à l'insuline dans le SN

Nous avons mis en évidence pour la première fois, chez des patients atteints de SN et un modèle murin de cette maladie, que l'hyperactivation de SHP2 est associée à une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Ces données attestent donc d'un rôle promoteur de SHP2 dans le développement de l'insulino-résistance.

De façon intéressante, nous avons pu établir que l'insulino-résistance associée au SN était découplée de l'adiposité, suggérant un impact direct de l'hyperactivation de SHP2 dans ce processus. En effet, les patients et les souris présentent une adiposité réduite, sans signe évident ni de lipodystrophie, ni de lipotoxicité. De plus, lorsque placées en régime obésogène, les souris SN présentent une résistance à l'obésité, mais restent tout aussi intolérantes au glucose que leurs homologues en régime normal. Enfin, au cours d'un traitement pharmacologique au PD0325901, alors qu'une importante prise de masse grasse est observée, il n'y a pas de modification du profil glycémique des souris SN.

Nous avons ensuite documenté que les souris SN présentaient une inflammation de leurs différents tissus métaboliques (foie, muscle, tissu adipeux) et établi, par des expériences interventionnelles, que cette inflammation était à l'origine de la gluco-intolérance. En effet, la transplantation de moelle osseuse de souris SN dans des souris WT se traduit par une détérioration de leur métabolisme glucidique, suggérant que ce phénotype soit principalement « porté » par la lignée hématopoïétique. De plus, la suppression de macrophages, en diminuant l'inflammation, réverse l'intolérance au glucose des souris SN. Mécanistiquement, nous avons mis en évidence que les macrophages exprimant le mutant SN sont plus sensibles et activables et présentent un phénotype pro-inflammatoire. L'analyse génique des sous-populations spécifiques du SN, encore en cours, permettra de comprendre comment SHP2 promeut ces anomalies. L'ensemble de ces données renseigne donc sur le fait que l'hyperactivation de SHP2 est un événement suffisant pour promouvoir un état pro-inflammatoire et l'insulino-résistance subséquente.

Au vu de ces résultats et de données de la littérature attestant d'une surexpression de SHP2 dans un contexte d'obésité, nous avons posé l'hypothèse qu'une hyperactivation de SHP2 pourrait aussi participer à l'installation de l'insulino-résistance dans un contexte plus large d'obésité. Or de façon importante, tirant parti d'une nouvelle génération d'inhibiteur spécifique de SHP2, nous montrons qu'une inhibition de SHP2 dans un modèle murin de diabète induit par l'obésité reverse leur intolérance au glucose en diminuant l'inflammation au niveau des tissus métaboliques.

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en évidence un phénotype métabolique dans le SN associant une adiposité réduite, une insulino-résistance et une inflammation, et au-delà de la maladie rare, l'implication de SHP2 dans l'insulino-résistance au cours de l'obésité.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que l'expression systémique d'une forme hyperactive de SHP2, responsable du SN, est à l'origine d'une insulino-résistance causée par un phénotype pro-inflammatoire, et d'identifier un rôle majeur de SHP2 dans l'installation de l'intolérance au glucose en situation d'obésité. Ces résultats ouvrent plusieurs perspectives concernant les mécanismes de l'inflammation à l'origine de l'insulino-résistance, en particulier la relation SHP2/macrophages dans le contexte du SN, mais aussi dans l'insulino-résistance associée à l'obésité. Ils ouvrent aussi de nouveaux champs d'investigation concernant la physiopathologie du SN et des syndromes apparentés d'une part, et des maladies métaboliques d'autre part.

I. L'hyperactivation de SHP2, cause directe de l'insulino résistance

Mes travaux de thèse ont documenté, en utilisant le SN comme modèle d'étude, que l'expression d'une forme hyperactive de SHP2 induisait une résistance à l'insuline. Alors que celle-ci est souvent secondaire à des dysfonctions du tissu adipeux (e.g. obésité, lipodystrophie), elle semble dans le cas présent découplée de l'adiposité. Ainsi ce modèle génétique original a permis d'établir que l'hyperactivation de SHP2 pouvait être un mécanisme causal de l'insulino-résistance, en induisant une dysfonction macrophagique. Toutefois, de nombreuses inconnues demeurent quant aux mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu, à la contribution de possibles d'autres composantes et à l'extrapolation que nous pouvons faire de ces résultats à d'autres maladies.

1. Dysfonction macrophagique et mécanistique sous-jacente

Par des expériences de transplantation de moelle osseuse et de déplétion de macrophages par un traitement au clodronate, nous avons mis en évidence que l'origine de la résistance à l'insuline associée au SN est une inflammation provoquée par les macrophages. Nous montrons que la mutation activatrice de SHP2 induit une augmentation de la quantité de macrophages pro-inflammatoires dans les tissus métaboliques dont l'origine reste à déterminer. En effet, cette augmentation peut résulter d'un plus grand taux de recrutement

de macrophages pro-inflammatoires dans les tissus, et/ou d'une modification de la polarisation des macrophages résidents. A l'appui de la première hypothèse, nous avons observé que des BMDM issues de souris SN exprimaient plus de MCP-1, une chemokine impliquée dans l'attraction des macrophages. Ce phénomène de recrutement de macrophages pourrait d'autant plus être accentué par le fait que les mutations SN de SHP2 sont connues pour promouvoir une monocytose (Araki et al., 2004 ; Chan et al., 2009 ; Xu et al., 2010), laquelle peut être suffisante pour induire une insulino-résistance par un effet nombre sur les macrophages infiltrés (Beliard et al., 2017 ; Du et al., 2016 ; Nagareddy et al., 2014 ; Nagareddy et al., 2013 ; Tang et al., 2016), et perturbent aussi le drainage lymphatique. Cependant, les BMDM issus de souris SN surexpriment également des marqueurs de la polarisation vers le type pro-inflammatoire, de façon cohérente avec une précédente étude montrant que l'inhibition de SHP2 induit une polarisation M2 (Zhao et al., 2016), et sont plus sensibles au LPS. Ainsi, il est possible que la présence de macrophages pro-inflammatoires dans les tissus des souris SN soit la conséquence à la fois d'une augmentation du recrutement de macrophages pro-inflammatoires et d'une accentuation de leur polarisation M1.

Afin de mieux comprendre l'impact de l'hyperactivation de SHP2 sur le développement de l'inflammation des tissus métaboliques, nous avons réalisé un scRNAseq sur cellules isolées du foie (CD45+, F4/80+). Nous nous sommes concentrés sur les macrophages du foie étant donné que suite au traitement avec le clodronate, la phosphorylation d'AKT en réponse à l'insuline était restaurée dans ce tissu, illustrant le lien direct entre la présence des macrophages SN dans le foie et sa résistance à l'insuline. Les premières analyses du scRNAseq montrent que globalement, les cellules SN surexpriment plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation, parmi lesquels on retrouve *Cd5l* qui joue un rôle dans l'inflammation durant l'obésité ainsi que dans la réponse inflammatoire après un infarctus du myocarde (Kurokawa et al., 2011; Nishikido et al., 2016) et *Fcna*, un marqueur de la polarisation M1 des macrophages (Yang et al., 2017). De façon intéressante, la population de macrophages peut être répartie en plusieurs clusters de cellules caractérisés par des profils d'expression génique spécifiques ; or, il existe un cluster spécifique du SN dans lequel on retrouve la majorité des gènes up-régulés au niveau global, attestant d'une contribution particulière de ce cluster au profil général (Tableau 4).

Tableau 4 : Top 10 des gènes surexprimés dans la population globale de cellules hépatiques CD45+, F4/80+ de souris SN vs WT et dans le cluster 6

NS vs WT			Cluster 6		
Gene Name	Log2 Fold Change	P-Value	GeneName	Log2 Fold Change	P-Value
Fcna	5.86	4.53e-35	Fabp7	5.87	2.74-66
Clec4f	5.41	2.09e-35	Vsig4	5.80	2.74-66
Cd5l	4.83	5.35e-30	Cd163	5.62	4.16e-46
Vsig4	4.83	1.10e-25	C6	5.44	7.32e-48
Fabp7	4.62	3.70e-24	Folr2	5.42	2.65e-59
Apoc1	3.85	4.23e-20	Marco	5.41	1.20e-30
Slc40a1	3.29	5.88e-16	Cd5l	5.38	1.63e-63
Sdc3	2.55	7.24e-12	Fcna	5.29	1.85e-60
C1qa	2.53	6.50e-13	Clec4f	5.23	7.89e-62
Cfp	2.48	3.81e-12	Timd4	5.19	1.41e-46

En plus de *Cd5l* et *Fcna*, on note une surexpression de *Clec4f* qui a été montré récemment comme un marqueur spécifique des cellules de Kupffer (CK) (Scott et al., 2016), ainsi que de *Vsig4* et *Fabp7*, également des marqueurs de CK, et de CD163, marqueur de l'activation des CK (Kazankov et al., 2014). Ainsi, il est possible d'imaginer que la mutation SN de SHP2 induise une activation des CK en cellules pro-inflammatoires. Il reste à déterminer si l'hyperactivation de SHP2 modifie l'identité des CK, leur faisant acquérir un phénotype plus pro-inflammatoire, ou permet à des cellules infiltrées de développer des caractéristiques des CK. Un début de réponse réside peut-être dans le fait que cette sous-population surexprime également des marqueurs de cellules infiltrées (*C1qa*, *C1qc*, *Apoc1*, *Timd4*). L'analyse fine des populations macrophagiques à l'issue d'un transfert de moelle, ou dans des modèles d'expression tissu – spécifique du mutant SN de SHP2 (LysM-Cre vs *Clec4f*-Cre), de même que le suivi des CK et des macrophages recrutés par des expériences de tracing, permettraient de répondre à cette question. Dans tous les cas, cette population spécifique de macrophages pourrait jouer un rôle crucial dans le développement de l'IR. Il serait également intéressant d'évaluer si une population similaire est retrouvée au cours de l'inflammation et de l'insulino-résistance induites par un régime gras, l'inflammation hépatique dans ce contexte étant liée à une activation des CK et à l'infiltration de macrophages hépatiques recrutés (Morinaga et al., 2015).

Ces observations nous amènent également à nous demander quels sont les mécanismes moléculaires dérégulés par le mutant hyperactif de SHP2 qui induisent cette dysfonction du macrophage. Nous montrons que la mutation SN de SHP2 active la voie NF- κ B avec ou sans

stimulation au LPS. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études montrant l'implication de SHP2 dans l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (You et al., 2001; Neznanov et al., 2004; Zhao et al., 2016). Cependant, même si SHP2 a été montrée comme nécessaire au complexe IKK et présent en aval du récepteur à l'IL-1, sa cible exacte est encore inconnue (You et al., 2001). De plus, selon l'impact cellulaire de l'hyperactivation de SHP2 qui aura été identifié (e.g. différenciation des macrophages résidents, prolifération accrue et/ou polarisation des macrophages recrutés), de nombreux mécanismes peuvent être envisagés, impliquant différentes voies de signalisation et/ou différents types de récepteurs. Par ailleurs, il est bien établi que la voie MAPK est un effecteur majeur de SHP2, son hyperactivation étant liée de façon causale à de nombreux symptômes du SN. Cependant, nos données suggèrent que l'induction de l'inflammation par SHP2 peut être indépendante des MAPK. En effet, lors du traitement avec le clodronate, le phénotype glucidique ainsi que l'inflammation sont améliorés et l'activation d'AKT est restaurée au niveau du foie alors que l'activation des MAPK est toujours présente. De plus, un traitement avec un inhibiteur de MEK (PD0325901) diminue l'activation des MAPK mais n'a pas d'impact sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les différents tissus métaboliques. Ces résultats sont cohérents avec une autre étude montrant que SHP2 induit l'activation de NF- κ B indépendamment de p38 ou de ERK1/2 (You et al., 2001 ; Zhao et al., 2016), et recourent des observations plus larges suggérant que l'impact des mutants hyperactifs de SHP2 dans la lignée hématopoïétique ne soit pas limité à leur effet sur la voie RAS/MAPK. Toutefois, nos arguments reposant sur des traitements ponctuels, nous ne pouvons exclure que l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK associée au mutant SN de SHP2 participe de façon précoce à l'installation de l'inflammation.

A côté d'un impact intrinsèque de la mutation de SHP2 sur le macrophage, nous ne pouvons exclure qu'un mécanisme indirect puisse contribuer à la polarisation des macrophages infiltrés et/ou à l'activation des macrophages résidents. Par exemple, il est largement établi dans un contexte d'obésité qu'une modification de la perméabilité intestinale, en permettant le passage d'antigènes alimentaires et bactériens, participe à l'inflammation de bas grade, notamment au niveau du foie (Ding et al., 2010). Or, un rôle important de SHP2 a été décrit au niveau de l'épithélium intestinal dans l'orientation des cellules progénitrices vers les cellules de Paneth ou les cellules caliciformes (Heuberger et al., 2014). De plus amples études

seront nécessaires pour caractériser l'origine de ces processus inflammatoires dans les différents tissus concernés.

2. Implication d'autres cellules immunitaires

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur l'effet de l'hyperactivation de SHP2 sur les macrophages dans la mesure où la déplétion des macrophages apparaît suffisante pour améliorer le phénotype métabolique des souris SN. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une participation d'autres cellules immunitaires dans l'inflammation. En effet, la délétion de SHP2 dans les cellules dendritiques est connue pour provoquer une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une infection (Deng et al., 2015). De plus, l'inhibition de SHP2 diminue la sécrétion d'IFN γ et d'IL-17A en réduisant le nombre de lymphocytes T dans un modèle murin de Lupus (Wang et al., 2016). Ainsi, d'autres caractérisations sont encore nécessaires pour mieux comprendre l'impact d'une hyperactivation de SHP2 sur les populations immunitaires. Pour cela, nous pourrions utiliser la même approche que dans ces travaux en isolant les cellules immunitaires de différents tissus métaboliques, puis en les caractérisant suivant leurs marqueurs de surface par cytométrie en flux.

3. Autres contributions à l'insulino résistance

a. SHP2 et signalisation de l'insuline

Nous avons montré dans ce travail de thèse que l'insulino-résistance associée à l'hyperactivation de SHP2 dans le SN est secondaire à une inflammation des tissus métaboliques. Cependant, comme SHP2 peut moduler négativement la voie PI3K (Case et al., 1994; Rocchi et al., 1996; Ugi et al., 1996; Myers et al., 1998; Ouwens et al., 2001), il est possible que l'hyperactivation de SHP2 diminue la signalisation PI3K en réponse à l'insuline, contribuant ainsi à l'insulino résistance de certains tissus métaboliques. On peut anticiper que cet effet soit peu marqué dans le foie, compte tenu de la restauration de la sensibilité hépatique à l'insuline lors de la déplétion en macrophages. En effet, alors que l'hyperactivation de SHP2 est toujours présente dans les hépatocytes, on n'observe pas d'inhibition de la voie PI3K en réponse à l'insuline. Par contre, cet effet pourrait être plus présent dans le muscle. A l'appui de cette hypothèse, il est intéressant de noter que nos

expériences de transplantation de moelle osseuse révèlent une contribution des cellules non hématopoïétiques à l'insulino résistance, des souris NS reconstituées avec de la moelle osseuse de souris WT restant plus insulino résistantes que des souris WT.

De plus, des résultats préliminaires montrent que dans des MEFs exprimant différents mutants hyperactifs de SHP2 (N308D, D61del) la phosphorylation d'AKT sur sa S473 induite par l'insuline est diminuée (Figure 26), suggérant un impact direct de l'hyperactivation de SHP2 sur la signalisation PI3K. A l'appui de ce possible effet de SHP2 sur la signalisation insulinique, il est à rappeler que des mutants hypoactifs de SHP2, responsables du SN-ML induisent une plus forte activation de la voie PI3K en réponse à l'insuline *in vitro* qui se traduit par une meilleure sensibilité à l'insuline *in vivo* (Tajan et al., 2014).

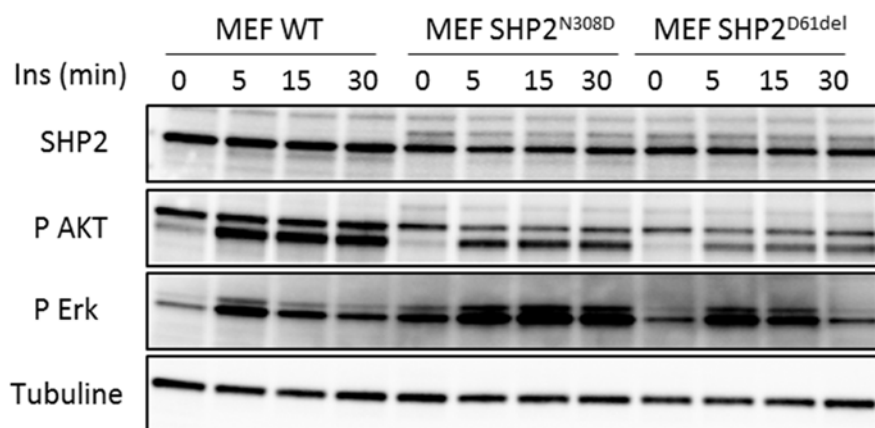


Figure 26 : Impact de mutants hyperactifs de SHP2 sur l'activation de la voie insulinique.

Des MEFs préalablement transduites avec les mutants hyperactifs N308D et D61del sont stimulées par l'insuline pendant différentes durées et la phosphorylation d'AKT a été mesurée et utilisée comme read-out de l'activation de la voie insulinique.

Ces résultats suggèrent qu'en plus de promouvoir l'inflammation, SHP2 agirait également au niveau cellulaire sur la voie PI3K. Mécanistiquement, ceci pourrait s'expliquer par une déphosphorylation plus importante par les mutants hyperactifs de SHP2 des sites de recrutement de PI3K portés par IRS1, ces motifs YXXM pouvant être des substrats de SHP2 (Rocchi et al., 1996 ; Ugi et al., 1996 ; Case et al., 1994 ; Myers et al., 1998 ; Ouwens et al., 2001). Il serait intéressant d'étudier cette mécanistique et d'étendre ce résultat à d'autres lignées cellulaires métaboliquement pertinentes (C2C12, 3T3-F442A...) pour évaluer la réponse fonctionnelle à l'insuline (e.g. uptake de glucose).

b. SHP2 et production d'insuline

L'intolérance au glucose peut aussi traduire un déficit de production d'insuline, situation retrouvée dans le diabète de type I. S'il est évident que les souris SN ne sont pas insulino-péniques, de façon intéressante, nous n'observons pas d'augmentation significative de l'insulinémie des souris SN suite à un bolus de glucose par rapport aux souris WT, alors que les souris SN sont insulino-résistantes. De plus, lors d'un régime gras, l'insulinémie des souris SN n'est pas modifiée, alors qu'elle augmente considérablement chez les souris WT (Figure 27).

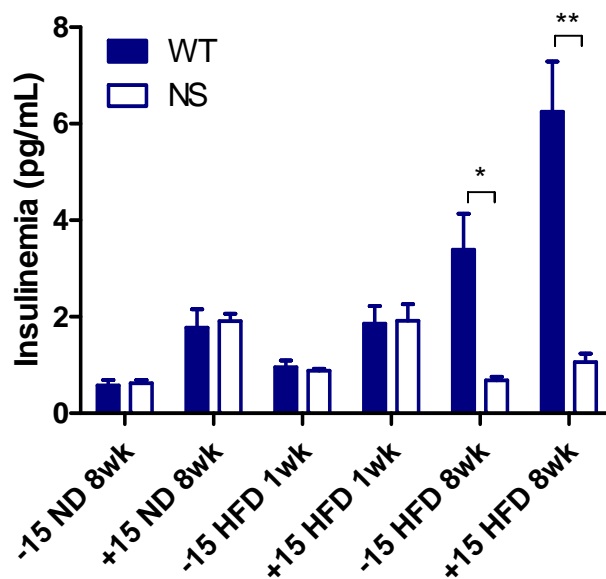


Figure 27 : Évolution de l'insulinémie au cours du temps avant et après un bolus de glucose

L'insulinémie est mesurée à divers âges, chez des animaux nourris en régime normal ou en régime gras, avant et après un bolus de glucose. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2 way ANOVA avec correction de Bonferroni, $n = 18-20$ dans chaque groupe.

Cette absence d'augmentation d'insulinémie pourrait être due à une moindre capacité de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. En effet, bien qu'un marquage insuline dans le pancréas ne révèle pas de différence significative entre les SN et les WT en terme de quantité d'insuline, nous n'avons pas évalué les capacités de sécrétion de la cellule β . Étant connu que des cytokines pro-inflammatoires diminuent la sécrétion d'insuline au niveau de la cellule β (Maedler et al., 2002; Donath et al., 2009; Nordmann et al., 2017), il est possible d'envisager que l'inflammation présente dans les tissus métaboliques du SN soit également retrouvée au niveau de la cellule β et diminue la sécrétion d'insuline. A l'appui de cette

hypothèse, nous avons mesuré que l'insulinémie des souris NS transplantées avec de la moelle osseuse WT était significativement augmentée (Figure 28).

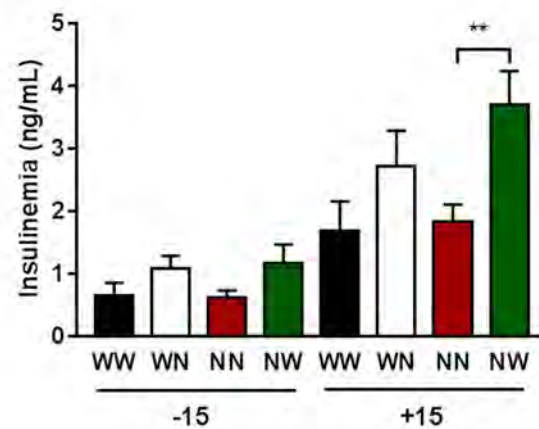


Figure 28: Mesure de l'insulinémie avant et après un bolus de glucose lors de la transplantation de la moelle osseuse

L'insulinémie est mesurée 17 semaines après la greffe de moelle osseuse. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, 2 way ANOVA avec correction de Bonferroni, $n = 8-14$ dans chaque groupe. (WW : WT greffées avec une moelle osseuse WT ; WN : WT greffées avec une moelle osseuse SN ; NN : SN greffées avec une moelle osseuse SN ; NW SN greffées avec une moelle osseuse WT).

Pour étayer cette observation, il faudrait caractériser le niveau d'inflammation du pancréas des souris SN et évaluer sur îlots isolés si le glucose-sensing est altéré en mesurant la sécrétion d'insuline en réponse à diverses concentrations de glucose. Ensuite, il serait intéressant de réaliser des expériences de co-culture avec des îlots isolés et des macrophages SN ou WT (culture primaire, ou lignées préalablement transduites avec les formes mutées de SHP2) pour mesurer leur capacité de sécrétion d'insuline.

La moindre sécrétion d'insuline pourrait également être liée à une diminution de l'effet incrétine, notamment via le GLP-1 qui est connu pour stimuler la sécrétion d'insuline de la cellule β (Nauck et al., 1986; Kjemis et al., 2003). En effet, l'intolérance au glucose des souris SN apparaît moins marquée lorsque l'on réalise une IP-GTT (qui permet de s'affranchir de l'effet incrétine) que lors d'une OGTT classique (Figure 29).

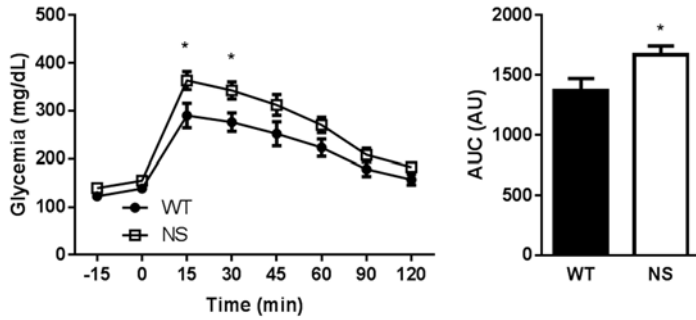


Figure 29 : Test de tolérance au glucose réalisé en IP

Les animaux reçoivent un bolus de glucose en ip, puis la glycémie est mesurée au cours du temps. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, * $p < 0,05$, 2 way ANOVA avec correction de Bonferroni, $n = 8-12$ dans chaque groupe

De plus, des résultats préliminaires montrent que suite à un prétraitement de 30 min avec un antagoniste au récepteur du GLP-1 (exendin-9), l'ingestion d'un bolus de glucose n'entraîne pas de modification significative de la tolérance au glucose chez la souris SN, ni de diminution de l'insulinémie (Figure 30).

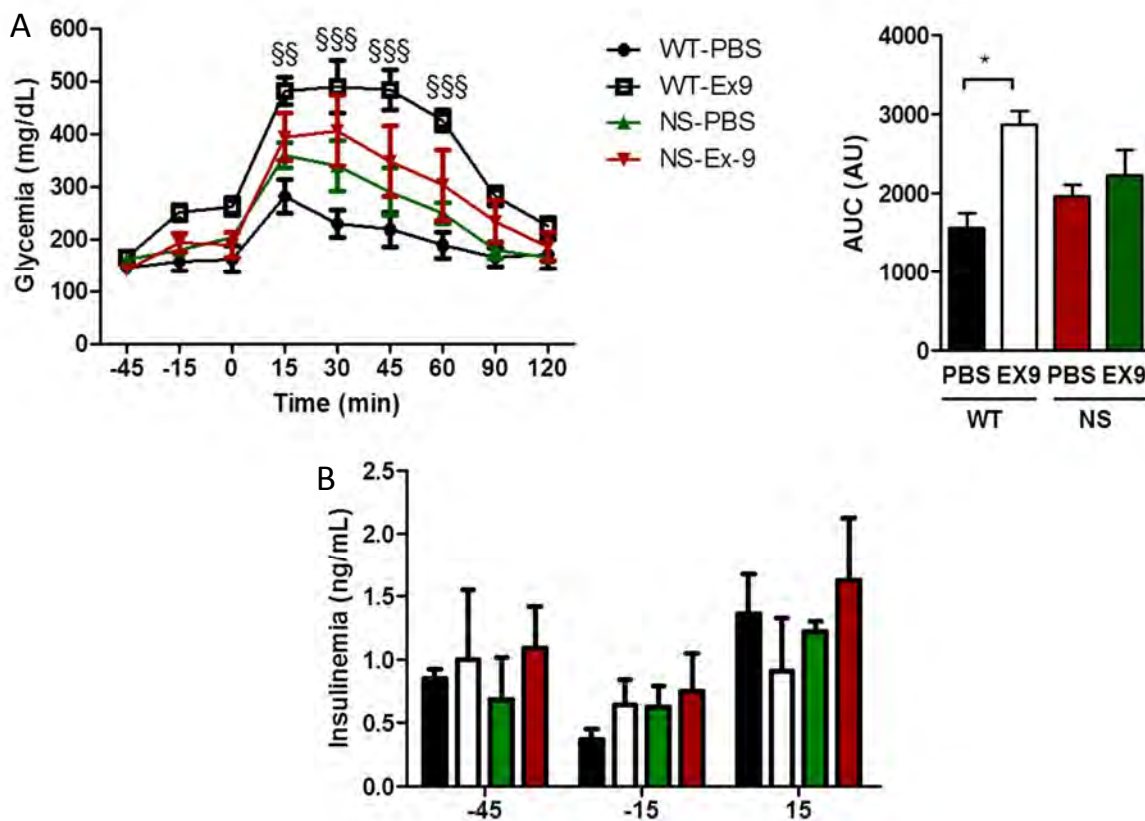


Figure 30 : Test de tolérance au glucose et mesure de l'insulinémie après un pré-traitement avec de l'Exendine 9

Les animaux sont pré-traités pendant 30 min avec de l'Exendine 9, puis leur tolérance au glucose (A) et leur insulinémie (B) ont été mesurées. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, * $p < 0,05$, Student t -test, $\$ \$ p < 0,01$, $\$ \$ \$ p < 0,001$, WT-PBS vs WT-EX9, 2 way ANOVA avec correction de Bonferroni, $n = 4-5$ dans chaque groupe.

Ce résultat peut s'expliquer soit par une moindre sécrétion de GLP-1 par les souris SN, soit par un défaut de signalisation du GLP-1. Or, le dosage du GLP-1 plasmatique 15 min après ingestion du bolus de glucose montre que les souris SN sécrètent autant de GLP-1 que les souris WT (Figure 31), suggérant alors que l'effet durant l'OGTT soit provoqué par une altération de la signalisation GLP-1. Pour confirmer ce résultat, il serait possible de réaliser le même protocole expérimental en prétraitant avec un agoniste du récepteur au GLP-1 (exendin-4). Ainsi, si ce prétraitement n'entraîne aucune modification de la tolérance au glucose et de la sécrétion d'insuline chez le SN, cela confirmerait l'altération de signalisation GLP-1.

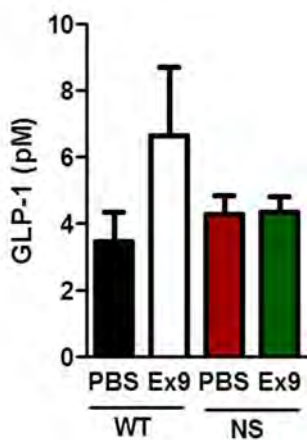


Figure 31: Dosage du GLP-1 plasmatique après un bolus de glucose

Les animaux reçoivent un bolus de glucose, puis 15 min après, le sang est prélevé en veine porte, et le dosage de GLP-1 est réalisé sur plasma. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, n= 4-5 dans chaque groupe.

4. L'activation de SHP2 serait-elle à l'origine de l'inflammation provoquant l'insulino-résistance dans un contexte de maladies métaboliques chroniques?

La démonstration d'un rôle de l'hyperactivation de SHP2 dans l'installation de l'inflammation des tissus métaboliques et de l'insulino résistance qui en découle amène naturellement à s'interroger sur la transposition de ce même mécanisme dans un contexte plus large de maladies métaboliques (obésité, syndrome métabolique), et donc à envisager que son inhibition puisse représenter une approche intéressante pour empêcher le développement de l'insulino résistance.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe un lien entre l'expression de SHP2 et l'obésité. Deux études ont montré qu'en situation d'obésité, lorsque des souris sont nourries avec un régime gras, l'expression de SHP2 augmente au niveau du foie et des tissus adipeux

(Bettaieb et al., 2011; Nagata et al., 2012). À la lumière de nos résultats, il serait intéressant d'évaluer si l'augmentation d'expression de SHP2 dans le foie et les tissus adipeux ne serait pas due à sa surexpression dans les macrophages et/ou au recrutement accru de macrophage exprimant/surexprimant SHP2. En effet, ces deux tissus comprennent une grande proportion de macrophages présents en régime normal et qui augmente en régime gras. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'obésité induise une surexpression de SHP2 dans d'autres cellules ou tissus (e.g. hépatocyte, adipocyte, cellule intestinale) et que cela contribue à l'installation de l'inflammation ou à d'autres processus promoteurs de l'insulino-résistance. En effet, le KO hépatocytaire de SHP2 améliore le métabolisme glucidique et protège de l'insulino-résistance induite par un régime gras (Matsuo et al., 2010 ; Nagata et al., 2012). Une question importante est alors de comprendre ce qui provoque la surexpression de SHP2 en régime obésogène. En effet, l'étude de Nagata et al. révèle que l'expression de SHP2 est sensible au régime gras, mais également au statut nutritionnel en diminuant durant le jeûne et en augmentant durant le renourrissage (Nagata et al., 2012). Ceci suggère que son expression puisse être sous la dépendance de certains lipides ou de facteurs de transcription intervenant dans le métabolisme des lipides comme SREBP ou ChREBP. De façon intéressante, le profil d'expression de SREBP dans le foie ou les tissus adipeux suit celui de SHP2 (Gosmain et al., 2005; Lam et al., 2012). En outre, bien que les données sur la régulation de l'expression de SHP2 soient encore parcellaires, il est intéressant de noter que la transcription de son gène peut être induite par NF- κ B (Seki et al., 2007; Kang et al., 2017), ce qui pourrait s'inscrire dans une boucle d'amplification de l'inflammation.

Bien que nous n'ayons pas documenté dans notre étude une augmentation de l'expression ou de l'activité de SHP2 en situation d'obésité, nous apportons une évidence indirecte forte de l'implication de SHP2 dans l'insulino-résistance secondaire à des désordres métaboliques. En effet, un traitement chronique par un inhibiteur de SHP2 améliore la gluco-intolérance et la métaflammation induites par un régime gras. Ces résultats suggèrent que SHP2 pourrait être le point de départ de l'inflammation dans l'obésité et une cause suffisante pour altérer la tolérance au glucose. Il est important de noter que des études antérieures avaient démontré un rôle protecteur de SHP2 au niveau neuronal sur le contrôle de l'obésité et sur la tolérance au glucose, posant le concept de son activation comme thérapie pour diminuer l'obésité et les troubles du métabolisme glucidique associés (Zhang et al., 2004; Feng, 2006; Krajewska et

al., 2008; Banno et al., 2010; He et al., 2012). L'importance de ces effets centraux et l'intérêt thérapeutique de l'activation de SHP2 semble toutefois à modérer à la lumière de nos résultats montrant l'importance de l'hyperactivation de SHP2 sur l'inflammation et l'insulino-résistance qui en résulte.

Si l'inhibition de SHP2 au cours de l'obésité semble efficace sur la tolérance au glucose, les risques associés sont encore inconnus. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, SHP2 a des rôles pléiotropiques dans le développement et le métabolisme. Ainsi, bien que l'inhibition de SHP2 ne devrait pas affecter la croissance chez la souris adulte, elle pourrait avoir des effets secondaires non spécifiques sur les cellules en prolifération, semblables aux anti-cancéreux. Toutefois, l'idée serait plutôt, dans le contexte métabolique, de normaliser l'activité de SHP2, et non de l'inhiber totalement, limitant ainsi ces effets. De plus, son impact sur les cellules immunitaires et l'adiposité est à prendre en compte. Bien que plusieurs études montrent que l'inhibition de SHP2 est très efficace pour diminuer l'inflammation dans un contexte inflammatoire chronique ou lors d'un choc septique (Hsu et al., 2018), l'impact de son inhibition avant infection n'est pas connu. L'on pourrait imaginer que son inhibition diminue la capacité des cellules immunitaires à prévenir l'infection de pathogènes.

Dans un contexte de traitement de l'insulino-résistance associée à l'obésité, un effet secondaire important à prendre en compte est l'impact sur l'adiposité. L'hyperactivation de SHP2 résulte en une adiposité réduite et son inactivation dans certains tissus provoque une obésité, par des effets centraux notamment sur la prise alimentaire. Il se pourrait donc que l'inhibition de SHP2 induise une prise de masse grasse, problématique dans une situation d'obésité. Bien que nous montrions qu'un traitement de deux semaines n'impacte pas l'adiposité de souris obèses, nous n'avons pas encore d'information sur l'effet d'un traitement à plus long terme. En effet, il est connu que l'inhibition de SHP2 diminue l'activation des MAPK, et nous démontrons ici que l'inhibition des MAPK avec du PD0325901 pendant quatre semaines induit une augmentation de l'adiposité chez des animaux en régime normal. Cette différence d'effet pourrait être due à la durée du traitement (deux semaines pour le SHP099 vs quatre semaines pour le PD0325901), à un niveau d'inhibition différent selon le traitement employé ou à l'effet régime, puisque plusieurs études montrent qu'inhiber les MAPK en HFD ne modifie pas l'adiposité des souris (Banks et al., 2015; Ozaki et al., 2016). D'autres études

seront donc nécessaires pour déterminer si un traitement par cet inhibiteur de SHP2 modifie l'adiposité.

Dans l'éventualité d'effets secondaires, une stratégie visant à empêcher l'augmentation d'expression de SHP2 induite par l'obésité pourrait représenter une approche plus ciblée et spécifique pour éviter la survenue du DT2. La question de comprendre ce qui provoque l'augmentation de SHP2 en régime gras prend toute son importance. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité ou de l'expression de SHP2 serait une thérapie efficace pour améliorer la sensibilité à l'insuline dans l'obésité. Dans ce sens, un brevet d'invention sur l'utilisation du SHP099 contre l'insulino-résistance est en cours de dépôt (annexe 1).

II. Inflammation et désordres métaboliques : de nouveaux composants dans la physiopathologie du SN et des syndromes apparentés.

L'identification de désordres métaboliques dans le SN, à la fois dans un modèle murin et chez des patients, soulève également des questions quant à la physiopathologie de ce syndrome et des maladies apparentées.

1. Autres désordres métaboliques

En plus de la résistance à l'insuline, nous avons mis en évidence que le SN est associée à une adiposité réduite à la fois chez les patients ainsi que dans notre modèle murin de la maladie. La cause de cette adiposité réduite n'est pas connue, mais plusieurs explications sont possibles. Parmi ces explications, nous avons également mis en évidence que les souris SN présentent une augmentation de leur dépense énergétique (Figure 32).

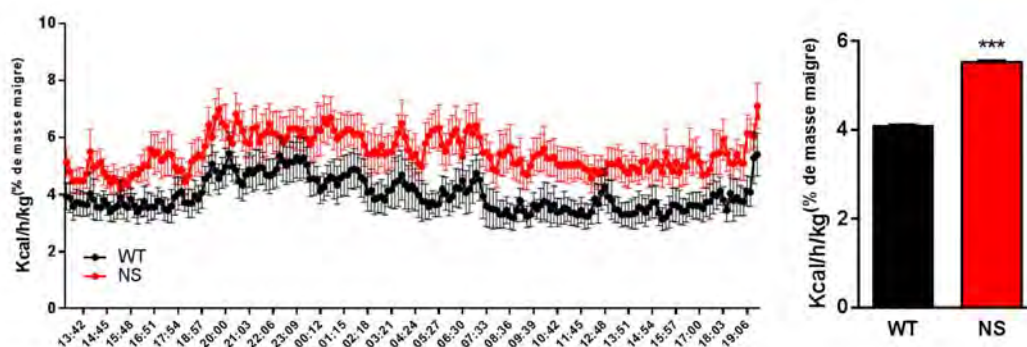


Figure 30 : Mesure de la dépense énergétique

La dépense énergétique de souris WT et SN est mesurée pendant 24h par calorimétrie indirecte. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, *** $p < 0,001$, Student t-test, $n = 8$ dans chaque groupe

Ainsi, il serait possible d'imaginer que dans les tissus adipeux, il y ait une augmentation de l'activité mitochondriale associée à un découplage de la chaîne respiratoire entraînant ainsi une augmentation de la production de chaleur. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré qu'une mutation hyperactivatrice de SHP2 induit une augmentation de la respiration mitochondriale de MEFs transduites avec une forme mutée de SHP2 (Zheng et al., 2013). Cette réduction d'adiposité pourrait également être une conséquence d'une altération de l'adipogenèse et/ou une augmentation de l'activité lipolytique, comme il l'a déjà été montré dans le SN-LM (Tajan et al., 2014). Selon cette dernière hypothèse, il serait intéressant de déterminer le devenir des acides gras libérés, et d'évaluer notamment s'ils ne sont pas utilisés par les macrophages. Associé à cette adiposité réduite, un trait marquant retrouvé à la fois chez les patients et dans le modèle murin est l'hypoleptinémie. Si elle peut être la conséquence de l'adiposité réduite, on peut également envisager une origine centrale de ce phénotype : en effet, SHP2 est directement recrutée en aval du récepteur de la leptine et promeut ses effets (do Carmo et al., 2014). Un mutant hyperactif de SHP2 induirait alors une forte sensibilité à la leptine, et en conséquence un rétrocontrôle tant sur le développement de l'adiposité que sur la production de leptine. Dans la même veine, une telle hypersensibilité à la leptine pourrait expliquer l'augmentation de dépense énergétique ainsi que les anomalies de prise alimentaire. En effet, bien que ce dernier aspect ne soit pas retrouvé chez des souris SN adultes, les difficultés d'alimentation représentent un problème majeur chez les nourrissons atteints de SN, nécessitant une alimentation entérale dans 30% des cas.

2. Similitudes et différences parmi les Rasopathies

Le phénotype métabolique observé dans le SN pose également la question de son existence dans des pathologies apparentées. Le SN fait partie d'une famille de maladies appelées Rasopathies, qui sont causées par des mutations de composants intervenant dans la voie RAS/MAPK. Ainsi, il existe certains symptômes du SN qu'il est possible de retrouver dans d'autres Rasopathies. Parmi ces symptômes, on retrouve l'adiposité réduite qui a déjà été montrée pour être présente également dans le SN-LM (Tajan et al., 2014). Cette caractéristique semble dépendre de l'hyperactivation des MAPK, puisque une précédente étude du laboratoire a montré qu'un traitement avec un inhibiteur de MEK augmentait le poids, la masse grasse et la leptinémie des souris SN-LM (Tajan et al., 2014), et nos résultats montrent que ce phénomène se retrouve aussi chez les souris SN (Figure S5). Ainsi, l'adiposité

réduite pourrait être un trait commun à toutes les Rasopathies. Dans ce sens, l'IMC réduit semble être retrouvé de façon générale dans ces syndromes, bien que des études plus vastes soient nécessaires pour valider ce concept (Malaquias et al., 2012 ; Binder et al., 2012).

Une autre caractéristique commune aux Rasopathies pourrait être l'augmentation de la dépense énergétique. En effet, il a été rapporté une augmentation de la dépense énergétique dans des patients atteints du syndrome de Costello (Leoni et al., 2016). De plus, cette augmentation de dépense énergétique est également retrouvée dans un modèle murin du SN-LM (Tajan et al., 2014), et de premiers résultats du laboratoire montrent une réversion de ce phénotype, tant chez les souris SN que chez les souris SN-LM, lors d'un traitement chronique par un inhibiteur de MEK.

Cependant, d'autres caractéristiques pourraient ne pas s'appliquer à l'ensemble des Rasopathies. En effet, nous mettons ici en évidence le lien entre SHP2, inflammation et insulino-résistance. Ce lien semble indépendant de l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK, puisque suite au traitement avec un inhibiteur de MEK, on ne voit pas de modification de l'inflammation chez les souris SN ni de leur métabolisme glucidique. Ainsi, cette association semblerait purement dépendante de SHP2 et pourrait être en lien avec son effet sur STAT3 dans le lignage hématopoïétique (Zhang et al., 2004, 2009). Pour renforcer l'hypothèse que cette association soit indépendante des MAPK, nous pourrions regarder l'activation de la voie MAPK dans des BMDM de souris SN après stimulation au LPS. De plus, dans le SN-LM, des données préliminaires montrent que bien que ces animaux présentent une hyperactivation des MAPK (Tajan et al., 2014), nous ne retrouvons pas de différences significatives dans l'expression génique de marqueurs pro-inflammatoires au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux blanc, et un profil glucidique en miroir de celui du SN (meilleure tolérance à l'insuline et au glucose) (Figure 33)

L'insulino-résistance et la métainflammation pourraient donc être un trait restreint au SN causé par des mutations de *PTPN11*, une hypothèse qu'il serait intéressant de vérifier en analysant d'autres modèles murins de SN (*Sos1^{E846K}*, *Raf1^{L613V}*) ou d'autres Rasopathies (e.g. syndrome de Costello).

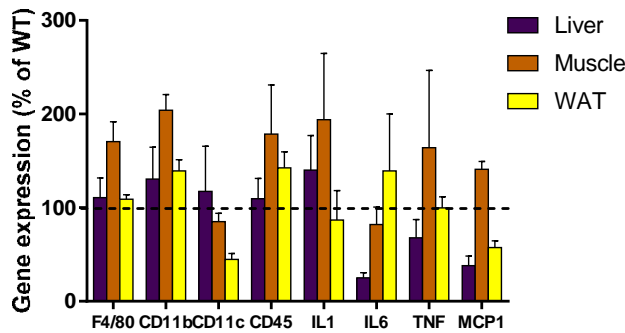


Figure 31 : Expression génique de marqueurs pro-inflammatoires dans le foie, le muscle et le tissu adipeux blanc chez des souris WT et SN-LM

L'expression génique des marqueurs est réalisée par RT-qPCR et est exprimée en pourcentage de variation par rapport au WT. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SEM, Student t-test, $n=5$ dans chaque groupe

3. Vers un rôle étendu de l'inflammation et du macrophage dans le SN?

Étant donnée l'implication de SHP2 dans l'inflammation, serait-il possible que certains symptômes du SN soient provoqués par une inflammation ?

a. Les cardiopathies

Les cardiopathies sont l'un des principaux symptômes du SN et se caractérisent par une sténose des valves pulmonaires dans 60% des cas et une cardiomyopathie hypertrophique dans 20% des cas (Paccoud et al., 2018). Bien qu'il a été montré dans un modèle murin du SN que ce défaut soit associé à l'hyperactivation des MAPK, on peut se demander si une inflammation durant le développement cardiaque ne pourrait pas participer au phénotype (Nakamura et al., 2007). En effet, plusieurs études indiquent que des cytokines sont impliquées dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et notamment via l'activation de la voie NF- κ B (Thaik et al., 1995; Purcell et al., 2001; Smeets et al., 2008).

b. Les troubles cognitifs

Il est bien connu qu'une inflammation altère les capacités cérébrales, que ce soit lors du développement cérébral au niveau de la matière blanche ou de l'hippocampe, ou suite à une opération (troubles cognitifs post-opératoires) (Favrais et al., 2011; Su et al., 2012; Peng et al., 2013; Green and Nolan, 2014). Un des symptômes du SN est un déficit cognitif qui est présent chez plus de la moitié des patients (Paccoud et al., 2018). Il a été montré dans un modèle souris du SN que les troubles de l'apprentissage et de la mémoire sont réversés chez la souris adulte suite à un bref traitement avec de la lovastatine (Lee et al., 2014). Or il est décrit que la lovastatine diminue la synthèse de médiateurs inflammatoires dans l'hippocampe (Gouveia

et al., 2011). De plus, il a récemment été montré dans une lignée murine de macrophages (RAW264.7) que son effet anti-inflammatoire est médié par une diminution d'activation de la voie NF- κ B (Choi et al., 2017).

c. Le retard de croissance

Un autre symptôme du SN est le retard de croissance qui a été montré par de précédents travaux de l'équipe pour être provoqué par une diminution de libération d'IGF-1 et amélioré suite à un traitement avec un inhibiteur de MEK (U1026) (Serra-Nedelec et al., 2012).

Plusieurs études suggèrent une association entre de hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires et de bas niveaux de IGF-1 (Street et al., 2006; Choukair et al., 2014). De plus, des souris surexprimant l'IL-6 présentent une diminution des niveaux de IGF-1 associée à un retard de croissance (De Benedetti et al., 1997). Ces études suggèrent donc que l'inflammation, en diminuant les taux d'IGF-1, puisse impacter la croissance. Or, dans l'étude de de Rocca Serra-Nedelec et al., les souris SN présentent une diminution des niveaux plasmatiques d'IGF-1 et une libération diminuée d'IGF-1 en réponse à l'hormone de croissance GH suggérant qu'une inflammation pourrait participer au retard de croissance des souris SN. Enfin, les auteurs montrent que l'utilisation du U1026, en diminuant l'activation des MAPK, améliore la libération d'IGF-1 et augmente la croissance des animaux. Étant donné que l'inhibiteur U1026 a été montré pour diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires suite à une stimulation au LPS (Schuh and Pahl, 2009), on peut alors se demander si l'inflammation présente chez la souris SN ne pourrait pas participer au retard de croissance.

d. Les anomalies squelettiques

Un des symptômes caractéristiques du SN est représenté par les anomalies squelettiques. Le tissu osseux est notamment constitué d'ostéoclastes, qui sont des cellules dérivées de progéniteurs myéloïdes intervenant dans la résorption osseuse. Étant donnée l'implication de SHP2 dans l'activation des macrophages, l'on pourrait se demander si ces anomalies squelettiques ne seraient pas une conséquence de l'hyperactivation de SHP2 dans les ostéoclastes ou si l'hyperactivation de SHP2 dans les progéniteurs n'induirait pas une plus grande quantité d'ostéoclastes. Dans ce sens SHP2 a été décrite comme un régulateur positif de la génération des ostéoclastes (Bauler et al., 2011; Kamiya et al. 2011 ; Yang et al., 2013 ;

Wang et al. 2013; Zhou et al., 2015 ; Mohan et al. 2015). A l'appui de cette hypothèse, des résultats préliminaires montrent que l'hyperactivation de SHP2 associée au SN induit une augmentation du nombre d'ostéoclastes *in vivo* et une induction plus forte de l'ostéoclastogénèse *in vitro* (Figure 34).

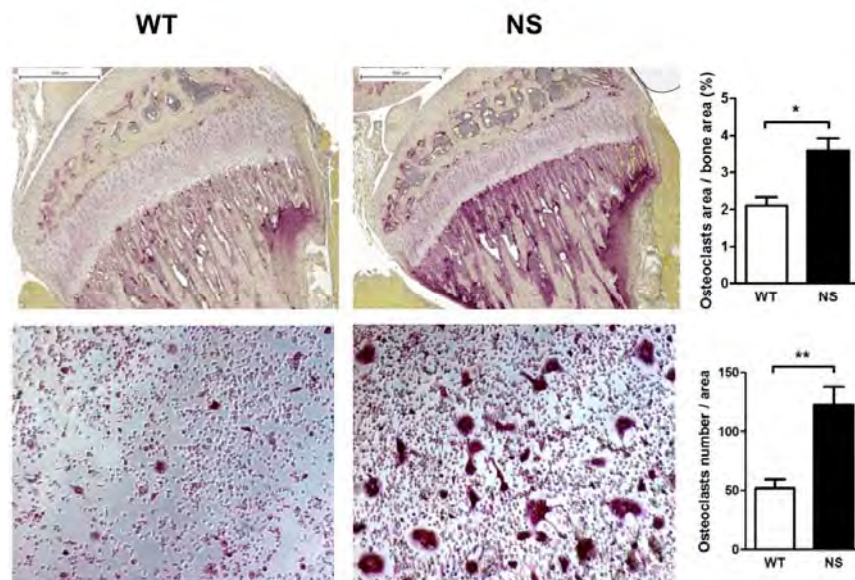


Figure 324 : Ostéoclastogénèse accrue dans le SN

Coloration au TRAP, un marquage spécifique des osteoclastes matures, sur coupe histologique d'os de souris WT et SN (en haut). Des cellules de moelle osseuse de souris WT et NS ont été mises en culture en dans un milieu ostéoclastogénique, (M-CSF + RANKL) puis un marquage TRAP a été réalisé (en bas).

A l'inverse du SN, dans la Métachondromatose, l'inactivation de SHP2 pourrait induire un défaut de différenciation de progéniteurs myéloïdes en ostéoclastes ou une diminution de l'activité de ceux-ci, et pourrait être la cause des enchondromes.

e. Les maladies auto-immunes

Nous avons vu précédemment que le SN est associé à plusieurs maladies auto-immunes, en particulier avec le Lupus Érythémateux Systémique (LES). Or il a été montré que le fait d'inhiber SHP2 diminue l'inflammation et améliore le pronostic d'un modèle murin de la maladie (Wang et al., 2016). Étant donné le lien que nous montrons ici entre SHP2 et inflammation, il serait possible d'imaginer que certaines mutations hyperactivatrices de SHP2 associées au SN puisse déclencher ou au moins intervenir dans la pathogénèse du LES.

f. Les LMMJ

Les LMMJ sont des leucémies retrouvées en plus grande proportion dans le SN que dans la population générale. L'hyperactivation de SHP2 dans les monocytes/macrophages ou leurs progéniteurs pourrait participer à l'apparition de cette pathologie. En effet, il est bien connu que des mutations hyperactivatrices de SHP2 dans les progéniteurs myéloïdes mais aussi dans le microenvironnement des cellules de la moelle osseuse augmente fortement le taux d'apparition de ce type de leucémie (Dong et al., 2016). Ainsi, l'hyperactivation de SHP2 associée au SN pourrait augmenter l'activité et la prolifération des progéniteurs myéloïdes (soit par un effet direct sur le progéniteur lui-même ou via l'effet sur le microenvironnement). Il serait donc intéressant d'identifier s'il existe une sous-population particulière de monocytes, ou si une étape spécifique du lignage myéloïde est altérée. Enfin, une étude comparative des profils d'expression dans différentes populations monocytaires/macrophagiques (foie, moelle osseuse...) pourrait permettre d'identifier une dysfonction commune.

Ainsi l'ensemble de ce travail a permis de documenter un nouveau phénotype métabolique associé à l'hyperactivation de SHP2, en particulier un lien direct entre SHP2 et insulino-résistance mettant en jeu une dysfonction macrophagique. Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur la physiopathologie du SN et des syndromes apparentés, mettant en lumière des anomalies métaboliques dont l'origine et les conséquences pourraient dépasser le cadre strict du métabolisme. Au-delà des maladies rares, ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes concernant les mécanismes à l'origine de l'insulino-résistance, avec de possibles retombées dans le développement de thérapeutiques anti-diabétiques.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1

USE OF SHP2 INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF INSULIN RESISTANCE

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention relates to use of SHP2 inhibitors for the treatment of insulin resistance.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Despite reaching an epidemic status worldwide, metabolic disorders, notably diabetes, still miss efficient and specific therapeutic strategies because of their multifactorial origin. Resistance of peripheral tissues (liver, muscle, adipose tissue) to insulin action is a key event in diabetes onset, so that therapeutic strategies aiming at restoring insulin sensitivity are highly relevant. However, they essentially remain unsatisfactory. For instance, thiazolidinediones, by binding peroxisome proliferator activated receptor gamma, increase insulin sensitivity, but such treatments are associated to important side effects. There is therefore still an important need to understand insulin resistance-promoting mechanisms to identify therapeutic targets.

SHP2 is a ubiquitous tyrosine phosphatase that regulates major signalling pathways (e.g. MAPK, PI3K) in response to many growth factors, thereby having key functions during development, so that its dysregulation has been linked to developmental disorders as well as cancers (*Tajan, M., de Rocca Serra, A., Valet, P., Edouard, T., and Yart, A. (2015). SHP2 sails from physiology to pathology. European journal of medical genetics 58, 509-525.*). SHP2 also plays major roles in metabolism regulation, as evidenced by the severe phenotype of its targeted invalidation in various tissues and organs, however the global metabolic role of SHP2, and the contribution of its deregulation to metabolic diseases, have never been ascertained (*Tajan, M., de Rocca Serra, A., Valet, P., Edouard, T., and Yart, A. (2015). SHP2 sails from physiology to pathology. European journal of medical genetics 58, 509-525.*). Several SHP2 inhibitors have been described in the prior art (e.g. *WO2010121212 and WO2015003094*) but

their use in the treatment of insulin resistance has never been described. In contrast, the concept of using strategies aiming at activating SHP2 to alleviate obesity and or diabetes has been proposed, based on the identification of a primary function of SHP2 in postmitotic forebrain neurons is the control of energy balance and metabolism (*Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, Feng GS. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 9;101(45):16064-9*). Moreover, mice with a neuron-specific, conditional Shp2 deletion, developed obesity and diabetes and the associated pathophysiological complications that resemble those encountered in humans, including hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, insulin and leptin resistance, vasculitis, diabetic nephropathy, urinary bladder infections, prostatitis, gastric paresis, and impaired spermatogenesis (*Krajewska M1, Banares S, Zhang EE, Huang X, Scadeng M, Jhala US, Feng GS, Krajewski S Development of diabetes in mice with neuronal deletion of Shp2 tyrosine phosphatase. Am J Pathol. 2008 May;172(5):1312-24.*).

SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention relates to use of SHP2 inhibitors for the treatment of insulin resistance. In particular, the present invention is defined by the claims.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The first object of the present invention relates to a method of treating insulin resistance in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a SHP2 inhibitor.

As used herein, the term "subject" refers to a human or another mammal (e.g., primate, dog, cat, goat, horse, pig, mouse, rat, rabbit, and the like), that can be afflicted with insulin resistance. In a particular embodiment of the present invention, the subject is a human being. In such embodiments, the subject is often referred to as an "individual". The term "individual" does not denote a particular age, and thus encompasses children, teenagers, and adults.

As used herein, the term "insulin resistance" has its common meaning in the art. Insulin resistance is a physiological condition where the natural hormone insulin becomes less effective at lowering blood sugars. The resulting increase in blood glucose may raise levels outside the normal range and cause adverse health effects such as metabolic syndrome, dyslipidemia and subsequently type 2 diabetes mellitus. The method of the present invention

is thus particularly suitable for the treatment of type 2 diabetes. As used herein, the term "type 2 diabetes" or "non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM)" has its general meaning in the art. Type 2 diabetes often occurs when levels of insulin are normal or even elevated and appears to result from the inability of tissues to respond appropriately to insulin. Most of the type 2 diabetics are obese.

In some embodiments, the subject suffers from obesity. As used herein the term "obesity" refers to a condition characterized by an excess of body fat. The operational definition of obesity is based on the Body Mass Index (BMI), which is calculated as body weight per height in meter squared (kg/m^2). Obesity refers to a condition whereby an otherwise healthy subject has a BMI greater than or equal to $30 \text{ kg}/\text{m}^2$, or a condition whereby a subject with at least one co-morbidity has a BMI greater than or equal to $27 \text{ kg}/\text{m}^2$. An "obese subject" is an otherwise healthy subject with a BMI greater than or equal to $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ or a subject with at least one co-morbidity with a BMI greater than or equal $27 \text{ kg}/\text{m}^2$. A "subject at risk of obesity" is an otherwise healthy subject with a BMI of $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ to less than $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ or a subject with at least one co-morbidity with a BMI of $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ to less than $27 \text{ kg}/\text{m}^2$. The increased risks associated with obesity may occur at a lower BMI in people of Asian descent. In Asian and Asian-Pacific countries, including Japan, "obesity" refers to a condition whereby a subject with at least one obesity-induced or obesity-related co-morbidity that requires weight reduction or that would be improved by weight reduction, has a BMI greater than or equal to $25 \text{ kg}/\text{m}^2$. An "obese subject" in these countries refers to a subject with at least one obesity-induced or obesity-related co-morbidity that requires weight reduction or that would be improved by weight reduction, with a BMI greater than or equal to $25 \text{ kg}/\text{m}^2$. In these countries, a "subject at risk of obesity" is a person with a BMI of greater than $23 \text{ kg}/\text{m}^2$ to less than $25 \text{ kg}/\text{m}^2$.

As used herein, the term "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of subject at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as subjects who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that

expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]). In particular, the method of the present invention is particularly suitable for improving blood glucose control, enhancing insulin signalling in skeletal muscle and adipose tissue, reducing lipotoxicity in skeletal muscle and adipose tissue, increasing lipid oxidative capacity in skeletal muscle and adipose tissue, or maintaining long-term insulin sensitivity in the subject.

As used herein, the term "SHP2" has its general meaning in the art and refers to the protein encoded by the *PTPN11* gene. SHP2 is a non-receptor protein tyrosine phosphatase (PTP) with two Src homology- 2 (SH2) domains (N-SH2, C-SH2) (Alonso et. al., 2004; Neel et al., 2003). SHP2 is also known as Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (PTPN11).

As used herein, a "SHP2 inhibitor" refers to any compound natural or not which is capable of inhibiting the activity of SHP2, in particular SHP2 phosphatase activity. SHP2 inhibitors are well known in the art. The term encompasses any SHP2 inhibitor that is currently known in the art or that will be identified in the future. The term also encompasses inhibitor of expression. In some embodiments, the SHP2 inhibitor is selective over the other phosphatases including

SHP1. By “selective” it is meant that the inhibition of the selected compound is at least 10-fold, preferably 25-fold, more preferably 100-fold, and still preferably 300-fold higher than the inhibition of the other phosphatases. Typical assays are also described in WO2010121212 and WO2015003094. Typically, the SHP2 inhibitor is a small organic molecule.

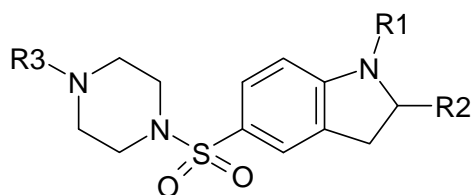
Non-limiting examples of SHP2 inhibitors include NSC-87877 (also known as 8-Hydroxy-7-[(6-sulfo-2-naphthyl)azo]-5-quinolinesulfonic acid), estradiol phosphate, estramustine phosphate, PHS1, NSC-117199, SP1-112, SP1-112Me (see Chen, L. et al., 2006 and Chen, L. et al., 2010), tautomycetin analogs (e.g., see Liu, S. et al., 2011), phenylhydrazonopyrazolone sulfate and compounds described in Hellmuth, K. et al., 2008, compounds described in United States Patent Application Publication No. 20120034186 (U.S. Ser. No. 13/274,699) and compounds described in Yu, Z. H. et al. 2011.

In some embodiments, the SHP2 inhibitor for use according to the present invention is selected from compounds described in WO2010121212, WO2015003094, WO2017100279, and WO2007117699.

In some embodiments, the SHP2 inhibitor for use according to the present invention is 4,4'-(4'-Carboxy)-4-nonyloxy-[1,1'-biphenyl]-3,5-diyl)dibutanoic acid.

In some embodiments, the SHP2 inhibitor for use according to the present invention is SHP099: 6-(4-amino-4-methylpiperidin-1-yl)-3-(2,3-dichlorophenyl)pyrazin-2-amine (Garcia Fortanet J, Chen CH, Chen YN, Chen Z, Deng Z, Firestone B, Fekkes P, Fodor M, Fortin PD, Fridrich C, Grunenfelder D, Ho S, Kang ZB, Karki R, Kato M, Keen N, LaBonte LR, Larrow J, Lenoir F, Liu G, Liu S, Lombardo F, Majumdar D, Meyer MJ, Palermo M, Perez L, Pu M, Ramsey T, Sellers WR, Shultz MD, Stams T, Towler C, Wang P, Williams SL, Zhang JH, LaMarche MJ. Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *J Med Chem.* 2016 Sep 8;59(17):7773-82).

In some embodiments, the SHP2 inhibitor for use according to the present invention is a compound having a formula (I);



- wherein R₁ is selected from the group consisting of carboalkoxy, benzylcarboxamide, straight chained, branched or cyclic alkyl, CO(CH₂)₂CO₂H, COCH₂CH(OH)CO₂H, CO(CH)₂CO₂H, CONH(C₆H₄)Cl, CONH(C₆H₄)CH(CH₃)₂, CONH(C₆H₄)(Cl)₂, CO(CH₂)₃CO₂H, CO(C₆H₄)OCH₃, CO(C₅H₈), CO(C₆H₄)Cl, CONHCH₂CO₂H, COCH₂CH(CH₃)₂, CONHCH(CHCH₃CH₂CH₃)(CO₂H), CONH(C₆H₄)OCH₃, CO(C₆H₃)(Cl)₂, COCH₂(C₆H₄)Cl, CO(CH₂)₂CO₂H, CONH(C₆H₄)F, CONHCH(CH₃)CO₂H, CO(C₃H₅), CON HCH(CH₂CHCH₃CH₃)(CO₂CH₂CH₃), CO(C₆H₅), CONHCH(CHCH₃CH₃)(CO₂H), COCH₂CH(OH)(CO₂⁻) -Na⁺, CONHCH(CH₃)(CO₂CH₂CH₃), CONH(C₆H₄)CF₃, COCO₂H, CO(CH₂)₂CH₃, CONH(CH₂)₂CO₂H, CONHCH(CHCH₃CH₃)(CO₂CH₂CH₃), CONHCH(CH₂CHCH₃CH₃)(CO₂H), CONH(C₆H₅), CONH(CH₂)₂CO₂CH₂CH₃, CONHCH(CH₂C₆H₅)(CO₂CH₂CH₃), CONHCH(CHCH₃CH₂CH₃)(CO₂CH₃), CONH(C₆H₄)CO₂H, CO(C₆H₈)CO₂H, CONHCH(CH₂C₆H₅)(CO₂H), CONH(C₆H₄)CO₂CH₃, COCH₂OCH₃, COCH₂(C₆H₅), COCF₃, CONHCH(CH₂CH₂CO₂H)(CO₂H), and CON HCH₂CO₂CH₂CH₃;
- wherein R₂ is selected from the group consisting of H, and CH₃; and wherein R₃ is selected from the group consisting of (C₆H₄)Cl, (C₆H₄)CO₂H, (C₆H₄)CH₃, (C₆H₄)(Cl)₂, (C₆H₄)(CF₃)₂,

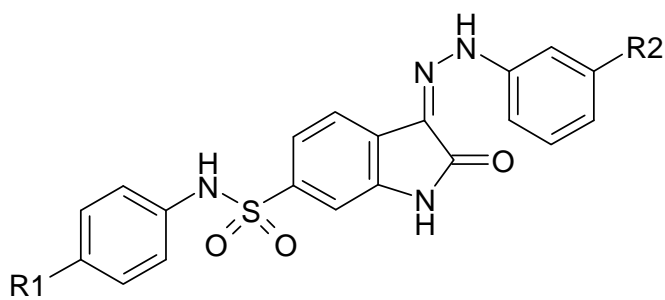
(C₆H₄)OCH₃, (C₆H₄)F, (C₆H₃)(Cl)(CH₃), and C₆H₅.

In some embodiments, R₁ is selected from the group consisting of COCH₂CH₂COOH and COCH₂CH(OH)CO₂H.

In some embodiments R₁ is selected from the group consisting of CO(CH)₂CO₂H, CONH(C₆H₄)CH(CH₃)₂, CO(CH₂)₃CO₂H, CONHCH₂CO₂H, CO(CH₂)₂CO₂H, CONHCH(CHCH₃CH₃)(CO₂H), COCO₂H, CONH(CH₂)₂CO₂H, and CONHCH(CH₂CHCH₃CH₃)(CO₂H).

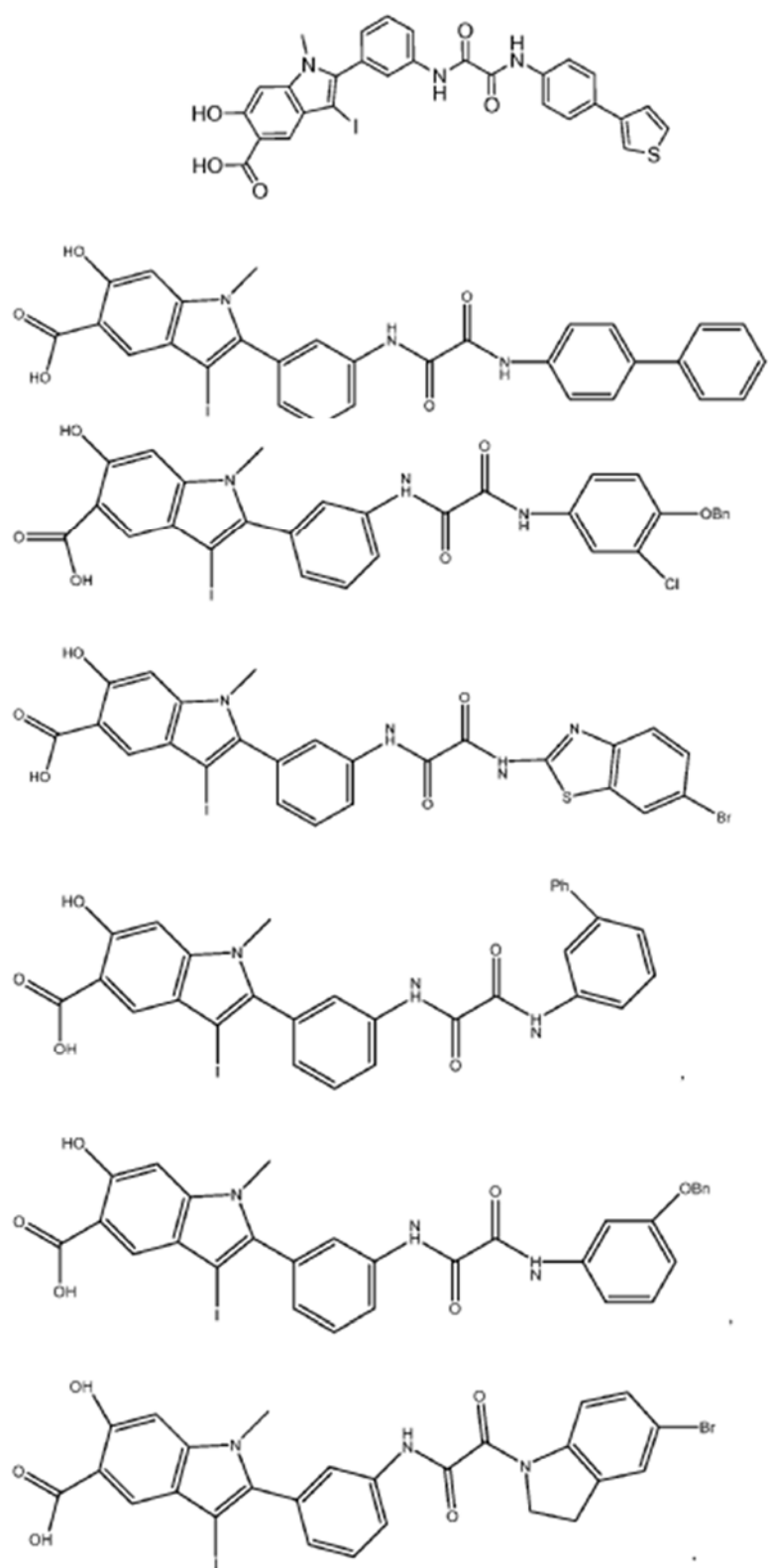
In some embodiments, R₁ is CO(CH₂)₂CO₂H, R₂ is H, and R₃ is (C₆H₄)Cl.

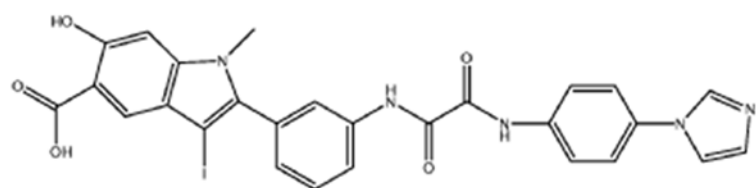
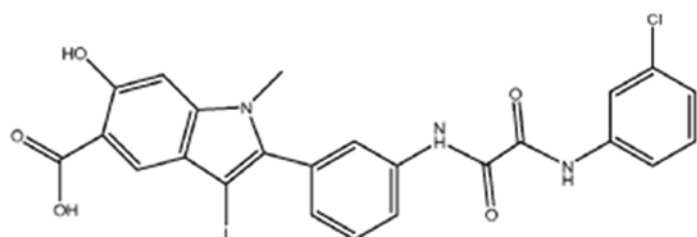
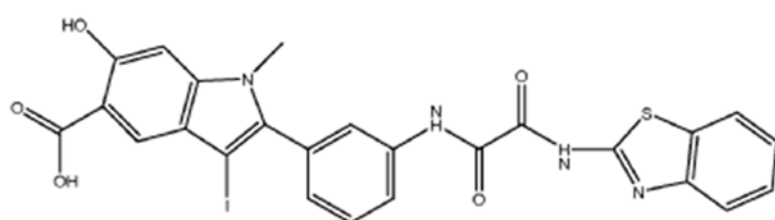
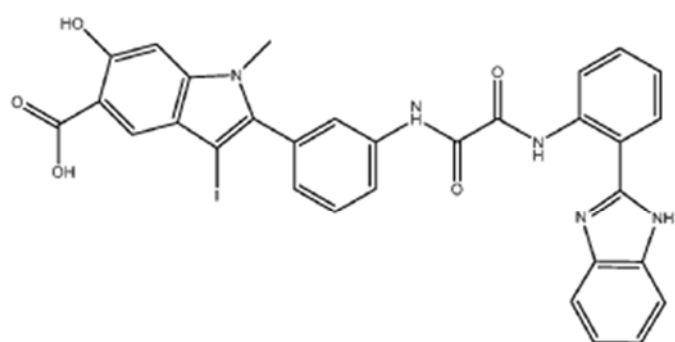
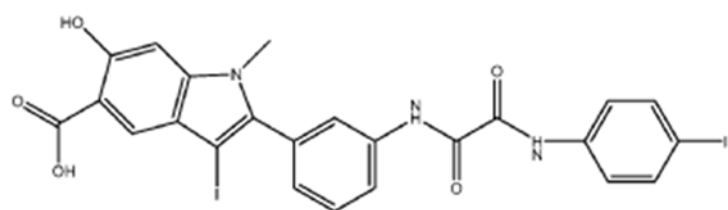
In some embodiments, the SHP2 inhibitor for use according to the present invention is a compound having a formula (IV):

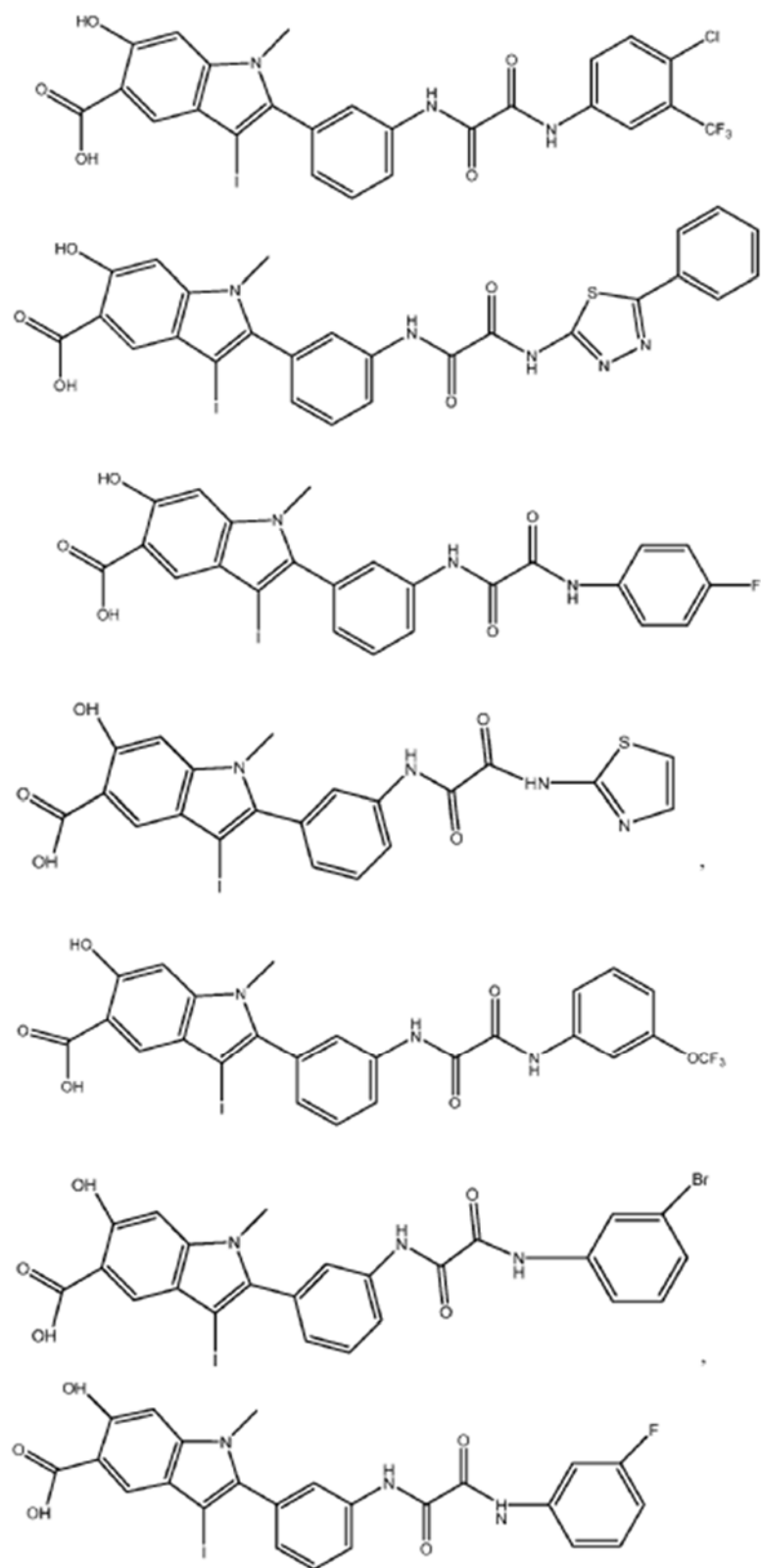


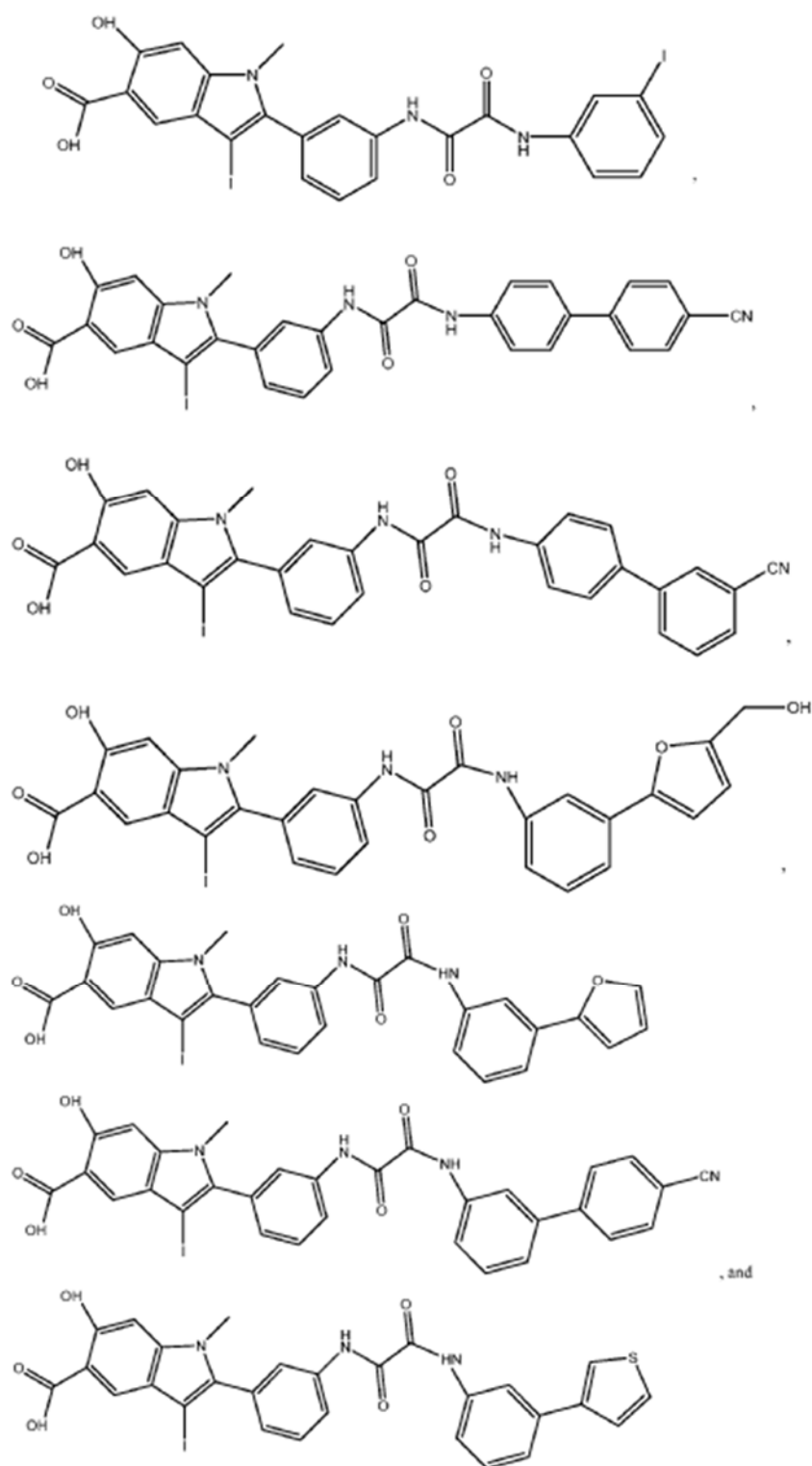
wherein R_1 is selected from the group consisting of F; and wherein R_2 is selected from the group consisting of COOCH_3 , and $\text{CO}_2^- \text{N}^+\text{H}_2(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$.

In some embodiments, the SHP2 inhibitor for use according to the present invention is selected from the group consisting of:









In some embodiments, the SHP2 inhibitor is an inhibitor of SHP2 expression. An “inhibitor of expression” refers to a natural or synthetic compound that has a biological effect to inhibit the expression of a gene. In a preferred embodiment of the invention, said inhibitor of gene expression is a siRNA, an antisense oligonucleotide or a ribozyme. For example, anti-sense oligonucleotides, including anti-sense RNA molecules and anti-sense DNA molecules, would

act to directly block the translation of SHP2 mRNA by binding thereto and thus preventing protein translation or increasing mRNA degradation, thus decreasing the level of SHP2, and thus activity, in a cell. For example, antisense oligonucleotides of at least about 15 bases and complementary to unique regions of the mRNA transcript sequence encoding SHP2 can be synthesized, e.g., by conventional phosphodiester techniques. Methods for using antisense techniques for specifically inhibiting gene expression of genes whose sequence is known are well known in the art (e.g. see U.S. Pat. Nos. 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; and 5,981,732). Small inhibitory RNAs (siRNAs) can also function as inhibitors of expression for use in the present invention. SHP2 gene expression can be reduced by contacting a subject or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a small double stranded RNA, such that SHP2 gene expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Antisense oligonucleotides, siRNAs, shRNAs and ribozymes of the invention may be delivered in vivo alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid to the cells and typically cells expressing SHP2. Typically, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, plasmids, phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: retrovirus, such as moloney murine leukemia virus, harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rous sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus; and RNA virus such as a retrovirus/lentivirus. One can readily employ other vectors not named but known to the art.

According to the invention, the SHP2 inhibitor is administered to the subject in a therapeutically effective amount. By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the active ingredient for treating or reducing the symptoms at reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily

usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination with the active ingredients; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, typically from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

Typically the active ingredient of the present invention (e.g. SHP2 inhibitor) is combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form pharmaceutical compositions. The term "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various

antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. In the pharmaceutical compositions of the present invention, the active ingredients of the invention can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1 shows that obese diabetic mice treated by gavage with a SHP2 inhibitor (50mg / kg / day) have significant improvement in the glucose tolerance.

EXAMPLE:

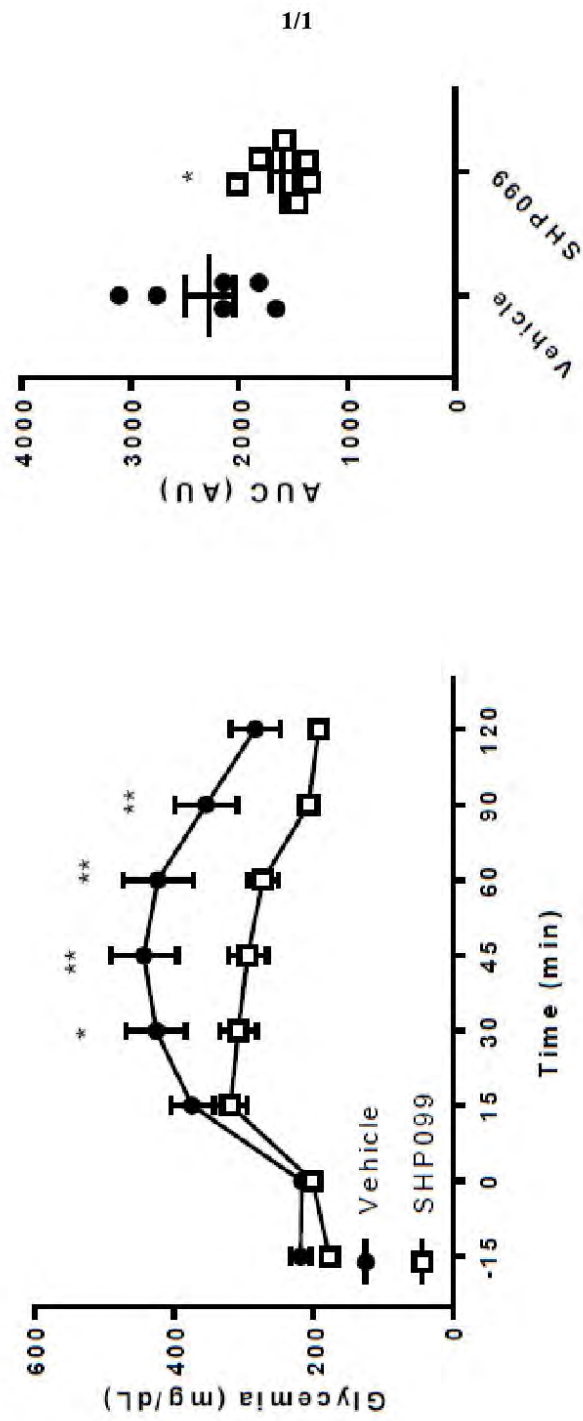


Figure 1

Several specific inhibitors of SHP2 have been developed, particularly in the field of anti-cancer therapies. One of the compound is SHP099 (6-(4-amino-4-methylpiperidin-1-yl)-3-(2,3-dichlorophenyl)pyrazin-2-amine) that has recently been shown to be being highly specific, with good tolerance and oral bioavailability (*Garcia Fortanet J, Chen CH, Chen YN, Chen Z, Deng Z, Firestone B, Fekkes P, Fodor M, Fortin PD, Fridrich C, Grunenfelder D, Ho S, Kang ZB, Karki R, Kato M, Keen N, LaBonte LR, Larrow J, Lenoir F, Liu G, Liu S, Lombardo F, Majumdar D, Meyer MJ, Palermo M, Perez L, Pu M, Ramsey T, Sellers WR, Shultz MD, Stams T, Towler C, Wang P, Williams SL, Zhang JH, LaMarche MJ. Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. J Med Chem. 2016 Sep 8;59(17):7773-82*). Very recent studies have also demonstrated its effectiveness in treatment of renal fibrosis induced by carbon tetrachloride (*Kostallari et al., 2018*) and in preventing adaptive resistance to MEK inhibitors in multiple cancer models (*Fedele et al., 2018*).

We therefore, evaluate whether chronic inhibition of SHP2 improves insulin sensitivity in animal models. Obese diabetic mice were treated by gavage (50 mg / kg / day). After 15 days of treatment an OGTT was performed (Figure 1). We note a significant improvement in the glucose tolerance of the treated animals compared to their control, with a decreased fasting blood glucose, without any change in weight or body composition.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

CLAIMS:

1. A method of treating insulin resistance in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a SHP2 inhibitor.
2. The method of claim 1 wherein the subject suffers from type 2 diabetes.
3. The method of claim 1 wherein the subject suffers from obesity.
4. The method of claim 1 wherein the SHP2 inhibitor is a small organic molecule.
5. The method of claim 1 wherein the SHP2 inhibitor is SHP099 (6-(4-amino-4-methylpiperidin-1-yl)-3-(2,3-dichlorophenyl)pyrazin-2-amine).
6. The method of claim 1 wherein the SHP2 inhibitor is an inhibitor of SHP2 expression.
7. The method of claim 6 wherein the inhibitor of gene expression is a siRNA, an antisense oligonucleotide or a ribozyme.

ABSTRACT OF THE INVENTION

USE OF SHP2 INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF INSULIN RESISTANCE

Despite reaching an epidemic status worldwide, metabolic disorders, notably diabetes, still miss efficient and specific therapeutic strategies because of their multifactorial origin. SHP2 is a ubiquitous tyrosine phosphatase that regulates major signalling pathways (e.g. MAPK, PI3K) in response to many growth factors. The inventors evaluate whether chronic inhibition of SHP2 could improve insulin sensitivity in animal models. Obese diabetic mice were thus treated by gavage (50 mg / kg / day) with a SHP2 inhibitor and the inventors note a significant improvement in the glucose tolerance of the treated animals compared to their control, with a decreased fasting blood glucose, without any change in weight or body composition. Accordingly, the present invention relates to use of SHP2 inhibitors for the treatment of insulin resistance.

The RASopathy Family: Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway

My lene Tajan,^{1*} Romain Paccoud,^{1*} Sophie Branka,¹ Thomas Edouard,² and Armelle Yart¹

¹INSERM UMR 1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (I2MC), University of Toulouse Paul Sabatier, Toulouse, France; and ²Endocrine, Bone Diseases, and Genetics Unit, Children's Hospital, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

ABSTRACT Noonan syndrome [NS; Mendelian Inheritance in Men (MIM)   163950] and related syndromes [Noonan syndrome with multiple lentiginos (formerly called LEOPARD syndrome; MIM   151100), Noonan-like syndrome with loose anagen hair (MIM   607721), Costello syndrome (MIM   218040), cardio-facio-cutaneous syndrome (MIM   115150), type I neurofibromatosis (MIM   162200), and Legius syndrome (MIM   611431)] are a group of related genetic disorders associated with distinctive facial features, cardiopathies, growth and skeletal abnormalities, developmental delay/mental retardation, and tumor predisposition. NS was clinically described more than 50 years ago, and disease genes have been identified throughout the last 3 decades, providing a molecular basis to better understand their physiopathology and identify targets for therapeutic strategies. Most of these genes encode proteins belonging to or regulating the so-called RAS/MAPK signaling pathway, so these syndromes have been gathered under the name RASopathies. In this review, we provide a clinical overview of RASopathies and an update on their genetics. We then focus on the functional and pathophysiological effects of RASopathy-causing mutations and discuss therapeutic perspectives and future directions. (*Endocrine Reviews* 39: 1 – 25, 2018)

Clinical Presentation of RASopathies

With a cumulative incidence of about 1 per 1000 live births, RASopathies represent one of the largest groups of developmental disorders. In addition to characteristic congenital features, various homeostatic defects in RASopathies have been documented in recent studies. In this section, we describe the phenotypic spectrum of RASopathies, taking Noonan syndrome (NS) as the prototype, then focus on specific traits that distinguish the other syndromes.

NS as a prototype

First described by the pediatric cardiologist Jacqueline Noonan 50 years ago, NS is among the most common genetic disorders, with an estimated prevalence between 1 per 2000 and 1 per 2500 live births (1). NS is an autosomal-dominant genetic disease characterized by a distinctive phenotypic triad: facial dysmorphic features, cardiopathies, and growth retardation, to which many other developmental defects can be added, including mild to moderate developmental

delay/learning disabilities, skeletal abnormalities, cryptorchidism in males, predisposition to myeloproliferative disorders, and endocrine/metabolic imbalance. Both heterogeneity among patients with NS and redundancy with other RASopathies can make early diagnosis with certainty difficult (2, 3).

Patients with NS have *distinctive facial features* (i.e., hypertelorism, ptosis, downslanting palpebral fissures, low-set posteriorly rotated ears, and short/webbed neck) that are most striking from the newborn period until middle childhood and become less prominent in adulthood (4).

Eighty percent of patients with NS display *congenital heart defects*, ranking it as the second-most common syndromic cause of congenital cardiopathies after trisomy 21. The most frequent heart defects are pulmonary valve stenosis (PVS; 60%) and hypertrophic cardiomyopathy (HCM; 20%), but many other anomalies, such as septal or valve defects, aortic coarctation and, persistently patent arterial duct, are found (5). Fatal heart failure/sudden death during the first year of life is a concern in up to one-fourth of patients with HCM (6). The high prevalence and

ISSN Print: 0163-769X
ISSN Online: 1945-7189
Printed in USA
Copyright   2018
Endocrine Society
Received: 24 October 2017
Accepted: 13 June 2018
First Published Online:
2018

features, in particular a high prevalence of hearing deficits (20%) and multiple pigmented skin lesions called lentiginos, mostly starting at school age (90%) and explaining the disrespectful naming of the disease (32). In contrast with the higher prevalence of PVS in patients with NS, the vast majority of patients with NS-ML (80%) display HCM, which can develop during childhood (32–34). The high risk of heart failure or sudden death requires cardiologic follow-up (33, 35–37). Growth retardation seems to be milder than in NS, affecting only ~30% of patients with NS-ML (12, 32, 38, 39) (Table 1). Analyses of a small cohort of patients with NS-ML reported lower-than-average body mass index, with reduced adiposity for the few patients tested (40). Neurosensory deafness seems to be more prominent in NS-ML than in NS.

Noonan-like syndrome with loose anagen hair (NS-LAH), also known as Mazzanti syndrome, is phenotypically close to NS, but patients display distinctive hyperactive behavior and pathognomonic hair anomalies. The incidence of specific cardiac defects, notably mitral valve and septal defects, is higher with NS-LAH than with NS (41).

Cardio-facio-cutaneous syndrome (CFCS) shares the major clinical features of NS (e.g., heart defects, short stature, and facial features) but differs from NS mainly in the high frequency of ectodermal anomalies (i.e., thin, curly, friable hair and hyperkeratotic skin changes) and constant mental retardation (42).

In patients who have *Costello syndrome (CS)*, facial features are coarser than in patients with other RASopathies. They also have skin abnormalities such as soft and loose skin with deep palmar and plantar creases and sparse curly hair. A distinctive and common feature associated with CS is the presence of benign cutaneous papillomas in the perinasal or/and perianal region. Congenital heart defects are frequent, most commonly HCM and arrhythmias. Similar to patients with CFCS, most patients with CS display severe mental retardation (42). Finally, CS has the highest cancer risk among RASopathies, with a cumulative incidence of tumors of 15%, including rhabdomyosarcoma and, less frequently, neuroblastoma and bladder carcinoma (29). This tumor predisposition justifies systematic tumor screening. Recently, increased energy expenditure (EE) has been described in patients with CS, which has been proposed as a cause of growth failure (43).

With an incidence of 1 per 3000 live births, *type 1 neurofibromatosis (NF1)* is the second-most frequent RASopathy, whereas *Legius syndrome (LS)* is a rare condition. These conditions show only partial overlap with NS, with rarer cardiac manifestations and facial features being found in only a subgroup of patients, referred to as neurofibromatosis–Noonan syndrome. These diseases share distinctive features, including multiple café-au-lait spots and freckling, bone malformations, and mild learning disabilities. In addition,

NF1 is characterized by the presence of benign tumors (neurofibromas, optic pathway gliomas, and Lisch nodules) (44, 45).

Genetics of RASopathies

To date, RASopathies have been associated with mutations in ~20 genes. Most, if not all, genes encode proteins belonging to or regulating the so-called RAS/MAPK signaling pathway, providing a genetic foundation for their diagnosis and an explanation for their pathophysiologies. However, genetic heterogeneity for a given syndrome on one side and allelism for several syndromes on the other side make classification harder. In this article, we describe the RAS/MAPK pathway and its pleiotropic roles during development and in homeostasis maintenance; we then summarize the different causal genes and mutations involved in RASopathies and their interconnections and provide some genotype/phenotype correlations.

The RAS/MAPK pathway

The RAS/MAPK cascade is a ubiquitous signaling pathway activated in response to a wide range of extracellular stimuli (e.g., growth factors, hormones, cell/cell interaction) to modulate various cellular processes (e.g., proliferation, survival, differentiation, migration, or metabolism), thereby adapting cell fate to modification of its environment (Fig. 1). Although this signaling pathway is often summarized as a well-established, straightforward cascade, reality goes far beyond this scholastic view, with many remaining gray areas and multiple levels of regulation, including transcriptional control, posttranslational modifications, protein/protein and protein/lipid interactions, subcellular compartmentalization, and crosstalk with other signaling pathways. In this section, we limit our comments to the components that are relevant to the RASopathies, while referring the readers to more comprehensive reviews for detailed information (46, 47).

A central node in this pathway is the small guanosine triphosphatase RAS proteins, which switch from a guanosine diphosphate-bound inactive state to a guanosine triphosphate (GTP)-bound active state. RAS-GTP activates several effectors, most notably phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phospholipase C, RAL guanine nucleotide exchange factor, novel Ras effector 1/Ras association domain family member 5, and the RAF kinases. RAS activation is a complex, tightly regulated mechanism for which a canonical, albeit nonexclusive, model can be given in the case of tyrosine kinase receptors (e.g., epidermal growth factor or insulin receptors). Ligand binding to its cognate receptor triggers receptor dimerization and autophosphorylation on several tyrosine residues, creating binding sites for adaptor proteins such as GRB2 or

Table 1. Clinical Features and Genetics of RASopathies

Disease	Epidemiology	Major Symptoms	Disease Gene
Noonan syndrome (NS)	1/2000	Dysmorphism	<i>PTPN11</i> (50%), <i>SOS1</i> (10%), <i>RAF1</i> (10%), <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>SHOC2</i> , <i>CBL</i> , <i>BRAF</i> , <i>SOS2</i> , <i>RIT</i> , <i>RRAS</i> , <i>RASA2</i> , <i>SPRY1</i> , <i>LZTR1</i> , <i>MAP3K8</i> , <i>MYST4</i> , <i>A2ML1</i>
MIM #163950	Autosomal dominant <i>de novo</i> (60%) or familial	Congenital cardiac defects (PVS 60% , HCM 20%) Skeletal abnormalities, short stature, low BMI Delayed puberty, hypogonadism, cryptorchidism Developmental delay/learning disability Bleeding defects (easy bruising) Cancer risk, JMML	Unknown: 20%–30%
Noonan syndrome with multiple lentigines (NS-ML, formerly LEOPARD syndrome) MIM #151100	1/100,000 Autosomal dominant	Dysmorphism HCM 80% Moderate short stature (50%) Skeletal abnormalities Mild intellectual disability (30%) Multiple lentigines Deafness (20%)	<i>PTPN11</i> (90%), <i>RAF1</i> (5%), <i>BRAF</i> Unknown: 5%
Noonan syndrome–like disorder with loose anagen hair (NS-LAH) MIM #607721	≈100 reported cases Autosomal dominant	Dysmorphism Cardiac defects (mitral valve, septal defects) Short stature Hyperactive behavior Loose anagen hair	<i>SHOC2</i> , <i>PPP1CB</i>
Costello syndrome (CS) MIM #218040	1/400,000 Autosomal dominant	Coarse facial features Congenital cardiac defects (HCM, arrhythmia) Failure to thrive, short stature Cutaneous defects (deep palmar and plantar creases) Papillomas Mental retardation Malignant risk (15%)	<i>HRAS</i>
Cranio-facio-cutaneous syndrome (CFCS)	1/200,000	Dysmorphism	<i>BRAF</i> (60%), <i>MEK1</i> (10%), <i>MEK2</i> (10%), <i>KRAS</i>

(Continued)

Table 1. Continued

Disease	Epidemiology	Major Symptoms	Disease Gene
MIM #115150	Autosomal dominant	Congenital cardiac defects (PVS, HCM, arrhythmia) Short stature Ectodermal abnormalities Mental retardation	Unknown: 15%
Type 1 neurofibromatosis (NF1), also named von Recklinghausen disease	1/3000	Rarer congenital cardiopathies	NF1 (>90%)
MIM #162200	Autosomal dominant Familial or <i>de novo</i>	Multiple café au lait spots and freckling Neurofibromas/benign tumors Iris Lisch nodules Mild learning disabilities	
Legius syndrome (LS)	≈200 reported cases	Multiple café au lait spots without neurofibromas	SPRED1 (>90%)
MIM #611431	Autosomal dominant	Mild learning disabilities	

Major clinical traits for the different syndromes are listed (nonexhaustively), with distinctive symptoms in bold. For disease genes, mutation frequency is given for the most common mutations. The percentage of unknown genes corresponds to the number of patients with a firm diagnosis and negative genetic testing for all known disease genes. Abbreviations: BMI, body mass index; LEOPARD, lentiginos, ECG conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, and sensorineural deafness; MIM, Mendelian Inheritance in Man.

GAB1. This allows recruitment of SOS, the RAS GTPase exchange factor, to the plasma membrane, which converts RAS to its active state. In addition to SOS, the tyrosine phosphatase SHP2 participates in RAS activation by dephosphorylating several inhibitory phosphotyrosines on docking proteins or on RAS itself (48–50). At the other side of the equation, GTPase-activating proteins (GAPs), such as NF1 and RASA1/p120RASGAP, catalyze GTPase activity of RAS to trigger its return to the inactive state, which can be further reinforced by additional inhibitory events, including receptor ubiquitination by the E3 ubiquitin ligase CBL or sequestration of activating proteins by SPROUTY proteins (51–55). However, such a view is only the tip of the iceberg of RAS regulation, which remains largely unknown given (1) the tremendous number of simultaneous or mutually exclusive interactions among RAS, its effectors, and its regulators; (2) the spatiotemporal and dynamic control of those interactions and of enzymatic activities; and (3) the specific context of the plasma membrane environment.

Among the various RAS-GTP effectors, RAF is the first kinase of the so-called MAPK cascade. Its full activation requires the dephosphorylation of an inhibitory residue by the PP1C phosphatase, which is activated by the SHOC2 protein. RAF phosphorylates and activates the MEK kinases, which in turn activates

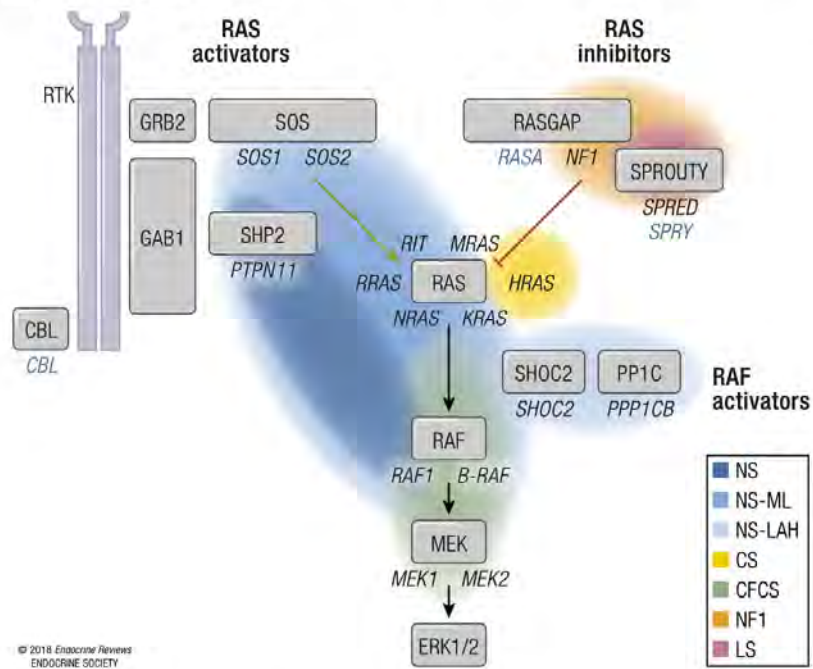
the ERK kinases. Ultimately, activated ERKs phosphorylate different cytoplasmic targets (e.g., MAPK-interacting kinase, a translation regulator) and nuclear targets (e.g., transcription factors, integrator, an RNA polymerase II-associated complex), which initiate appropriate cellular responses to the initial stimulus.

Roles of the RAS/MAPK pathway

Developmental roles

During organismal development, the RAS/MAPK pathway is one of the main pathways to transduce intracellular signals in response to all kinds of mitogens (e.g., growth factors), thereby initiating proliferation, survival, and antiapoptotic programs. Its roles in development are notably highlighted by the profound effect of pharmacological inhibition or genetic invalidation of key actors of this pathway in multiple cell types and animal models. For instance, total invalidation of genes encoding KRAS, SHP2, BRAF, MEK1, or ERK2 result in embryonic lethality as a result of early defects such as abnormal placental or embryonic layer patterning, fetal liver defects, or cardiac anomalies (56–61), and tissue-specific knockouts severely affect the development of the corresponding tissue/organ [for recent reviews, see (54, 62, 63)]. Importantly, dysregulation of RAS/MAPK-dependent

Figure 1. The RAS/MAPK pathway and the RASopathies disease genes. Simplified scheme depicting the canonical RAS/MAPK signaling pathway activated by receptors tyrosine kinase (RTK). Gray rectangles represent proteins (with corresponding genes italicized). Once activated by its ligand, an RTK autophosphorylates on tyrosine residues, creating binding sites for the adaptor protein GRB2 and the relocalization of SOS to the plasma membrane. RAS switches from a GDP-bound to a GTP-bound state, upon which it initiates the RAF>MEK>ERK phosphorylation cascade. RAS intrinsic GTPase activity hydrolyzes GTP to GDP, a reaction that is catalyzed by p120RASGAP. This signaling pathway is modulated at several levels: (1) SHP2 participates in RAS activation by dephosphorylating several inhibitory phosphotyrosines, such as the docking site for p120RASGAP borne by GAB1 and the tyrosine on RAS that mediates its interaction with p120RASGAP; (2) the scaffold protein SHOC2 mediates the activation of the PP1C phosphatase, which dephosphorylates an inhibitory residue on RAF; (3) SPROUTY proteins negatively regulate the RAS/MAPK pathway by sequestering RAS activators; and (4) CBL drives RTK ubiquitination, which turns off activating signals. Colored ovals encompass major disease genes for each RASopathy and reveal functions/phenotype associations: In blue, NS and NS-like syndromes (NS-ML, NS-LAH) are caused mainly by mutations on RAS/RAF activators. In orange/red, NF1 and LS are associated with RAS inhibitors. In yellow and green, mutations responsible for CS and CFCS affect the RAS/MAPK backbone. From a functional point of view, it seems that mutations hitting the low/central part of the signaling pathway give rise to more severe phenotypes. For better readability, some NS-associated genes are not covered by the blue oval but are written in blue, and disease genes unrelated to the RAS/MAPK pathway are not shown. CBL, Casitas B-lineage lymphomas; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GAB1, Grb2 adaptor binder 1; GDP, guanosine diphosphate; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; GTP, guanosine triphosphate; MEK, MAPK/ERK kinase; PP, protein phosphatase; RAF, rapidly accelerated fibrosarcoma; SHOC2, Soc-2 homolog; SOS, son of sevenless.



developmental processes have profound pathophysiological consequences. Indeed, RAS/MAPK pathway hyperactivation following somatic mutations of genes encoding membrane receptors or actors of the RAS/MAPK pathway has been causally linked to a wide range of cancers, so that approaches aimed at inhibition of RAS/MAPK activation are currently under evaluation for anticancer therapies (64). Furthermore, in the next section we show the multiple developmental consequences of germline RASopathy-associated mutations of the RAS/MAPK pathway.

Endocrine and metabolic functions

In addition to evidence of the essential roles of the RAS/MAPK pathway during development, evidence has accumulated for its critical functions in regulating organismal homeostasis, in particular the endocrine and metabolic systems. This homeostatic function of the RAS/MAPK cascade is twofold: On one side, it can mediate the response to many hormones acting through membrane RTK (receptors tyrosine kinase) (e.g., insulin, leptin, GH), and on the other side, it can ensure the proper development of many endocrine

tissues (e.g., hypothalamus, adipose tissue, pancreas) through tight spatiotemporal regulation (65–67).

Regarding hormone responses, RAS/MAPK activation is required for the leptin-evoked activation of pro-opiomelanocortin neurons, thereby inhibiting food intake and increasing EE (68). Indeed, genetic or pharmacological inhibition of SHP2 or ERK2 in the hypothalamus is associated with leptin resistance in mice, resulting in hyperphagy, decreased EE, and obesity (68, 69). Conversely, hypothalamic expression of a hyperactive mutant of SHP2 results in resistance to obesity and improves glucose homeostasis, a phenotype linked to persistent ERK activation (70). Its roles in insulin signaling are more complex. Indeed, ERK1/2-mediated insulin receptor substrate phosphorylation blunts PI3K/AKT signaling in many insulin-sensitive tissues, thereby promoting insulin resistance (71). Consistent with this, *Erk1*^{-/-} and liver-specific *Ptpn11*^{-/-} mice both display increased insulin sensitivity (72–75); in addition, chronic treatment with the MEK inhibitor (PD0325901) improves insulin sensitivity in mice fed a high-fat diet and in ob/ob mice (76). In contrast, components of the RAS/MAPK pathway have been identified as modifiers of insulin sensitivity through regulation of specific transcriptional programs (77), and muscle inactivation of SHP2 results in insulin resistance, which is associated with RAS/MAPK hypoactivation (78). RAS/MAPK is also mobilized downstream from the GH receptor and negatively regulates the production of IGF-1, the mediator of GH in growth control, both *in vitro* and *in vivo* (79).

RAS/MAPK also has pleiotropic roles in the development and function of endocrine and metabolic tissues. For instance, RAS/MAPK signaling participates in the development of the nervous system, affecting the production of and/or the response to neuroendocrine signals (80). Regarding adipose tissue, studies in cellular models and knockout mice revealed an important role for ERK1 and SHP2 in adipogenesis, resulting in both poor lipid management and defective adipokine (e.g., leptin) production (75, 81), whereas treatment with MEK inhibitors suggested a positive role for MAPK in lipolysis (82, 83). SHP2 and ERK1/2 also play a positive role in pancreatic β -cell development and insulin synthesis or secretion (67, 84). In addition, components of the RAS/MAPK pathway are involved in ovarian and testis development and/or function, as disruption of ERK1/2 in ovarian granulosa cells impairs female fertility (85), whereas inactivation of SHP2 in Sertoli cells alters spermatogenesis and reduces FSH and testosterone production (86).

Interestingly, at the crossroad between proliferation and homeostasis, studies in the context of cancer biology have also highlighted a logical role for RAS/MAPK in triggering metabolism rewiring to anabolic programs through various processes,

including the Warburg effect, autophagy, and macropinocytosis (87–92).

Germline mutations in the RAS/MAPK pathway, functional heterogeneity, allelism, and genotype/phenotype correlations

The first identified and major NS disease gene is the protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 (*PTPN11*), encoding SHP2, which is found mutated in 50% to 60% of patients with NS. Genetic screening efforts in patients with non-*PTPN11* NS revealed less common or rare mutations in a dozen genes related to the RAS/MAPK pathway [*SOS1* (10%), *RAF1* (10%), *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *SHOC2*, *CBL*, *RIT*, *RRAS*, *RASA2*, *SOS2*, and *SPRY1*] to which several genes with yet unknown or RAS/MAPK-unrelated function can be added [*MAP3K8*, *MYST4*, *LZTR1*, and *A2ML1*; see (93) for a recent review]. Biallelic mutations in *LZTR1* were recently associated with an autosomal recessive form of NS (94). To date, 20% to 30% of patients with NS still lack a genetic diagnosis (93, 95). NS is thus the most genetically heterogeneous RASopathy, but also the most frequent, which may facilitate the identification of new disease genes and also allows the identification of genotype/phenotype correlations. Thus, when compared with *PTPN11*, *BRAF* mutations are associated with a more severe phenotype and a higher prevalence of HCM (96).

Regarding cardiopathies, patients with *RAF1*, *RIT*, and *MRAS* mutations also develop more HCM (97–100), whereas *MEK1*, *KRAS*, and *SOS1* mutations tend to be highly associated with PVS (101). *SOS1/2* mutations are linked to a higher frequency of ectodermal anomalies and normal stature (12, 102, 103). The prevalence of cognitive/developmental delay is lower for *SOS1/2* mutations but higher for *RAF1*, *BRAF*, and *SHOC2* mutations (100). Finally, *RIT* and *CBL* mutations are associated with JMML, the latter also linked to low prevalence of cardiac defects, reduced growth, and cryptorchidism (104, 105).

The vast majority of patients with NS-ML (85%) harbor mutations within *PTPN11*. The remaining NS-ML cases are causally linked to *RAF1* and *BRAF* mutations, which are associated with a more severe phenotype (96).

The main CFCS disease gene is *BRAF* (60%), but a substantial proportion of patients carry mutations on *MEK1* (10%), *MEK2* (10%), and *KRAS*. CFCS congenital heart defects, particularly mitral valve and septal defects, and ocular anomalies seem to be less frequent among patients with *MEK1/MEK2* mutations (106).

The other RASopathies are more genetically homogeneous, with mutations in the *HRAS* gene for almost all patients with CS, a unique mutation on *SHOC2*, and more recently mutations in *PPP1CB* found in patients with NS-LAH (41, 107), mutations in *SPRED1* for LS, and heterozygous loss-of-function

(LOF) mutations or deletions of the *NF1* gene in more than 90% of *NF1* cases (44, 45).

Adding further complexity to the genetic heterogeneity, several RASopathies are allelic diseases. Thus, *PTPN11* mutations are associated with NS (85%) and NS-ML (15%); *SOS1* mutations with NS and CS/CFCs; *KRAS* mutations with NS and CFCs; *BRAF* mutations with CFCs, CS, NS-ML, and NS; *RAF1* mutations with NS and NS-ML; and *MEK1* mutations with CFCs, CS, and NS. This allelism identifies important signaling nodes and may explain the partial overlap and the phenotypic continuum between these related syndromes. However, we show in the next section that functional analyses also revealed syndrome-specific properties for several mutants, which certainly explains the uniqueness of each RASopathy.

Thus, from a functional point of view, specificities emerge for the different syndromes: NS, NS-ML, and NS-LAH are mainly associated with positive regulators of the RAS/MAPK cascade (i.e., RAS or RAF activators), whereas *NF1* and LS are linked to RAS inhibitors. In contrast, CS- and CFCs-causing mutations hit the backbone of the cascade, CS being centered on RAS and CFCs on downstream kinases (Fig. 1). At the risk of overstatement, a tendency emerges in which mutations hitting the central or low part of the cascade give rise to more severe conditions, which may reflect the fact that downstream effectors of the pathway are more unescapable, with higher effect of their dysregulation, than proximal actors, which receive several levels of regulation and can be bypassed.

Functional and Pathophysiological Consequences of RASopathy-Associated Mutations

Functional analyses have been performed for a growing number of mutations, both *in vitro* and in animal models of RASopathies, leading to the general concept of RAS/MAPK hyperactivation as a pathogenic mechanism. Thus, sustained RAS/MAPK activation has been causally linked to the abnormal development of several tissues, leading to some congenital symptoms (e.g., cardiac or craniofacial defects), as well as altered response to different hormones, giving rise to endocrine dysfunctions (e.g., growth hormone insensitivity and growth retardation). However, controversies exist, and the contribution of RAS/MAPK-independent dysfunctions has been demonstrated in several models, which may explain the differences between syndromes.

Functional consequences of RASopathy-causing mutations on the RAS/MAPK pathway

Complementary approaches in functional genetics have been and still are useful for delineating the consequences of RASopathy-associated mutations.

Thus, *in silico* modeling and biochemical analyses led to the identification of structural changes or modifications of enzymatic activity, protein stability, or protein/protein interaction. Ectopic expression of mutated proteins in cellular models and analyses of patient cells, including skin fibroblasts and induced pluripotent stem cells (iPSCs), then allowed understanding of how the mutations alter signaling pathways and cellular functions. Finally, their global effect at the organismal level has been comprehended thanks to the development of animal models of the diseases, in invertebrates (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*) as well as in vertebrates (*Xenopus*, zebrafish and mouse) [see (54, 95, 108, 109) for recent reviews and Table 2].

Approximately 70 different NS-causing *PTPN11* mutations that hit residues within or close to the SH2 and protein-tyrosine-phosphatase (PTP) domains and result in increased phosphatase activity through different mechanisms (e.g., release of auto-inhibitory constraints, increased recruitability) have been identified [reviewed in (54)] (Fig. 2). Interestingly, some studies have started to identify mutation/phenotype correlations; for instance, mutations of Asp61 or Thr71 are preferentially associated with myeloproliferative disorders/JMML (30), whereas Leu261, Leu262, and Arg265 mutations are associated with milder form of NS (170). Coherent with the positive role of SHP2 on the RAS/MAPK pathway, functional analyses have shown that activating NS-associated SHP2 mutations hyperactivates ERK1/2. This effect has been repeatedly reported in different cell types *in vitro*, in the basal state as well as under stimulation by several agonists, and in different tissues/organs in animal models (114, 130, 171–174).

In contrast to NS, the pattern of NS-ML-associated *PTPN11* mutations is restricted to conserved residues within the PTP domain that are required for PTP activity (e.g., Tyr279, Thr468, Gln510). All NS-ML-causing mutations collapse the phosphatase activity of SHP2 under both basal and stimulated states (151, 175–180). However, these mutations are not merely LOF because (1) they retain substantial activity and are stimutable and (2) true LOF mutations of *PTPN11* are associated with a distinct syndrome named metachondromatosis (Mendelian Inheritance in Man $\text{MIM} \#156250$). The effect of NS-ML-associated *PTPN11* mutations on the RAS/MAPK pathway is highly debated. Indeed, consistent with the reduced phosphatase activity of the mutants, overexpression of NS-ML-causing SHP2 mutants in HEK cells or in zebrafish embryos has reduced ERK1/2 activation in response to several agonists (134, 177, 181). Moreover, a mouse model of NS-ML carrying the Tyr279Cys mutation on SHP2 (*Ptpn11*^{Y279C/+}) also displayed hypoactivation of ERK1/2 in the heart in response to insulin or IGF-1 (151). In contrast, different reports highlighted that NS-ML-associated

SHP2 mutants can have a dominant positive effect on RAS/MAPK activation. Indeed, expression of NS-ML mutants in flies and zebrafish hyperactivated ERK1/2 to a similar extent as NS-associated mutants did, interestingly enough resulting in a comparable phenotype for both types of mutations (114, 115, 130). Moreover, basal or agonist-induced MEK/ERK1/2 hyperactivation was measured in cells overexpressing NS-ML mutants in an original model of iPSC-derived cardiomyocytes from patients with NS-ML and in tissues from mice expressing NS-ML-causing SHP2 mutants (*Ptpn11*^{G2510E}, *Ptpn11*^{V468M/+}) (40, 153, 180, 182). Although unexpected from biochemical studies, this gain-of-function effect of NS-ML mutants on RAS/MAPK activation could result from their increased sensitivity to activating stimuli and sustained binding to upstream regulators, which could counterbalance their residual activity, thereby conferring signal-enhancing properties on them (180). The fact that the NS-ML-associated SHP2 mutant can hyperactivate RAS/MAPK, at least upon some conditions that remain to be identified, could explain the phenotypic similarities between NS-ML and NS and other RASopathies.

Various mutation clusters destabilizing regions of the SOS proteins that contribute structurally to the maintenance of their autoinhibited state were found in *SOS1* and to a lesser extent in *SOS2* as causes of NS (102, 103). One mutation (T158A) was also identified in patients with CS/CFCS (183). Functional studies revealed a higher level of GTP-bound RAS and higher ERK1/2 phosphorylation in cells expressing *SOS1* and *SOS2* mutants (103, 184–187), as well as in cardiac tissues from mice expressing the NS-associated E846K variant of *SOS1* (147). Whether NS-causing and CS/CFCS-causing *SOS* mutants differentially affect *SOS* activity or affect additional mechanisms is unknown; however, it was recently shown that NS-causing *SOS1* mutations hitting distinct functional domains differentially modified *SOS* affinity for plasma membranes (188).

Mutations of the different members of the RAS GTPase family have been found in the nucleotide binding site or in structural domains involved in its inactive-to-active conformational change. They give rise to reduced GTPase activity or favor the active conformation, respectively. Thus, CS-associated *HRAS* mutations affect mainly Gly12 or Gly13, which reduced its GTPase activity, resulting in active RAS accumulation and ERK1/2 hyperactivation. Sustained RAS/MAPK activation was also detected in tissues from CS mice (*HRAS*^{G12V/+}), notably in the liver and the brain (155, 156, 189). Interestingly, another mutation in *HRAS*, resulting in aberrant *HRAS* transcript processing and modification of its subcellular localization, was recently identified and is associated with a distinctive, mild CS phenotype (190). *KRAS* mutations, associated with NS, CS, and CFCS, also lead to

RAS/MAPK hyperactivation *in vitro* through different molecular mechanisms, ranging from reduction of its GTPase activity to GAP hyposensitivity or GTPase exchange factor hypersensitivity. Functional studies also suggest that CS-causing and CFCS-causing *KRAS* mutations are stronger than NS-associated modifications (191, 192). *KRAS*^{V141/+} NS mice also display RAS/MAPK hyperactivation in some tissues (150). Mutations of *RIT*, *RRAS*, *NRAS*, and *MIRAS*, more recently found in a small fraction of patients with NS, all result in decreased GTPase activity and subsequent RAS/MAPK hyperactivation (97, 193–196).

For the RAF proteins, mutations affect distinct domains for *RAF1* and *BRAF*. For both proteins, mutations can occur in the kinase domain, also called conserved region (CR) 3. Specific mutations in the CR1 domain of *BRAF*, which are involved in the RAS/*BRAF* interaction, have also been identified, and several *RAF1* mutations cluster in the CR2. The latter are located close to a regulatory phosphorylation site involved in an inhibitory interaction with the 14-3-3 protein. Surprisingly, although most of the mutations are activating and result in RAS/MAPK hyperactivation *in vitro* and *in vivo*, several *BRAF* and *RAF1* mutants are kinase impaired. Wu *et al.* (197) demonstrated that such defective *RAF1* mutants display increased capability to heterodimerize with *BRAF*, resulting in a net increase of the dimer. Comparative analysis suggests that CFC-associated *BRAF* mutations are stronger than those causing NS or NS-ML (138, 157–159, 198, 199).

Mutations of *MEK1* and *MEK2* hit the negative regulatory region or the catalytic core domain of the kinases, resulting in increased kinase activity and gain-of-function effect on the RAS/MAPK pathway (106, 138, 160, 198, 200).

The NS-LAH-associated *SHOC2* mutation (Ser2Gly) has been found to create a myristoylation site, thereby resulting in constitutive translocation of *SHOC2* to specific domains in the plasma membrane and prolonged PP1C activation. Subsequent *BRAF*/*RAF1* dephosphorylation promotes sustained MAPK activation (107, 201). Mutations of *PPP1CB* encoding one of the catalytic subunits of PP1C are thought to directly or indirectly enhance PP1C phosphatase activity, leading to *RAF*/*MEK*/*ERK* hyperactivation, although this has not been demonstrated yet (41).

The mutations identified in the *NF1*, *SPRED1*, and *SPRY* genes mostly give rise to truncated, non-functional proteins [reviewed in (44, 45, 196)]. Some specific *NF1* mutants (e.g., those affecting Arg1809) are associated with NS features (202). NS-causing *RASA2* mutations affect two different conserved residues that are thought to alter GAP activity (203). *CBL* missense mutations impair the E3 ubiquitin ligase activity of the protein or its stability (104). Most of these mutations have been found to increase MAPK signaling through different mechanisms (e.g., reduction of the GAP

Q:17

Table 2. Complementarity of Animal Models of RASopathies

Disease	Mutation	Strategy	Expression Pattern	Phenotype	Mechanisms	Reference
<i>Caenorhabditis elegans</i>						
NS-ML	<i>Ptp-2</i> LOH	Deletion	Vulva	Semisterility/vulval induction		(110)
NS-LAH	<i>Shoc</i> ^{50G}	DNA microinjection	Vulva	Protruding vulva	Increased RAS/MAPK	(107)
CS	<i>Let-60/Ras</i> GOF	DNA microinjection	Vulva	Multivulva	Increased RAS/MAPK	(111)
CFCS	<i>Mek2</i> GOF	DNA microinjection	Vulva	Multivulva	Increased RAS/MAPK	(112)
<i>Drosophila</i>						
NS	<i>Csw</i> ^{D61Y, E76K}	Overexpression	Mushroom body neurons	Long-term memory defects	Increased RAS/MAPK	(113)
	<i>Csw</i> ^{A72S, N308D, E76K}	Overexpression	Wing, eye	Ectopic veins	Increased RAS/MAPK	(114)
NS-ML	<i>Csw</i> ^{Y279C, T468M}	Overexpression	Wing, eye	Ectopic veins	Increased RAS/MAPK	(115)
NS/CS/CFCS	<i>Ras</i> ^{R68Q}	Mutagenesis	Eye, wing, glia	Ectopic veins, resistance to cell death	Increased RAS/MAPK	(116)
CS	<i>Ras</i> ^{G12V}	Overexpression	Heart	Cardiac hypertrophy	Increased RAS/MAPK	(117)
NF1	<i>Nf1</i> ^{-/-}	Insertion of P element	Ubiquitous	Reduced pupae size, shortened life span, abnormal circadian rhythm	Increased RAS/MAPK, mitochondria ROS, impaired cAMP	(118–120)
			Nervous system	Defective in memory acquisition	Impaired cAMP	(121–123)
			Postmitotic larval brain neurons	Reduced growth, synaptic overgrowth	Impaired cAMP	(124, 125)
<i>Xenopus</i>						
NS	<i>Ptpn11</i> ^{N308D}	mRNA injection	Heart	Rescue of Δ Shp2-dependent cardiac defects		(126)
CS	CA <i>Ras</i>	mRNA injection	Ubiquitous	Mesoderm induction during early embryogenesis	Increased RAS/MAPK	(127)
CFCS	CA <i>Raf</i> or <i>Mek</i>	mRNA injection	Ubiquitous	Mesoderm induction during early embryogenesis	Increased RAS/MAPK	(127–129)
<i>Zebrafish</i>						
NS	<i>Ptpn11</i> ^{D61G, T73I}	mRNA injection	Ubiquitous	Craniofacial and heart defects	Increased RAS/MAPK Src dependent signaling	(130, 131)
	<i>NRas</i> ^{T24N}	Synthetic RNA injection	Ubiquitous	Gastrulation and craniofacial defects	Increased RAS/MAPK	(132)
	<i>KRas</i> ^{N116S}	Synthetic RNA injection	Ubiquitous	Craniofacial dysmorphia, heart defects	Increased RAS/MAPK	(133)
NS-ML	<i>Ptpn11</i> ^{A602I, G655A, Y279C, T468M}	mRNA injection	Ubiquitous	Craniofacial and heart defects	Increased RAS/MAPK Src dependent signaling, PZR dependent	(130, 131, 134–136)
CS	<i>Ras</i> ^{G12V}	mRNA injection	Ubiquitous	Tumors, reduced size and life span, smaller heart, and craniofacial defects in adult fish		(137)

(Continued)

Table 2. Continued

Disease	Mutation	Strategy	Expression Pattern	Phenotype	Mechanisms	Reference
CFC5	<i>BRAF</i> , <i>Mek1/2</i> mutations	Microinjection of patient-derived mRNA	Ubiquitous	Developmental abnormalities	Increased RAS/MAPK	(138)
NF1	<i>Nf1a/b</i> knockdown	Morpholinos	Heart/vessels	Cardiovascular defects	Increased RAS/MAPK	(139)
	<i>Nf1a/b</i> ^{-/-}	Targeted mutagenesis	Neurons	Myelination defects, learning deficits	Increased RAS/MAPK	(140, 141)
Mouse						
NS	<i>Ptpn11</i> ^{D61G}	KI	Germline	Short stature, craniofacial defects, cardiac defect, MPD, cognitive deficits	Increased RAS/MAPK	(79, 142)
NS	<i>Ptpn11</i> ^{N308D}	KI	Germline	Cardiac defects, growth retardation, craniofacial defects, hematological problems in hom.	Increased RAS/MAPK	(143)
NS	<i>Ptpn11</i> ^{D61Y}	Conditional KI	Germline	Severe cardiac defects	Increased RAS/MAPK	(143)
			Neural crest	Craniofacial defects	Increased RAS/MAPK	(143)
			Endothelial	Cardiac defects	Increased RAS/MAPK	(143)
			Myocardial	No phenotype	Increased RAS/MAPK	(143)
			Forebrain	Cognitive deficits	Increased RAS/MAPK	(144)
NS	<i>Ptpn11</i> ^{D61A}	Conditional KI	Neuronal	Obesity resistance (in female)	Increased p38	(70)
NS	<i>Ptpn11</i> ^{Q298R}	Additive transgenesis	Myocardial adult	No phenotype	Increased RAS/MAPK	(145)
			Myocardial fetal	Cardiac defects	Increased RAS/MAPK	(145)
		Conditional transgenic	Neural crest	Craniofacial defects	Increased RAS/MAPK	(146)
NS	<i>Sos1</i> ^{E86K}	Conditional KI	Endothelial	Cardiac defects	Increased RAS/MAPK	(146)
			Germline	Cardiac defects, growth retardation, craniofacial defects, hematological problems in hom.	Increased RAS/MAPK, Rac, and Stat3	(147)
NS	<i>Raf</i> ^{L613V}	Conditional KI	Germline	Cardiac defects (HCM), growth retardation, craniofacial defects, hematological problems	Increased RAS/MAPK	(148)
			Endothelial	HCM	Increased RAS/MAPK	(149)
			Cardiomyocyte	Impaired contractility	Increased RAS/MAPK	(149)
NS	<i>K-Ras</i> ^{V34I}	Conditional KI	Germline	Cardiac defects, growth retardation, craniofacial defects, hematological problems	Increased RAS/MAPK	(150)
NS-ML	<i>Ptpn11</i> ^{Y279C}	Conditional KI	Germline	HCM, growth delay, skeletal defects, dysmorphia, abnormal genitalia, sensorineural defects	Increased AKT/mTOR	(151)
			Endothelial	Trabeculation and valvular hyperplasia	Increased AKT/mTOR	(152)
			Cardiomyocyte	Ventricular septal defects	Increased AKT/mTOR	(152)

(Continued)

Table 2. Continued

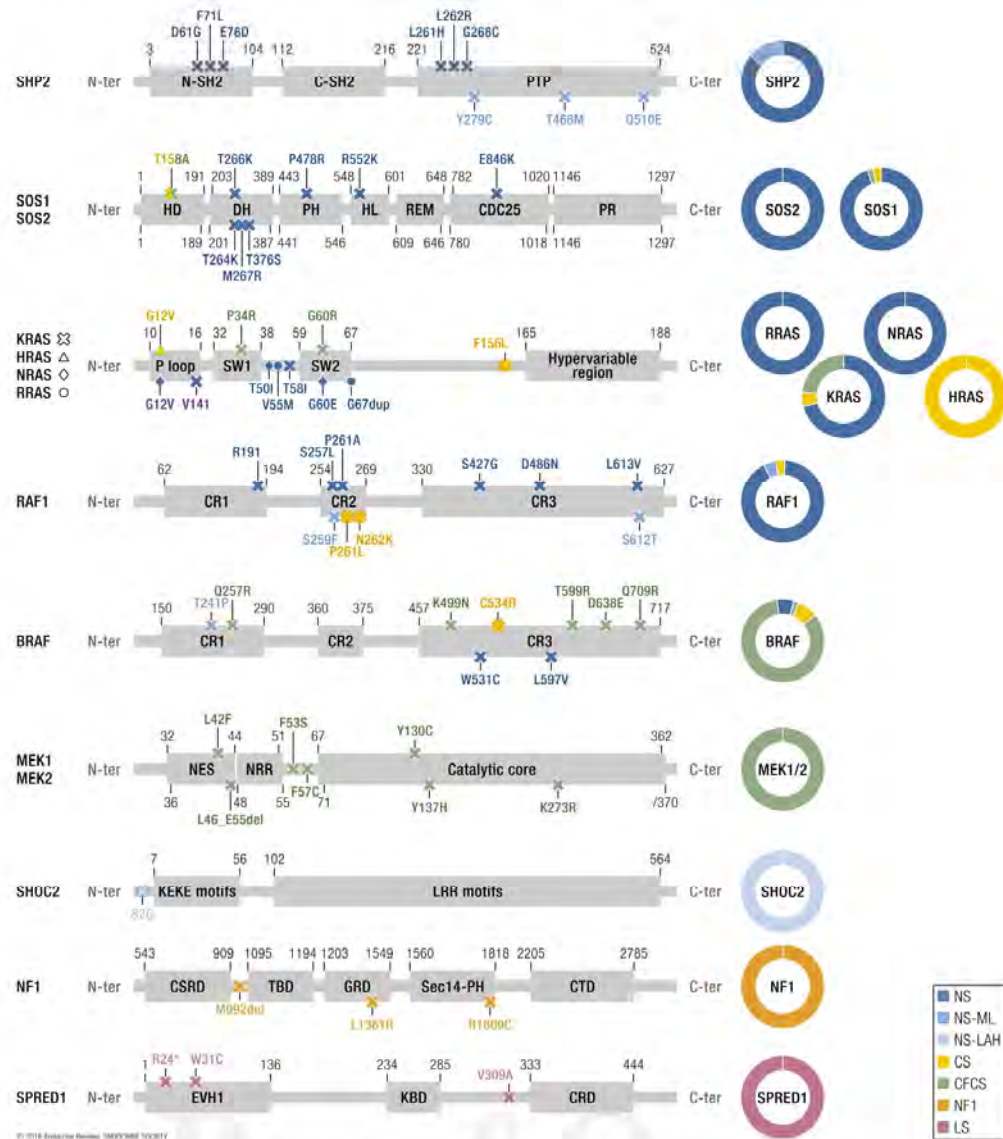
Disease	Mutation	Strategy	Expression Pattern	Phenotype	Mechanisms	Reference		
NS-ML	<i>Ptfn1</i> ^{T668M}	KI	Germline	HCM, growth delay, dysmorphia, reduced adipogenesis, increased EE, improved insulin sensitivity	Increased RAS/MAPK and AKT/mTOR	(40)		
NS-ML	<i>Ptfn1</i> ^{Q510E}	Additive transgenesis	Myocardial fetal	HCM	Increased mTOR	(153)		
			Myocardial adult	No phenotype	Increased mTOR	(153)		
			Endothelial	Increased atrioventricular endocardial cushions	Increased mTOR	(154)		
CS	<i>H-Ras</i> ^{G12V}	Conditional KI	Germline	Model 1: facial dysmorphia, HCM, systemic hypertension, vascular remodeling, fibrosis, neurocognitive deficits, no cancer	No change in RAS/MAPK and Akt	(155)		
				Model 2: cranial dysmorphia, no heart defects, tumors		(156)		
CFC	<i>B-Raf</i> ^{V600E}	Conditional KI	Germline	Reduced life span, growth defect, facial dysmorphia, cardiomegaly, epileptic seizures, neuroendocrine tumors	No change in RAS/MAPK	(157)		
CFC	<i>B-Raf</i> ^{S97V}	Conditional KI	Germline	Short stature, facial dysmorphia, HCM	Increased RAS/MAPK	(158)		
CFC	<i>B-Raf</i> ^{Q241K}	Conditional KI	Germline	Embryonic/neonatal lethality, heart defects, liver necrosis, edema, craniofacial abnormalities, lymphatic defects	Increased RAS/MAPK, decreased p38 and AKT	(159)		
CFC	<i>Mek1</i> ^{Y130C}	KI	Germline	Pulmonary artery stenosis, cranial dysmorphia, neurologic anomalies	Increased RAS/MAPK	(160)		
NF1	<i>Nf1</i> ^{-/-}	KO	Germline	Mild bone defects, deficits in learning, pheochromocytomas (embryonic lethality for <i>Nf1</i> ^{-/-})	PI3K/mTOR/AKT pathway	(161, 162)		
				Endothelial		Cardiac defects	PI3K/mTOR/AKT pathway	(163)
				Myocardial		Cardiac defects	RAS/MAPK pathway	(164)
				MSC		Skeletal malformations	RAS/MAPK pathway	(165)
				Neuronal		Brain malformation, learning deficits	PI3K/mTOR/AKT pathway	(166)
				Schwann cells		Neurofibromas	PI3K/mTOR/AKT pathway	(167)
LS	<i>Spre1</i> ^{-/-}	KO	Germline	Facial dysmorphia, deficits in learning and memory, smaller body weight, hematologic alteration	Increased RAS/MAPK and JAK2	(169)		

Because of their simple morphology and short life cycle, *C. elegans* and *Drosophila* are useful for high-throughput and quantitative studies; *Xenopus* and zebrafish help monitor developmental defects. Mice are commonly used to reproduce phenotypes of human RASopathies.

Q:30 Abbreviations: CA, constitutively active; GOF, gain of function; KI, knockin; KO, knockout; MPD, myeloproliferative disorder.

Q-28

Figure 2. Structure of components of the RAS/MAPK pathway and RASopathy-causing mutations. The functional domains of the main proteins mutated in the different RASopathies are depicted, highlighting the major RASopathy-causing mutations (left panel). For each protein, the proportion of mutations associated with the different syndromes is shown (right panel). CDC25, CDC25 homology domain; CRD, cysteine-rich domain; CSRD, cysteine/serine-rich domain; CTD, carboxy-terminal domain; DH, Dbl homology domain; EVH1, enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology-1; GRD, GAP-related domain; HD, histone-like domain; HL, helical linker; KBD, c-Kit-binding domain; KEKE motif, region enriched in alternating lysine and glutamate/aspartate residues; LRR, leucine-rich region; NES, nuclear export signal; NRR, negative regulatory region; PH, Pleckstrin homology domain; P loop, phosphate-binding loop; PR, proline-rich region; PTP, protein-tyrosine-phosphatase domain; REM, Ras exchanger motif; Sec14-PH, homologous to the lipid-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol transfer protein Sec14p-pleckstrin homology domain; SH2, Src homology 2 domain; SW1 and SW2, switch region 1 and 2; TBD, tubulin-binding domain.



doi: 10.1210/er.2017-00232

<https://academic.oup.com/edrv>

13

activity of NF1 or RASA2 and maintenance of RAS-GTP, decreased receptor turnover for CBL mutations, or loss of the SPROUTY inhibitory effect).

Altogether, RASopathy-causing mutations seem to have an activating effect on the RAS/MAPK pathway, but many modulatory events have to be taken into account. First, most of the mutations have complex and subtle consequences that result in a more qualitative than quantitative dysfunction of the RAS/MAPK pathway. In favor of a qualitative effect, although copy number variants encompassing RAS/MAPK genes have been proposed as a cause of RASopathies, they often do not phenocopy syndromes caused by missense mutations (204). Second, the spatiotemporal level of RAS/MAPK hyperactivation can greatly vary depending on the mutated actor (activator, inhibitor, or central component of the pathway). Third, a large combinatorics of events can enhance or reduce the effect of a given mutation: expression-level or cell/tissue specificity of mutated protein or cofactors, stimulus specificity, and mobilization of additional signaling pathways. In the next part, we show that these events determine the penetrance/expressivity of the mutations, explaining that some tolerant cells/tissues maintain a normal function, whereas other turn into pathological dysfunctions.

Consequences of germline hyperactivation of the RAS/MAPK pathway

Cardiac defects

Considerable work has been performed to delineate the mechanisms underlying cardiac defects in RASopathies. Thus, careful analysis of the cardiac defects in zebrafish embryos indicated that expression of NS-associated as well as NS-ML-associated SHP2 variants induced loss of asymmetry, which resulted from impaired cilia function in the Kupffer vesicle, a phenotype that was corrected by pharmacological MEK inhibition (130). Cardiac defects have also been causally linked to RAS/MAPK hyperactivation in several mouse models of NS (143, 146, 147, 150, 205). Expression of NS-associated SHP2 mutants in fetal, but not adult, cardiomyocytes promotes ERK1/2 hyperactivation and is associated with ventricular and valvular abnormalities (143, 205, 206). However, comparison of tissue-specific knockin (KI) mice revealed that endothelial/endocardial-restricted expression of NS-associated SHP2 or SOS1 mutants was sufficient to trigger cardiac valve defects in NS (143, 146, 147). These apparent discrepancies may have an explanation in the time window during which the conditional expression occurs, as well as in the dysregulated communication between both tissues, in particular implying proinflammatory cytokines (TNF α , IL6), as recently suggested by Yin *et al.* (149). In *Nfi*^{-/-} mice, defects in endothelial cushions resulting in obstructed blood

flow were dependent on RAS/MAPK hyperactivation (207, 208). Cardiac defects driven by the CFC3-causing BRAF mutants could also be rescued by prenatal MEK inhibition, alone or in combination with other inhibitors (159, 209).

The pathophysiology of HCM, occurring in ~30% of affected patients and being evolutive throughout life, has been extensively studied in several models, leading to contradictory results. Two elegant studies using tissue-specific KI models of the NS-causing RAF-L613V and NS-ML-causing SHP2-Y279C mutants highlighted the relative contribution of the different cardiac cell types and of their communication in HCM development. Interestingly, both studies revealed that endothelial/endocardial expression of the mutants promoted cardiomyocyte hypertrophy (149, 152). For the two HCM-prone NS mouse models (*Sos1*^{E846K} and *Raf1*^{L613V}), rescue experiments revealed a key role of MAPK hyperactivation in HCM development (147, 148). Distinct mechanisms have been proposed for NS-ML-associated HCM (*Ptpn11*^{Y279C/+}, *Ptpn11*^{Q2510E}) (see later section), but the role of RAS/MAPK hyperactivation has not been firmly excluded.

Craniofacial defects, growth retardation, and decreased bone mass

Craniofacial defects (underlying facial dysmorphic features in humans) and growth retardation have been documented in several animal models of RASopathies (131, 143, 147, 148, 150, 159, 205). A mouse with neural crest cell-specific expression of the SHP2 Q79R, NS-causing mutant recapitulated these skull anomalies and revealed delayed ossification of frontal bones and lack of osteogenic differentiation (210). Prenatal treatment with MEK inhibitors was necessary and was sufficient to rescue craniofacial defects, highlighting an effect of RASopathy-associated RAS/MAPK hyperactivation in skull formation during the developmental stage (150).

The mechanisms underlying growth retardation were explored in *Ptpn11*^{D61G/+} mice. Growth retardation develops after birth and comes along with reduced IGF-1 levels and GH-evoked RAS/MAPK hyperactivation. Importantly, early treatment with a MEK inhibitor normalized IGF-1 levels and improved the growth of NS mice, implying that hyperactivation of the RAS/MAPK pathway is a driving force for this symptom (79). In addition to endocrine defects, a direct (IGF-1 independent) of RAS/MAPK hyperactivation at the growth plate level certainly contributes to growth retardation. Indeed, very recently, NS-associated SHP2 mutants were shown to impair chondrocyte differentiation *in vitro* and *in vivo* during endochondral ossification, resulting in impaired growth plate development and reduced growth of long bones. Noticeably, this defect was rescued by MEK inhibition but not by IGF-1 treatment, although both alleviated growth retardation (211). Regarding decreased bone mass, mice with

specific *Nfi* invalidation in bone and/or cartilage progenitors display enhanced osteoclastogenesis, impaired osteoblast differentiation, and defective bone mineralization, which are reverted by chronic inhibition of the RAS/MAPK pathway (165, 212–216).

Cognitive deficits

Animal models have also been valuable in deciphering the mechanisms underlying RASopathy-associated cognitive impairment. The behavioral phenotypes of models of NF1, NS, and LS, notably learning and memory deficits and defective synaptic plasticity, were linked to hippocampal dysfunction, notably altered long-term memory induction, and to defects in neural progenitor specification and were associated with ERK1/2 hyperactivation. Consistently, treatment aimed at reducing RAS/MAPK signaling restored the cognitive defects (113, 217–221). In contrast, although CS mice also displayed enhanced ERK signaling in the brain, their cognitive deficits were not alleviated by RAS/MAPK inhibition (189). Differences in treatment protocols or in quantitative or qualitative RAS/MAPK dysregulation or involvement of alternative or compensatory mechanisms may explain these differences. Supporting this hypothesis, such treatments aimed at improving the cognitive function of patients with NF1 have given rise to divergent results (222–224). Moreover, Altmüller *et al.* (144) recently highlighted the importance of proper ERK dynamics and the existence of additional mechanisms.

Cancer predisposition

Understanding the pathophysiology of RASopathy-driven tumorigenesis is a major challenge ahead, for which animal models as well as state-of-the-art cellular tools have provided key insights. Although the contribution of RAS/MAPK hyperactivation in tumor development is quite intuitive, given its pro-oncogene function, additional mechanisms may be involved. Indeed, RAS/MAPK hyperactivation has been measured in hematopoietic cells expressing NS/JMML-associated SHP2 mutants, and this dysregulation contributes to leukemogenesis; however, other mechanisms have been identified (171, 225). In the *Kras^{V14L/+}* mouse model of NS, chronic MEK inhibition has no effect on myeloproliferative disorder (MPD), whereas it efficiently alleviates other traits of the disease, suggesting that RAS/MAPK hyperactivation is not the main leukemogenic force (150). In contrast, similar treatment abrogated MPD and other tumor growth in mouse models of NF1 (168, 226, 227). In one CS mouse model, RAS/MAPK inhibition efficiently alleviated papilloma development (156).

Other mechanisms in RASopathy pathophysiology

RAS/MAPK “independent” mechanisms

In addition to RAS/MAPK hyperactivation, several signaling pathways have been found to be dysregulated in RASopathies and to participate in their pathophysiology. Thus, a hyperactivation of PI3K/AKT signaling has been reported in models of NS-ML (151, 175, 176, 228), SOS-associated and *HRAAS*-associated CS/CFCS (187, 229, 230), and *KRAS*-related NS/CFCS (40, 149, 187, 191, 229, 231). From a functional point of view, in several cellular and animal models of NS-ML, cardiomyocyte hypertrophy was associated with PI3K/AKT/mTOR hyperactivation and HCM was reverted by treatment with rapamycin or AKT inhibitor as well as *AKT1* genetic invalidation (151, 153, 175, 228, 232). Of note, a recent study revealed that cardiac function in an infant with NS-ML and rapidly progressive HCM was improved by 12-week everolimus (a rapamycin analogue) treatment. Although cardiac hypertrophy was not reverted in this time frame, this report provides new insights into new therapies to alleviate NS-ML-associated HCM (233). The fact that both hyperactivation of RAS/MAPK and PI3K/AKT pathways give rise to similar HCM-triggering cellular defects is somewhat puzzling. However, the possibility that dysregulation of both pathways contributes jointly to HCM pathophysiology has not been addressed in the same model, although crosstalks between these two pathways are well established (234).

In addition to PI3K dysregulation, CS-associated cardiomyopathies have been causally linked to upregulation of the renin-angiotensin II system, driving a hypertensive phenotype and pointing to angiotensin convertase inhibitors as potent therapies (155).

Further highlighting a wider role for PI3K dysregulation in RASopathy pathophysiology, Kamiya *et al.* (235) recently demonstrated that targeted invalidation of *Nfi* in osteocytes resulted in increased FGF23 levels associated with an osteomalacialike bone phenotype, which was reverted by treatment with PI3K inhibitors. PI3K/AKT hyperactivation has also been measured in hematopoietic cells expressing NS/JMML-associated SHP2 mutants (171, 225). PI3K/AKT/mTOR hyperactivation is also thought to underlie the pathogenesis of multiple lentigenes in NS-ML (236).

Regarding MPD and cancer development, STAT3 hypophosphorylation has been proposed as contributing to leukemogenesis in the context of NS/JMML-associated SHP2 mutants (171, 225). Enhanced dephosphorylation of STAT3 was also recently described in a mouse with pan-neuronal expression of the SHP2 E76K mutant, resulting in hydrocephalus development (237). Interestingly, using iPSC from patients with NS who did or did not develop JMML, Mulero-Navarro *et al.* (238) identified STAT5 hyperactivation as a leukemogenic signature that is associated

with upregulation of specific miRNA. Moreover, NS-associated SHP2 mutants have been shown to promote MPD through alterations of mitochondrial aerobic metabolism and reactive oxygen species production (239). Pathophysiological studies identified that the SHP2^{L661G} mutant promotes MPD by triggering hematopoietic stem cell cycling and increasing the stem cell pool, an effect that could be mediated by proinflammatory cytokines secreted by monocytes in the vicinity of hematopoietic stem cells (240, 241). Regarding NF1, studies demonstrated that development of several tumors, including astrocytomas, glioblastomas, MPD, and JMML, depends on the loss of other tumor suppressors (242–244).

Endocrine and metabolism imbalance: causes or consequences?

In addition to established features, a recent metabolic characterization of *Ptpn11*^{T468M/+} NS-ML mice revealed a complex metabolic phenotype, associating defective adipogenesis, increased EE, and mitochondria activity/biogenesis as well as improved insulin sensitivity. These different metabolic anomalies resulted in reduced adiposity and improved carbohydrate metabolism, which could be respectively reverted by MEK inhibitor and rapamycin treatment (40). Moreover, neuronal KI of the hyperactive SHP2-D61A mutant resulted in resistance to obesity and increased EE, a phenotype that seems restricted to females because of the synergistic action of estrogens (70). This metabolic phenotype is also thought to be linked to the fact that expression of NS-associated SHP2 mutants is correlated with mitochondrial dysfunction and that patients with CS display increased EE (43, 245), suggesting that metabolic defects may be a common trait of RASopathies. In light of the complex roles of the RAS/MAPK pathway in homeostasis maintenance, one may expect that other dysfunctions of endocrine/metabolic processes will be identified. Moreover, an interesting area of research would be to determine whether such metabolic defects participate in the development of other traits of the diseases. For instance, decreased adiposity or lipodystrophy, as well as imbalance in carbohydrate metabolism or resistance to metabolic hormones (e.g., insulin, leptin), have been associated with the development or worsening of several cardiopathies, notably HCM (246).

Therapeutic Perspectives

Because genetic diseases by definition affect few individuals, they have long been neglected in pathophysiological research, thereby lacking etiologic treatment. As with other rare diseases, the sole option for patients with RASopathies has long been symptomatic therapies, notably for cardiopathies and

growth delay. However, their efficiency and safety are debated, and the identification of specific mutations and pathogenic mechanisms now provides new insights into specific therapies. In particular, with RAS/MAPK hyperactivation as a shared foundation, future strategies for treatment of RASopathies can thrive on therapeutic applications in the field of RAS-driven cancers. Moreover, understanding the long-term, systemic consequences of RASopathy-associated mutations will certainly shed light on additional processes to target for alleviating specific traits.

Symptomatic approaches

Similar to patients with nonsyndromic congenital heart defects, patients with RASopathies often undergo cardiac surgery, including corrective surgery for valvular malformations (valvuloplasty or primary surgical repair), ventricular septal myectomy for hypertrophy, or even heart transplantation (5). For HCM evolving to congestive heart failure, beneficial effects of beta-blocker therapy have been observed on diastolic function and ventricular remodeling (247). HCM frequently coexists with structural malformations in patients with NS, although they rarely occur in nonsyndromic HCM, which may explain worse late survival in patients with NS (248).

As a symptomatic approach for NS-associated growth retardation and before some pathophysiological mechanisms were identified, treatment with recombinant human growth hormone (rhGH) was approved by the US Food and Drug Administration in 2007 (contrary to the European Medicines Agency); however, its efficiency is still debated. Although most studies reported an enhancement of growth during the first years of treatment, the benefit of long-term therapy is uncertain. To date, only six studies reported adult height or near-adult height, with a height gain SDS varying from 0.6 to 1.4 (~4 to 11 cm, respectively). Better responses were observed with earlier initiation and longer duration of rhGH treatment (17, 249–253).

Results of clinical trials are difficult to compare because of differing protocols (variable enrollment ages, treatment durations, and doses) and outcome criteria. None of these studies was a randomized controlled trial, and major biases affected all of the studies (254). Concerning genotype-phenotype correlations, a lower growth response was initially suggested in patients with NS and a *PTPN11* mutation (255), but it was not confirmed in long-term studies with a similar height gain compared with that of other genotypes (250). However, patients with *PTPN11* mutations presented with more severe short stature and therefore reached a lower adult height. These results may be related to GH insensitivity and/or alteration of the growth plate described in the previous section. Concerns also exist about the use of rhGH treatment in patients with RASopathies according to

their tumor predisposition, notably for patients with CS, although GH deficiency has been reported for few cases (256). Regarding cardiopathies, although it was initially postulated that rhGH treatment may have an effect on ventricular development in patients with NS and heart defects, two prospective studies did not find any cause for concern (257, 258).

Targeted approaches

Given the role of RAS/MAPK hyperactivation in the pathophysiology of RASopathies, therapeutic strategies aimed at reducing this activation seem very promising. As mentioned before, preclinical studies have demonstrated the potency of pharmacological MEK inhibitors (e.g., U0126, PD0359201) in alleviating several traits of the diseases, including craniofacial defects, growth retardation, cardiopathies, and cognitive deficits (79, 143, 145, 146, 148, 220). Interestingly, because RAS/MAPK dysregulation has also been causally linked to numerous malignancies in humans, one may wonder whether RAS-targeting anticancer therapies can be repurposed for the treatment of RASopathies, at least for noncongenital features (42). Several agents targeting the RAS/MAPK pathway (e.g., farnesyltransferase inhibitors, RAS antagonists, RAF, BRAF, and MEK inhibitors) are currently undergoing clinical trials in the context of cancer. However, substantial side effects and resistance mechanisms for some of them (e.g., RAF inhibitors), arising from relief of negative feedback loops and requiring combinatory therapies, have been reported (47, 259). These effects may impede their transposition to the field of RASopathies, in particular when long-lasting, chronic treatment is necessary. Arguing against this notion, the therapeutic dose for treatment of RASopathies, aimed at normalizing RAS/MAPK activation, would certainly be far below cytotoxic anticancer therapies, thereby limiting both adverse effects and compensatory mechanisms.

A key difference between RASopathies and RAS-driven cancers that could influence therapeutic options is the very nature (germline vs somatic) of the mutations. Indeed, as in any genetic disease, RASopathy-associated germline mutations generate a homeostatic load, notably a sustained RAS/MAPK tonus, as soon as the earliest stage of organismal development, resulting in setting up of specific counter-regulations. Following this logic, targeting the mechanisms (e.g., metabolic, endocrine, structural changes) by which the organism adapts to RAS/MAPK hyperactivation would be more potent than targeting RAS/MAPK itself.

Another limitation for the use of RAS/MAPK-targeting anticancer therapies is that specific mutations could positively, but also negatively, modify the sensitivity of the mutated protein to certain pharmacological inhibitors. Indeed, it was recently demonstrated that several NS-causing SHP2 mutants are

unfortunately resistant to the SHP2 allosteric inhibitor SHP099, although this molecule displayed high efficiency, good tolerance, and oral bioavailability (260). Similarly, specific mutations of RAF1 or MEK1 have been shown to make mutated derivatives resistant to inhibitors targeting the corresponding WT kinases (261, 262).

Beyond the parallel between RASopathies and RAS-driven cancers, the use of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, also known as "statins," has been suggested as a potential therapy for RASopathies. Indeed, it has been proposed that statins can decrease RAS activity by reducing RAS farnesylation and its localization to the plasma membrane (263). Although this effect may not be restricted to RAS but affects all farnesylated proteins in a nonspecific manner, a fine-tuned dosage may normalize RAS activation without affecting other functions in the context of RAS hyperactivation. Thus, the efficacy of statins for the treatment of cognitive deficits has been reported in mouse models of NS and NF1 (218, 220). Statins (e.g., simvastatin) have also been assessed in clinical studies for the treatment of cognitive deficits in children with NF1 with no major or minor effects but good tolerance (222, 223). Moreover, it was recently reported that statin treatment may improve growth and correct impaired chondrocyte differentiation in an NS mouse model (211). Clinical trials are needed to test whether statin treatment could be a therapeutic strategy to alleviate growth retardation and other noncongenital features in patients with NS. A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled therapeutic trial is under way to test the efficiency and safety of simvastatin to treat growth and bone abnormalities in children with NS (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02713945).

In addition to inhibition of the RAS/MAPK pathway, specific alterations could be targeted. In the case of NS-ML, which has been causally linked to PI3K/AKT/mTOR hyperactivation, pharmacological strategies aimed at inhibiting this pathway (rapamycin, AKT inhibitor) have efficiently alleviated some symptoms of the disease in mouse models and also in patients (151, 228, 233). In patients with NS with activating *PTPN11* mutations, another approach will be the pharmacological inhibition of SHP2 activity, as such molecules have been developed in the cancer field and tested in mouse tumor models (264). In addition, several studies have suggested the contribution of proinflammatory cytokine signaling in RASopathy pathophysiology, notably in HCM development, as treatment with cyclosporine or TGF β inhibitors has reversed cardiomyocyte hypertrophy (265, 266). Moreover, current efforts are directed toward the screening of new molecules that could revert specific RASopathy-associated phenotypes in cellular (e.g., iPSC-derived engineered cardiac tissues) and animal models (*C. elegans*, zebrafish) (267).

Future Directions

Within less than 30 years, considerable advances have been made in the understanding of RASopathy pathophysiology, with the identification of causal mutations and the functional analysis of their pathophysiological consequences. However, many questions remain unanswered. Indeed, there are still unidentified causal genes for a large proportion of patients diagnosed with RASopathies. For those new genes, as well as for recently identified mutations, functional analyses will enrich our understanding of RASopathies. Future work will also be directed toward identifying the precise mechanisms underlying the similarities and differences between RASopathies and the variable expression of a given mutation. Moreover, although several molecular defects have been identified, notably for major congenital features, they often rely on organ/function-directed approaches, so we still have a fragmentary view of the global pathophysiology.

Major challenges ahead are thus to delineate the integrated effect of RASopathy-associated mutations,

taking into account recently identified endocrine and metabolic imbalances and interorgan interactions, and to assess the relative contribution of the different alterations to the global phenotype. The likely contribution of both autonomous and nonautonomous mechanisms in any investigated function is certainly an important obstacle, which may be overcome by the combined use of multiple tissue-specific and inducible models, as well as multiscale differential studies, modeling, and computation analysis. Moreover, additional levels of complexity will certainly emerge, including genetic, environmental, or age-related and sex-related modifiers. Longitudinal clinical studies on bigger cohorts of patients will certainly provide important insights about such contributions and will allow robust genotype/phenotype correlations. All this knowledge to come will allow the development of personalized medicine aimed at normalizing the more relevant pathogenic mechanisms. Beyond rare diseases, understanding of the consequences of germline activation of RAS/MAPK can have a wider fallout in the field of chronic disorders.

References

- Noonan JA. Hypertelorism with Turner phenotype: a new syndrome with associated congenital heart disease. *Am J Dis Child.* 1968;**116**(4):373–380.
- Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;**25**(1):161–179.
- Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Mol Syndromol.* 2010;**1**(1):2–26.
- Allanson JE, Bohring A, Dörr HG, Dufke A, Gillissen-Kaesbach G, Horn D, König R, Kratz CP, Kutsche K, Pauli S, Raskin S, Rauch A, Turner A, Wiczorek D, Zenker M. The face of Noonan syndrome: does phenotype predict genotype. *Am J Med Genet A.* 2010;**152A**(8):1960–1966.
- Prendiville TW, Gauvreau K, Tworog-Dube E, Patkin L, Kucherlapati RS, Roberts AE, Lacro RV. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Arch Dis Child.* 2014;**99**(7):629–634.
- Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA. The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. *Arch Dis Child.* 2007;**92**(2):128–132.
- Calcagni G, Limongelli G, D'Ambrosio A, Gesualdo F, Digilio MC, Baban A, Albanese SB, Versacci P, De Luca E, Ferrero GB, Baldassarre G, Agnoletti G, Banaudi E, Marek J, Kaski JP, Tuo G, Russo MG, Pacileo G, Milanese O, Messina D, Marasini M, Cairello F, Formigari R, Brighenti M, Dallapiccola B, Tartaglia M, Marino B. Cardiac defects, morbidity and mortality in patients affected by RASopathies. CARNET study results. *Int J Cardiol.* 2017;**245**:92–98.
- Malaquias AC, Brasil AS, Pereira AC, Arnhold JJ, Mendonca BB, Bertola DR, Jorge AA. Growth standards of patients with Noonan and Noonan-like syndromes with mutations in the RAS/MAPK pathway. *Am J Med Genet A.* 2012;**158A**(11):2700–2706.
- Witt DR, Keena BA, Hall JG, Allanson JE. Growth curves for height in Noonan syndrome. *Clin Genet.* 1986;**30**(3):150–153.
- Ranke MB, Heidemann P, Knüpfer C, Enders H, Schmalz AA, Bierich JR. Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. *Eur J Pediatr.* 1988;**148**(3):220–227.
- Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, Roberts AE, Robinson W, Takemoto CM, Noonan JA. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics.* 2010;**126**(4):746–759.
- Cessans C, Ehlinger V, Arnaud C, Yart A, Capri Y, Barat P, Cammas B, Lacombe D, Coutant R, David A, Baron S, Weill J, Leheup B, Nicolino M, Salles JP, Verloes A, Tauber M, Cave H, Edouard T. Growth patterns of patients with Noonan syndrome: correlation with age and genotype. *Eur J Endocrinol.* 2016;**174**(5):641–650.
- Yart A, Edouard T. Noonan syndrome: an update on growth and development. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018;**25**(1):67–73.
- Noonan JA, Kappelgaard AM. The efficacy and safety of growth hormone therapy in children with Noonan syndrome: a review of the evidence. *Horm Res Paediatr.* 2015;**83**(3):157–166.
- Binder G, Grathwol S, von Loeper K, Blumenstock G, Kaulitz R, Freiberg C, Weibel M, Lissewski C, Zenker M, Paul T. Health and quality of life in adults with Noonan syndrome. *J Pediatr.* 2012;**161**(3):501–505.e1.
- da Silva FM, Jorge AA, Malaquias A, da Costa Pereira A, Yamamoto GL, Kim CA, Bertola D. Nutritional aspects of Noonan syndrome and Noonan-related disorders. *Am J Med Genet A.* 2016;**170**(6):1525–1531.
- Romano AA, Dana K, Bakker B, Davis DA, Hunold JJ, Jacobs J, Lippe B. Growth response, near-adult height, and patterns of growth and puberty in patients with Noonan syndrome treated with growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;**94**(7):2338–2344.
- Sharland M, Burch M, McKenna WM, Paton MA. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child.* 1992;**67**(2):178–183.
- Ankarberg-Lindgren C, Westphal O, Dahlgren J. Testicular size development and reproductive hormones in boys and adult males with Noonan syndrome: a longitudinal study. *Eur J Endocrinol.* 2011;**165**(1):137–144.
- Marcus KA, Sweep CG, van der Burg I, Noordam C. Impaired Sertoli cell function in males diagnosed with Noonan syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;**21**(11):1079–1084.
- Tartaglia M, Cordeddu V, Chang H, Shaw A, Kalidas K, Crosby A, Patton MA, Sorcini M, van der Burg I, Jeffery S, Gelb BD. Paternal germline origin and sex-ratio distortion in transmission of PTPN11 mutations in Noonan syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004;**75**(3):492–497.
- Choudhry KS, Grover M, Tran AA, O'Brian Smith E, Ellis KJ, Lee BH. Decreased bone mineralization in children with Noonan syndrome: another consequence of dysregulated RAS/MAPK pathway? *Mol Genet Metab.* 2012;**106**(2):237–240.
- Baldassarre G, Mussa A, Carli D, Molinatto C, Ferrero GB. Constitutional bone impairment in Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 2017;**173**(3):692–698.
- Cesarini L, Alferi P, Pantaleoni F, Vasta I, Cerutti M, Petrangeli V, Mariotti P, Leoni C, Ricci D, Vicari S, Selicorni A, Tartaglia M, Mercuri E, Zampino G.

- Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *Am J Med Genet A*. 2009;**149A**(2):140–146.
25. Pierpont EI, Tworog-Dube E, Roberts AE. Attention skills and executive functioning in children with Noonan syndrome and their unaffected siblings. *Dev Med Child Neurol*. 2015;**57**(4):385–392.
 26. Roelofs RL, Janssen N, Wingbermühle E, Kessels RP, Egger J. Intellectual development in Noonan syndrome: a longitudinal study. *Brain Behav*. 2016;**6**(7):e00479.
 27. Arcioni A, Selicorni A, Passamonti SM, Lecchi A, Bucciarelli P, Cerutti M, Cianci P, Giannelli F, Martinelli I. Hemostatic abnormalities in Noonan syndrome. *Pediatrics*. 2014;**133**(5):e1299–e1304.
 28. Shattand M, Parron MA, Talbot S, Chirelia A, Bevan DH. Coagulation-factor deficiencies and abnormal bleeding in Noonan's syndrome. *Lancet*. 1992;**339**(8784):19–21.
 29. Kratz CP, Franke L, Peters H, Kohlschmidt N, Kazmierczak B, Finckh U, Bier A, Eichhorn B, Blank C, Kraus C, Kohlhaase J, Pauli S, Wildhardt G, Kutsche K, Auber B, Christmann A, Bachmann N, Mitter D, Cremer FW, Mayer K, Daumer-Haas C, Nevinny-Stickel-Hinzpeter C, Oeffner F, Schlüter G, Gencik M, Überacker B, Lissewski C, Schanze I, Greene MH, Spix C, Zenker M. Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello, and cardio-facio-cutaneous syndromes. *Br J Cancer*. 2015;**112**(8):1392–1397.
 30. Strullu M, Caye A, Lachenaud J, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, Pouvreau N, Pereira S, Baumann C, Contet A, Sirvent N, Méchinaud F, Guellec I, Adjaoud D, Paillard C, Alberti C, Zenker M, Chomienne C, Bertrand Y, Baruchel A, Verloes A, Cavé H. Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. *J Med Genet*. 2014;**51**(10):689–697.
 31. Jongmans MC, van der Burgt I, Hoogerbrugge PM, Noordam K, Yntema HG, Nillesen WM, Kuiper RP, Ligtenberg JM, van Kessel AG, van Krieken JH, Kiemeny LA, Hoogerbrugge N. Cancer risk in patients with Noonan syndrome carrying a PTPN11 mutation. *Eur J Hum Genet*. 2011;**19**(8):870–874.
 32. Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B. Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;**3**(1):13.
 33. Limongelli G, Pacileo G, Marino B, Digilio MC, Sarkozy A, Elliott P, Versacci P, Calabro P, De Zorzi A, Di Salvo G, Syrris P, Patton M, McKenna WJ, Dallapiccola B, Calabro R. Prevalence and clinical significance of cardiovascular abnormalities in patients with the LEOPARD syndrome. *Am J Cardiol*. 2007;**100**(4):736–741.
 34. Sarkozy A, Conti E, Digilio MC, Marino B, Morini E, Pacileo G, Wilson M, Calabro R, Pizzuti A, Dallapiccola B. Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentigines LEOPARD syndrome. *J Med Genet*. 2004;**41**(5):e68.
 35. Woywodt A, Welzel J, Haase H, Duerholz A, Wiegand U, Potratz J, Sheikhzadeh A. Cardiomyopathic lentiginosis/LEOPARD syndrome presenting as sudden cardiac arrest. *Chest*. 1998;**113**(5):1415–1417.
 36. Limongelli G, Sarkozy A, Pacileo G, Calabro P, Digilio MC, Maddaloni V, Gagliardi G, Di Salvo G, Iacominio M, Marino B, Dallapiccola B, Calabro R. Genotype-phenotype analysis and natural history of left ventricular hypertrophy in LEOPARD syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008;**146A**(5):620–628.
 37. Lauriol J, Jaffré F, Kontaridis MI. The role of the protein tyrosine phosphatase SHP2 in cardiac development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;**37**:73–81.
 38. Digilio MC, Sarkozy A, de Zorzi A, Pacileo G, Limongelli G, Mingarelli R, Calabro R, Marino B, Dallapiccola B. LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life. *Am J Med Genet A*. 2006;**140A**(7):740–746.
 39. Carcavilla A, Santome JL, Pinto I, Sanchez-Pozo J, Guillen-Navarro E, Martín-Frías M, Lapunzina P, Ezquieta B. LEOPARD syndrome: a variant of Noonan syndrome strongly associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2013;**66**(5):350–356.
 40. Tajan M, Batuc A, Cadoudal T, Deleruyelle S, Le Gonidec S, Saint Laurent C, Vormscheid M, Wanecq E, Tréguer K, De Rocca Serra-Nédélec A, Vinel C, Marques M-A, Pozzo J, Kunduzova O, Salles J-P, Tauber M, Baynal P, Cavé H, Feloisard T, Valer P, Yart A. LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;**111**(42):E4494–E4503.
 41. Gripp KW, Aldinger KA, Bennett JT, Baker L, Tusi J, Powell-Hamilton N, Stabley D, Sol-Church K, Timms AE, Dobyns WB. A novel rasopathy caused by recurrent de novo missense mutations in PPP1CB closely resembles Noonan syndrome with loose anagen hair. *Am J Med Genet A*. 2016;**170**(9):2237–2247.
 42. Rauen KA, Banerjee A, Bishop WR, Lauchle JO, McCormick F, McMahon M, Melese T, Munster PN, Nadaf S, Packer RJ, Sebolt-Leopold J, Viskochil DH. Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: moving toward clinical trials in RASopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011;**157**(2):136–146.
 43. Leoni C, Onesimo R, Giorgio V, Diamanti A, Giorgio D, Martini L, Rossodivita A, Tarraglia M, Zampino G. Understanding growth failure in Costello syndrome: increased resting energy expenditure. *J Pediatr*. 2016;**170**:322–324.
 44. Abramowicz A, Gos M. Neurofibromin in neurofibromatosis type 1: mutations in NF1 gene as a cause of disease. *Dev Period Med*. 2014;**18**(3):297–306.
 45. Brems H, Pasmant E, Van Minkelen R, Wimmer K, Upadhyaya M, Legius E, Messiaen L. Review and update of SPRED1 mutations causing Legius syndrome. *Hum Mutat*. 2012;**33**(11):1538–1546.
 46. Atay O, Skotheim JM. Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *J Cell Biol*. 2017;**216**(2):317–330.
 47. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;**170**(1):17–33.
 48. Montagner A, Yart A, Dance M, Perret B, Salles JP, Raynal P. A novel role for Gab1 and SHP2 in EGF-induced Ras activation. *J Biol Chem*. 2005;**280**:5350–5360.
 49. Agazie YM, Hayman MJ. Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;**23**(21):7875–7886.
 50. Bunda S, Burrell K, Heir P, Zeng L, Alamsahebpour A, Kano Y, Raught B, Zhang ZY, Zadeh G, Ohh M. Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis. *Nat Commun*. 2015;**6**(1):8859.
 51. Fey D, Matallanas D, Rauch J, Rukhlenko OS, Kholodenko BN. The complexities and versatility of the RAS-to-ERK signalling system in normal and cancer cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;**58**:96–107.
 52. Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem*. 2015;**396**(8):831–848.
 53. Herrero A, Matallanas D, Kolch W. The spatio-temporal regulation of RAS signalling. *Biochem Soc Trans*. 2016;**44**(5):1517–1522.
 54. Tajan M, de Rocca Serra A, Valer P, Edouard T, Yart A. SHP2 sails from physiology to pathology. *Eur J Med Genet*. 2015;**58**(10):509–525.
 55. Jiang ER, Galperin E. The function of Shoc2: a scaffold and beyond. *Commun Integr Biol*. 2016;**9**(4):e1188241.
 56. Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Harata T, Orami H, Aiba A, Katsuki M. K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene*. 1997;**15**(10):1151–1159.
 57. Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;**100**(22):12759–12764.
 58. Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells*. 2003;**8**(11):847–856.
 59. Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, Shen R, Rossi DJ, Shalaby F, Feng GS, Pawson T. Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J*. 1997;**16**(9):2352–2364.
 60. Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, Rousseau S, Huot J, Landry J, Jeanotte L, Charron J. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol*. 1999;**9**(7):369–376.
 61. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, Zimmer A. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet*. 1997;**16**(3):293–297.
 62. Buscà R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK1 and ERK2 Map kinases: specific roles or functional redundancy? *Front Cell Dev Biol*. 2016;**4**:53.
 63. Dorard C, Vuack G, Baccarini M. Deciphering the RAS/ERK pathway in vivo. *Biochem Soc Trans*. 2017;**45**(1):27–36.
 64. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;**16**(1):103–119.
 65. Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*. 2010;**661**:3–38.
 66. Lawan A, Bennett AM. Mitogen-activated protein kinase regulation in hepatic metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;**28**(12):868–878.
 67. Sidarala V, Kowluru A. The regulatory roles of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in health and diabetes: lessons learned from the pancreatic β -cell. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2017;**10**(2):76–84.
 68. Ralmouini K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes*. 2009;**58**(3):536–542.
 69. Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, Feng GS. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;**101**(45):16064–16069.
 70. He Z, Zhang SS, Meng Q, Li S, Zhu HH, Raquil MA, Alderson N, Zhang H, Wu J, Rui L, Cai D, Feng GS. Shp2 controls female body weight and energy balance by integrating leptin and estrogen signals. *Mol Cell Biol*. 2012;**32**(10):1867–1878.

71. Boucher J, Kleinidders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;6(1):a009191.
72. Matsuo K, Delibegovic M, Matsuo L, Nagata N, Liu S, Bettaieb A, Xi Y, Araki K, Yang W, Kahn BB, Neel BG, Haj FG. Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J Biol Chem*. 2010;285(51):39750–39758.
73. Lee SJ, Pfluger PT, Kim JY, Nogueiras R, Duran A, Pagès G, Pouyssegur J, Tschöp MH, Diaz-Meco MT, Moscat J. A functional role for the p67-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep*. 2010;11(3):226–232.
74. Jager J, Corcelle V, Grémeaux T, Laurent K, Waget A, Pagès G, Binétruy B, Le Marchand-Brustel Y, Buzelin R, Bosé E, Tanri JF. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia*. 2011;54(1):180–189.
75. Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Proc M, Dani C, Hofman P, Pagès G, Pouyssegur J, Le Marchand-Brustel Y, Binétruy B. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*. 2005;54(2):402–411.
76. Banks AS, McAllister FE, Camporez JP, Zushin PJ, Jurczak MJ, Laznik-Bogoslavski D, Shulman GI, Gygi SP, Spiegelman BM. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature*. 2015;517(7534):391–395.
77. Zhang W, Thompson BJ, Hietakangas V, Cohen SM. MAPK/ERK signaling regulates insulin sensitivity to control glucose metabolism in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2011;7(12):e1002429.
78. Princen F, Bard E, Sheikh F, Zhang SS, Wang J, Zago WM, Wu D, Trelles RD, Bailly-Maitre B, Kahn CR, Chen Y, Reed JC, Tong CG, Mercola M, Chen J, Feng GS. Deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in muscle leads to dilated cardiomyopathy, insulin resistance, and premature death. *Mol Cell Biol*. 2009;29(2):378–388.
79. De Rocca Serra-Nédélec A, Edouard T, Tréguer K, Tajan M, Araki T, Dance M, Mus M, Montagner A, Tauber M, Salles JP, Valet P, Neel BG, Raynal P, Yart A. Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor 1 release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(11):4257–4262.
80. Zhong J. RAS and downstream RAF-MEK and PI3K-AKT signaling in neuronal development, function and dysfunction. *Biol Chem*. 2016;397(3):215–222.
81. He Z, Zhu HH, Bauler TJ, Wang J, Ciaraldi T, Alderson N, Li S, Raquil MA, Ji K, Wang S, Shao J, Henry RR, King PD, Feng GS. Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(1):E79–E88.
82. Rydén M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P. Targets for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(1):168–175.
83. Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, Patel S, Souza SC, Roth RA, Kraemer FB. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(48):45456–45461.
84. Zhang SS, Hao E, Yu J, Liu W, Wang J, Levine F, Feng GS. Coordinated regulation by Shp2 tyrosine phosphatase of signaling events controlling insulin biosynthesis in pancreatic beta-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(18):7531–7536.
85. Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*. 2009;324(5929):938–941.
86. Hu X, Tang Z, Li Y, Liu W, Zhang S, Wang B, Tian Y, Zhao Y, Ran H, Liu W, Feng GS, Shuai J, Wang H, Lu Z. Deletion of the tyrosine phosphatase Shp2 in Sertoli cells causes infertility in mice. *Sci Rep*. 2015;5(1):12982.
87. Cox AD, Fesk SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):828–851.
88. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, Grabocka E, Nofal M, Drebin JA, Thompson CB, Rabinowitz JD, Metallo CM, Vander Heiden MG, Bar-Sagi D. Macropinositosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*. 2013;497(7451):633–637.
89. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, Collier HA, Dipalola RS, Gelinis C, Rabinowitz JD, White E. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2011;25(5):460–470.
90. Son J, Lysiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferrone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang Y, Fleming JB, Bardeesy N, Asara JM, Haigis MC, DePinho RA, Cantley LC, Kimmelman AC. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013;496(7443):101–105.
91. White E. Exploiting the bad eating habits of Ras-driven cancers. *Genes Dev*. 2013;27(19):2065–2071.
92. Ying H, Kimmelman AC, Lysiotis CA, Hua S, Chu CC, Fletcher-Sanankone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Colloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik JH, Lim C, Guimarães AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin L, Cantley LC, DePinho RA. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*. 2012;149(3):656–670.
93. Tidyman WE, Rauen KA. Expansion of the RASopathies. *Curr Genet Med Rep*. 2016;4(3):57–64.
94. Johnston JJ, van der Smagt JJ, Rosenfeld JA, Pagnamenta AT, Alswaid A, Baker EH, Blair E, Borck G, Brinkmann J, Craigen W, Dung VC, Emrick L, Everman DB, van Gassen KL, Gulsuner S, Harr MH, Jain M, Kuechler A, Leppig KA, McDonald-McGinn DM, Can NTB, Peleg A, Roeder ER, Rogers RC, Sagi-Dain L, Sapp JC, Schaffer AA, Schanze D, Stewart H, Taylor JC, Verbeek NE, Walkiewicz MA, Zackai EH, Zweier C. Members of the Undiagnosed Diseases Network. Zenker M, Lee B, Biesecker LG. Autosomal recessive Noonan syndrome associated with biallelic LZTR1 variants [published online ahead of print February 22, 2018]. *Genet Med*. doi: 10.1038/gim.2017.249.
95. Tidyman WE, Rauen KA. Pathogenesis of the RASopathies. *Hum Mol Genet*. 2016;25(R2):R123–R132.
96. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, Scioletti AP, Esposito G, Cordeddu V, Lepri F, Petrangeli V, Dentici ML, Mancini GM, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Marino B, Ferrero GB, Silengo MC, Memo L, Stanzial F, Faravelli F, Stuppia L, Puxeddu E, Gelb BD, Dallapiccola B, Tartaglia M. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat*. 2009;30(4):695–702.
97. Higgins EM, Bos JM, Mason-Suares H, Tester DJ, Ackerman JP, MacRae CA, Sol-Church K, Gripp KW, Urrutia R, Ackerman MJ. Elucidation of MRAS-mediated Noonan syndrome with cardiac hypertrophy. *JCI Insight*. 2017;2(5):e91225.
98. Kouz K, Lissewski C, Spranger S, Mitter D, Riess A, Lopez-Gonzalez V, Luttgens S, Aydin H, von Demmling F, Evers C, Hahn A, Hempel M, Issa U, Kahler AK, Lieb A, Villavicencio-Lorini P, Ballesta-Martinez MJ, Nampoothiri S, Owens-Raedler A, Puchmajerova A, Satanovskij R, Seidel H, Unkelbach S, Zabel B, Kutsche K, Zenker M. Genotype and phenotype in patients with Noonan syndrome and a RIT1 mutation. *Genet Med*. 2016;18(12):1226–1234.
99. Yanuta M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto M, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hosokaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mira A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, Garcia-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Hum Genet*. 2016;135(2):209–222.
100. 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(6):1029–1035.
101. Jhang WK, Choi JH, Lee BH, Kim GH, Yoo HW. Cardiac manifestations and associations with gene mutations in patients diagnosed with RASopathies. *Pediatr Cardiol*. 2016;37(8):1539–1547.
102. Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, Cordeddu V, Williams BJ, Dentici ML, Caputo V, Venanzi S, Bonaguro M, Kavamura I, Faienza MF, Pilotta A, Stanzial F, Faravelli F, Gabrielli O, Marino B, Neri G, Silengo MC, Ferrero GB, Torrente I, Selicorni A, Mazzanti L, Digilio MC, Zampino G, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat*. 2011;32(7):760–772.
103. Cordeddu V, Yin JC, Gunnarsson C, Virtanen C, Drunat S, Lepri F, De Luca A, Rossi C, Ciolfi A, Pugh TJ, Bruxelles A, Priest JR, Pennacchio LA, Lu Z, Danesh A, Quevedo R, Hamid A, Martinelli S, Pantaleoni F, Gnazzo M, Daniele P, Lissewski C, Bocchinfuso G, Stella L, Odent S, Philip N, Faivre L, Vickova M, Seemanova E, Digilio C, Zenker M, Zampino G, Verloes A, Dallapiccola B, Roberts AE, Cavé H, Gelb BD, Neel BG, Tartaglia M. Activating mutations affecting the Dbl homology domain of SOS2 cause Noonan syndrome. *Hum Mutat*. 2015;36(11):1080–1087.
104. Martinelli S, Stellacci E, Pannone L, D'Agostino D, Consoli F, Lissewski C, Silvano M, Cencelli G, Lepri F, Maitz S, Pauli S, Rauch A, Zampino G, Selicorni A, Melançon S, Digilio MC, Gelb BD, De Luca A, Dallapiccola B, Zenker M, Tartaglia M. Molecular diversity and associated phenotypic spectrum of germline CBL mutations. *Hum Mutat*. 2015;36(8):787–796.
105. Cavé H, Caye A, Ghedira N, Capri Y, Pouvreau N, Fillot N, Trimouille A, Vignal C, Fenneteau O, Alembik Y, Alessandri JL, Blanchet P, Boute O, Bouvagnet P, David A, Dieux Coeslier A, Doray B, Dulac O, Drouin-Garraud V, Gérard M, Héron D, Isidor B, Lacombe D, Lyonnet S, Perrin L, Rio M, Roume J, Sauvion S, Toutain A, Vincent-Delorme C, Willems M, Baumann C, Verloes A. Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome with possible juvenile myelomonocytic leukemia but are not involved in

- acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Hum Genet.* 2016;**24**(8):1124–1131.
106. Denoci ML, Sarkozy A, Pantaleoni F, Carra C, Lepri F, Ferese R, Cordeddu V, Martinelli S, Briuglia S, Diglio MC, Zampino G, Tartaglia M, Dallapiccola B. Spectrum of MEK1 and MEK2 gene mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome and genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet.* 2009;**17**(6):733–740.
 107. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, Cecchetti S, Cardinale A, Martin J, Schackwitz W, Lipzen A, Zampino G, Mazzanti L, Diglio MC, Martinelli S, Flex E, Lepri F, Bartholdi D, Kutsche K, Ferrero GB, Anichini C, Selicorni A, Rossi C, Tenconi R, Zenker M, Merlo D, Dallapiccola B, Iyengar R, Bazziacchi P, Cuih RD, Tartaglia M. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-mristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 2009;**41**(9):1022–1026.
 108. Hernández-Porras I, Guerra C. Modeling RASopathies with genetically modified mouse models. *Methods Mol Biol.* 2017;**1487**:379–408.
 109. Jindal GA, Goyal Y, Burdine RD, Rauen KA, Shvartsman SY. RASopathies: unraveling mechanisms with animal models. *Dis Model Mech.* 2015;**8**(8):769–782.
 110. Gutch MJ, Flint AJ, Keller J, Tonks NK, Hengartner MO. The *Caenorhabditis elegans* SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oogenesis and vulval development. *Genes Dev.* 1998;**12**(4):571–585.
 111. Beitel GJ, Clark SG, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* ras gene *let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature.* 1990;**348**(6301):503–509.
 112. Wu Y, Han M, Guan KL. MEK 2, a *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, functions in Ras-mediated vulval induction and other developmental events. *Genes Dev.* 1995;**9**(6):742–755.
 113. Pagani MR, Oishi K, Gelb BD, Zhong Y. The phosphatase Shp2 regulates the spacing effect for long-term memory induction. *Cell.* 2009;**139**(1):186–198.
 114. Oishi K, Gaengel K, Krishnamoorthy S, Kamiya K, Kim IK, Ying H, Weber U, Perkins LA, Tartaglia M, Mlodzik M, Pick L, Gelb BD. Transgenic *Drosophila* models of Noonan syndrome causing PTPN11 gain-of-function mutations. *Hum Mol Genet.* 2006;**15**(4):543–553.
 115. Oishi K, Zhang H, Gault WJ, Wang CJ, Tan CC, Kim IK, Ying H, Rahman T, Pica N, Tartaglia M, Mlodzik M, Gelb BD. Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during *Drosophila* development. *Hum Mol Genet.* 2009;**18**(1):193–201.
 116. Gafuik C, Steller H. A gain-of-function germline mutation in *Drosophila ras1* affects apoptosis and cell fate during development. *PLoS One.* 2011;**6**(8):e23535.
 117. Yu L, Daniels J, Glaser AE, Wolf MJ. Raf-mediated cardiac hypertrophy in adult *Drosophila*. *Dis Model Mech.* 2013;**6**(4):964–976.
 118. The I, Hannigan GE, Cowley GS, Reginald S, Zhong Y, Gusella JF, Hariharan IK, Bernards A. Rescue of a *Drosophila NF1* mutant phenotype by protein kinase A. *Science.* 1997;**276**(5313):791–794.
 119. Williams JA, Su HS, Bernards A, Field J, Sehgal A. A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science.* 2001;**293**(5538):2251–2256.
 120. Tong JJ, Schriener SE, McCleary D, Day BJ, Wallace DC. Life extension through neurofibromin mitochondrial regulation and antioxidant therapy for neurofibromatosis-1 in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2007;**39**(4):476–485.
 121. Buchanan ME, Davis RL. A distinct set of *Drosophila* brain neurons required for neurofibromatosis type 1-dependent learning and memory. *J Neurosci.* 2010;**30**(30):10135–10143.
 122. Guo HF, Tong J, Hannan F, Luo L, Zhong Y. A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature.* 2000;**403**(6772):895–898.
 123. Ho IS, Hannan F, Guo HF, Hakker I, Zhong Y. Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J Neurosci.* 2007;**27**(25):6857–6857.
 124. Walker JA, Gouzi JY, Long JB, Huang S, Maher RC, Xia H, Khalil K, Ray A, Van Vactor D, Bernards R, Bernards A. Genetic and functional studies implicate synaptic overgrowth and ring gland cAMP/PKA signaling defects in the *Drosophila melanogaster* neurofibromatosis-1 growth deficiency. *PLoS Genet.* 2013;**9**(11):e1003958.
 125. Walker JA, Tchoudakova AV, McKenney PT, Brill S, Wu D, Cowley GS, Hariharan IK, Bernards A. Reduced growth of *Drosophila* neurofibromatosis 1 mutants reflects a non-cell-autonomous requirement for GTPase-activating protein activity in larval neurons. *Genes Dev.* 2006;**20**(23):3311–3323.
 126. Langdon YC, Goetz SC, Berg AE, Swanik JT, Conlon FL. Shp-2 is required for the maintenance of cardiac progenitors. *Development.* 2007;**134**(22):4119–4130.
 127. LaBonne C, Whitman M. Mesoderm induction by activin requires FGF-mediated intracellular signals. *Development.* 1994;**120**(2):463–472.
 128. Goroh Y, Masuyama N, Suzuki A, Ueno N, Nishida E. Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *EMBO J.* 1995;**14**(11):2491–2498.
 129. Umbhauer M, Marshall CJ, Mason CS, Old RW, Smith JC. Mesoderm induction in *Xenopus* caused by activation of MAP kinase. *Nature.* 1995;**376**(6535):58–62.
 130. Bonetti M, Paardekooper Overman J, Tessadori F, Noël E, Bakkers J, den Hertog J, Noonan and LEOPARD syndrome Shp2 variants induce heart displacement defects in zebrafish. *Development.* 2014;**141**(9):1961–1970.
 131. Jopling C, van Geemen D, den Hertog J. Shp2 knockdown and Noonan/LEOPARD mutant Shp2-induced gastrulation defects. *PLoS Genet.* 2007;**3**(12):e225.
 132. Runtuwene V, van Eekelen M, Overvoorde J, Rehmann H, Yntema HG, Nillesen WM, van Haeringen A, van der Burgt I, Burgering B, den Hertog J. Noonan syndrome gain-of-function mutations in NRAS cause zebrafish gastrulation defects. *Dis Model Mech.* 2011;**4**(3):393–399.
 133. Razaque MA, Komoike Y, Nishizawa T, Inai K, Furutani M, Higashinakagawa T, Matsuoka R. Characterization of a novel KRAS mutation identified in Noonan syndrome. *Am J Med Genet A.* 2012;**158A**(3):524–532.
 134. Stewart RA, Sanda T, Widlund HR, Zhu S, Swanson KD, Hurley AD, Bentires-Alj M, Fisher DE, Kontaridis MI, Look AT, Neel BG. Phosphatase-dependent and -independent functions of Shp2 in neural crest cells underlie LEOPARD syndrome pathogenesis. *Dev Cell.* 2010;**18**(5):750–762.
 135. Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H, Mochizuki N. Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene.* 2013;**32**(45):5292–5301.
 136. Paardekooper Overman J, Yi JS, Bonetti M, Soulsby M, Preisinger C, Stokes MP, Hui L, Silva JC, Overvoorde J, Giansanti P, Heck AJ, Kontaridis MI, den Hertog J, Bennett AM. PZR coordinates Shp2 Noonan and LEOPARD syndrome signaling in zebrafish and mice. *Mol Cell Biol.* 2014;**34**(15):2874–2889.
 137. Santonella C, Dellorain G, Pezzimenti F, Kawakami K, Lanfrancone L, d'Adda di Fagnagna F, Mione M. Expression of H-RASV12 in a zebrafish model of Costello syndrome causes cellular senescence in adult proliferating cells. *Dis Model Mech.* 2009;**2**(1–2):56–67.
 138. Anastasaki C, Estrup AI, Marris R, Rauen KA, Parron EE. Kinase-activating and kinase-impaired cardio-facio-cutaneous syndrome alleles have activity during zebrafish development and are sensitive to small molecule inhibitors. *Hum Mol Genet.* 2009;**18**(14):2543–2554.
 139. Padmanabhan A, Lee JS, Ismat FA, Lu MM, Lawson ND, Kanki JP, Look AT, Epstein JA. Cardiac and vascular functions of the zebrafish orthologues of the type 1 neurofibromatosis gene NF1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;**106**(52):22305–22310.
 140. Shin J, Padmanabhan A, de Groh ED, Lee JS, Haidar S, Dahlberg S, Guo F, He S, Wolman MA, Granato M, Lawson ND, Wolfe SA, Kim SH, Solnica-Krezel L, Kanki JP, Uigon KL, Epstein JA, Look AT. Zebrafish neurofibromatosis type 1 genes have redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. *Dis Model Mech.* 2012;**5**(6):881–894.
 141. Wolman MA, de Groh ED, McBride SM, Jongens TA, Granato M, Epstein JA. Modulation of cAMP and ras signaling pathways improves distinct behavioral deficits in a zebrafish model of neurofibromatosis type 1. *Cell Reports.* 2014;**8**(5):1265–1270.
 142. Araki T, Nawa H, Neel BG. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem.* 2003;**278**(43):41677–41684.
 143. Araki T, Chan G, Newbigging S, Morikawa L, Bronson RT, Neel BG. Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;**106**(12):4736–4741.
 144. Altmüller F, Pothula S, Annamneedi A, Nakhaei-Rad S, Montenegro-Venegas C, Pina-Fernández E, Marini C, Santos M, Schanze D, Montag D, Ahmadian MR, Stork O, Zenker M, Fejtova A. Aberrant neuronal activity-induced signaling and gene expression in a mouse model of RASopathy [published correction appears in *PLoS Genet.* 2017;**13**(6):e1006843]. *PLoS Genet.* 2017;**13**(3):e1006684.
 145. Nakamura T, Colbert M, Krenz M, Molkentin JD, Hahn HS, Dorn GW II, Robbins J. Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *J Clin Invest.* 2007;**117**(8):2123–2132.
 146. Krenz M, Gulick J, Osinska HE, Colbert MC, Molkentin JD, Robbins J. Role of ERK1/2 signaling in congenital valve malformations in Noonan syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;**105**(48):18930–18935.
 147. Chen PC, Wakimoto H, Conner D, Araki T, Yuan T, Roberts A, Seidman C, Bronson R, Neel B, Seidman JG, Kucherlapati R. Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated Sosl mutation. *J Clin Invest.* 2010;**120**(12):4353–4365.
 148. Wu X, Simpson J, Hong JH, Kim KH, Thavarajah NK, Backx PH, Neel BG, Araki T. MEK-ERK pathway

- modulation ameliorates disease phenotypes in a mouse model of Noonan syndrome associated with the Raf1(L613V) mutation. *J Clin Invest*. 2011;**121**(3):1009–1025.
149. Yin JC, Platt M, Tian X, Wu X, Backx PH, Simpson JA, Araki T, Neel BG. Cellular interplay via cytokine hierarchy causes pathological cardiac hypertrophy in RAF1-mutant Noonan syndrome. *Nat Commun*. 2012;**3**:15518.
150. Hernández-Porrás I, Fabbiano S, Schullmacher AJ, Aicher A, Cañamero M, Cámara JA, Cussó L, Desco M, Heesch C, Mulero F, Bustelo XR, Guerra C, Barbacid M. K-RasV19I recapitulates Noonan syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;**111**(46):16395–16400.
151. Marin TA, Keith K, Davies R, Conner DA, Caha P, Kalatzidis D, Wu X, Lauriol J, Wang B, Bauer M, Bronson R, Franchini KC, Neel BG, Kontaridis ML. Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *J Clin Invest*. 2011;**121**(3):1026–1043.
152. Lauriol J, Cabrera JR, Roy A, Keith K, Hough SM, Damilano F, Wang B, Segarra GC, Flessa ME, Miller LE, Das S, Bronson R, Lee KH, Kontaridis ML. Developmental SHP2 dysfunction underlies cardiac hypertrophy in Noonan syndrome with multiple lentigines. *J Clin Invest*. 2016;**126**(8):2989–3005.
153. Schramm C, Fine DM, Edwards MA, Reeb AN, Krenz M. The PTPN11 loss-of-function mutation Q510E-Shp2 causes hypertrophic cardiomyopathy by dysregulating mTOR signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;**302**(1):H231–H243.
154. Edwards MA, Crombie K, Schramm C, Krenz M. The Q510E mutation in Shp2 perturbs heart valve development by increasing cell migration. *J Appl Physiol* (1985). 2015;**118**(1):124–131.
155. Schuhmacher AJ, Guerra C, Sauzeau V, Cañamero M, Bustelo XR, Barbacid M. A mouse model for Costello syndrome reveals an Ang II-mediated hypertensive condition. *J Clin Invest*. 2008;**118**(6):2169–2179.
156. Chen X, Mitsutake N, LaPerle K, Akeno N, Zanzonico P, Longo VA, Mitsutake S, Kimura ET, Geiger H, Santos E, Wendel HG, Franco A, Knauf JA, Fagin JA. Endogenous expression of Hras(G12V) induces developmental defects and neoplasms with copy number imbalances of the oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;**106**(19):7979–7984.
157. Urošević J, Sauzeau V, Soto-Montenegro ML, Reig S, Desco M, Wright EM, Cañamero M, Mulero F, Ortega S, Bustelo XR, Barbacid M. Constitutive activation of B-Raf in the mouse germ line provides a model for human cardio-facio-cutaneous syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;**108**(12):5015–5020.
158. Andreadi C, Cheung LK, Giblett S, Patel B, Jin H, Mercer K, Kamata T, Lee P, Williams A, McMahon M, Marais R, Pritchard C. The intermediate-activity (L597V)BRAF mutant acts as an epistatic modifier of oncogenic RAS by enhancing signaling through the RAF/MEK/ERK pathway. *Genes Dev*. 2012;**26**(17):1945–1958.
159. Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet*. 2014;**23**(24):6553–6566.
160. Aoidi R, Houde N, Landry-Truchon K, Holter M, Jacquet K, Charron L, Krishnaswami SR, Yu BD, Rauen KA, Bisson N, Newbern J, Charron J. Mek1^{Y130C} mice recapitulate aspects of human cardio-facio-cutaneous syndrome. *Dis Model Mech*. 2018;**11**(3):dmm031278.
161. Branigan CL, Perkins AS, Vogel KS, Rarner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev*. 1994;**8**(9):1019–1029.
162. Jacks T, Shiit TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernardis A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet*. 1994;**7**(3):353–361.
163. Gitler AD, Zhu Y, Ismat FA, Lu MM, Yamauchi Y, Parada LF, Epstein JA. Nf1 has an essential role in endothelial cells. *Nat Genet*. 2003;**33**(1):75–79.
164. Xu J, Ismat FA, Wang T, Lu MM, Antonucci N, Epstein JA. Cardiomyocyte-specific loss of neurofibromin promotes cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circ Res*. 2009;**105**(3):304–311.
165. Wang W, Nyman JS, Ono K, Stevenson DA, Yang X, Elefteriou F. Mice lacking Nf1 in osteochondroprogenitor cells display skeletal dysplasia similar to patients with neurofibromatosis type I. *Hum Mol Genet*. 2011;**20**(20):3910–3924.
166. Zhu Y, Romero MI, Ghosh P, Ye Z, Charnay P, Rushing EJ, Marth JD, Parada LF. Ablation of Nf1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev*. 2001;**15**(7):859–876.
167. Wu J, Williams JP, Rizvi TA, Kordich JJ, Witte D, Meijer D, Stemmer-Rachamimov AO, Cancelas JA, Ratner N. Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. *Cancer Cell*. 2008;**13**(2):105–116.
168. Chang T, Krisman K, Theobald EH, Xu J, Akutagawa J, Lauchle JO, Kogan S, Braun BS, Shannon K. Sustained MEK inhibition abrogates myeloproliferative disease in Nf1 mutant mice. *J Clin Invest*. 2013;**123**(1):335–339.
169. Inoue H, Kato R, Fukuyama S, Nonami A, Taniguchi K, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M, Matsumura M, Kubo M, Ishikawa F, Moon BC, Takatsu K, Nakanishi Y, Yoshimura A. Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J Exp Med*. 2005;**201**(1):73–82.
170. Pannone L, Bocchinfuso G, Flex E, Rossi C, Baldassarre G, Lisevski C, Pantaleoni F, Consoli F, Lepri F, Magliozzi M, Anselmi M, Delle Vigne S, Sorge G, Karaer K, Cuturilo G, Sartorio A, Tinschert S, Accadia M, Digilio MC, Zampino G, De Luca A, Cavé H, Zenker M, Gelb BD, Dallapiccola B, Stella L, Ferrero GB, Martinelli S, Tartaglia M. Structural, functional, and clinical characterization of a novel PTPN11 mutation cluster underlying Noonan syndrome. *Hum Mutat*. 2017;**38**(4):451–459.
171. Araki T, Mohi MG, Ismat FA, Bronson RT, Williams IR, Kutok JL, Yang W, Pao LJ, Gilliland DG, Epstein JA, Neel BG. Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat Med*. 2004;**10**(8):849–857.
172. Eminaga S, Bennett AM. Noonan syndrome-associated SHP-2/Ptpn11 mutants enhance Src-Palpa and PZR tyrosyl phosphorylation and promote adhesion-mediated ERK activation. *J Biol Chem*. 2008;**283**(22):15328–15338.
173. Fragale A, Tartaglia M, Wu J, Gelb BD. Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation. *Hum Mutat*. 2004;**23**(3):267–277.
174. Krenz M, Yutzey KE, Robbins J. Noonan syndrome mutation Q79R in Shp2 increases proliferation of valve primordia mesenchymal cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling. *Circ Res*. 2005;**97**(8):813–820.
175. Edouard T, Combier JP, Nédélec A, Bel-Vialar S, Métrich M, Conte-Auriol F, Lyonnet S, Parfait B, Tauber M, Salles JP, Lezoalch F, Yart A, Raynal P. Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase β signaling. *Mol Cell Biol*. 2010;**30**(10):2498–2507.
176. Hanna N, Montagner A, Lee WH, Miteva M, Vidal M, Vidaud M, Parfait B, Raynal P. Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome consequences for PI3K binding on Gab1. *FEBS Lett*. 2006;**580**(10):2477–2487.
177. Kontaridis ML, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem*. 2006;**281**(10):6785–6792.
178. Martinelli S, Torroni P, Tinti M, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Grottesi A, Ceccarini M, Palleschi A, Cesareni G, Castagnoli L, Petrucci TC, Gelb BD, Tartaglia M. Diverse driving forces underlie the invariant occurrence of the T42A, E139D, I282V and T468M SHP2 amino acid substitutions causing Noonan and LEOPARD syndromes. *Hum Mol Genet*. 2008;**17**(13):2018–2029.
179. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, Zampino G, Burgi Iv, Palleschi A, Petrucci TC, Sorcini M, Schoch C, Foa R, Emanuel PD, Gelb BD. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet*. 2006;**78**(2):279–290.
180. Yu ZH, Xu J, Walls CD, Chen L, Zhang S, Zhang R, Wu L, Wang L, Liu S, Zhang ZY. Structural and mechanistic insights into LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutations. *J Biol Chem*. 2013;**288**(15):10472–10482.
181. Qiu W, Wang X, Romanov V, Hutchinson A, Lin A, Ruzanov M, Battaile KP, Pai EF, Neel BG, Chirgadze NY. Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11). *BMC Struct Biol*. 2014;**14**:10.
182. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelmann IJ, Chang B, Waghray A, Su J, Pardo S, Lichtenbelt KD, Tartaglia M, Gelb BD, Lemischka IR. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*. 2010;**465**(7299):808–812.
183. Tumurkhuu M, Saichoh M, Sato A, Takahashi K, Mimaki M, Takita J, Takeshita K, Hama T, Oka A, Mizuguchi M. Comprehensive genetic analysis of overlapping syndromes of RAS/RAF/MEK/ERK pathway. *Pediatr Int*. 2010;**52**(4):557–562.
184. Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, Li L, Yassin Y, Tamburino AM, Neel BG, Kucherlapati RS. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2007;**39**(1):70–74.
185. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, Pandit B, Oishi K, Martinelli S, Schackwitz W, Ustaszewska A, Martin J, Bristow J, Carta C, Lepri F, Neri C, Vasta I, Gibson K, Curry CJ, Siguero JP, Digilio MC, Zampino G, Dallapiccola B, Bar-Sagi D, Gelb BD. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome [published correction appears in *Nat Genet*. 2007;**39**(2):276]. *Nat Genet*. 2007;**39**(1):75–79.
186. Yamamoto GL, Agüena M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, Abramowicz A, Cristian I, Buscariilli M,

- Naslavsky MS, Malaquias AC, Zatz M, Bodamer O, Majewski J, Jorge AA, Pereira AC, Kim CA, Passos-Bueno MR, Bertola DR. Rare variants in *SOS2* and *LZTR1* are associated with Noonan syndrome. *J Med Genet*. 2015;**52**(6):413–421.
187. Tumiarkhuu M, Saitoh M, Takita J, Mizuno Y, Mizuguchi M. A novel *SOS1* mutation in Costello/CFC syndrome affects signaling in both RAS and PI3K pathways. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013;**33**(2):124–128.
188. Nakamura Y, Umeki N, Abe M, Sako Y. Mutation-specific mechanisms of hyperactivation of Noonan syndrome *SOS* molecules detected with single-molecule imaging in living cells. *Sci Rep*. 2017;**7**(1):14153.
189. Schreiber J, Gimbergren I A, Overwater I, Vaara TV, Steedhouder J, Schuhmacher AJ, Guerra C, Kushner SA, Jaarsma D, Elgersma Y. Mechanisms underlying cognitive deficits in a mouse model for Costello syndrome are distinct from other RASopathy mouse models. *Sci Rep*. 2017;**7**(1):1256.
190. Pantaleoni F, Lev D, Cirstea IC, Motta M, Lepri FR, Bottero L, Cecchetti S, Linger I, Paolacci S, Flex E, Novelli A, Carè A, Ahmadian MR, Stellacci E, Tartaglia M. Aberrant *HRAS* transcript processing underlies a distinctive phenotype within the RASopathy clinical spectrum. *Hum Mutat*. 2017;**38**(7):798–804.
191. Schubbert S, Bollag G, Lyubynska N, Nguyen H, Kratz CP, Zenker M, Niemeyer CM, Molven A, Shannon K. Biochemical and functional characterization of germ line *KRAS* mutations. *Mol Cell Biol*. 2007;**27**(22):7765–7770.
192. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE, Nguyen H, West B, Zhang KY, Siermans E, Rauch A, Niemeyer CM, Shannon K, Kratz CP. Germline *KRAS* mutations cause Noonan syndrome [published correction appears in *Nat Genet*. 2006;**38**(5):598]. *Nat Genet*. 2006;**38**(3):331–336.
193. Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, Roberts AE, Lepri F, Merbitz-Zahradnik T, König R, Kratz CP, Pantaleoni F, Dentici ML, Joshi VA, Kucherlapati RS, Mazzanti L, Mundlos S, Patton MA, Silengo MC, Rossi C, Zampino G, Digilio C, Stuppia L, Seemanova E, Pennacchio LA, Gelb BD, Dallapiccola B, Wittinghofer A, Ahmadian MR, Tartaglia M, Zenker M. A restricted spectrum of *NRAS* mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2010;**42**(1):27–29.
194. Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, Caye A, De Luca A, Lepri F, Dvorsky R, Pannone L, Paolacci S, Zhang SC, Fodale V, Bocchini G, Rossi C, Burkiit-Wright EM, Farrotti A, Stellacci E, Cecchetti S, Ferese R, Bottero L, Castro S, Fenneteau O, Brethon B, Sanchez M, Roberts AE, Yntema HG, Van Der Burgt I, Cianci P, Bondeson ML, Cristina Digilio M, Zampino G, Kerr B, Aoki Y, Loh ML, Palleschi A, Di Schiavi E, Carè A, Selicorni A, Dallapiccola B, Cirstea IC, Stella L, Zenker M, Gelb BD, Cavé H, Ahmadian MR, Tartaglia M. Activating mutations in *RRAS* underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukemogenesis. *Hum Mol Genet*. 2014;**23**(16):4315–4327.
195. Aoki Y, Nihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in *RIT1* cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet*. 2013;**93**(1):173–180.
196. Chen PC, Yin J, Yu HW, Yuan T, Fernandez M, Yung CK, Trijih QM, Peltekoova VD, Reid JG, Tworog-Dube E, Morgan MB, Muzny DM, Stein L, McPherson JD, Roberts AE, Gibbs RA, Neel BC, Kucherlapati R. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;**111**(31):11473–11478.
197. Wu X, Yin J, Simpson J, Kim KH, Gu S, Hong JH, Bayliss P, Backlund PH, Neel BC, Araki T. Increased *BRAF* heterodimerization is the common pathogenic mechanism for Noonan syndrome-associated *RAF1* mutants. *Mol Cell Biol*. 2012;**32**(19):3872–3890.
198. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*. 2006;**311**(5765):1287–1290.
199. Kobayashi T, Aoki Y, Nihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillissen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of *RAF1* in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat*. 2010;**31**(3):284–294.
200. Bromberg-White JL, Andersen NJ, Duesbery NS. MEK genomics in development and disease. *Brief Funct Genomics*. 2012;**11**(4):300–310.
201. Motta M, Chillemi G, Fodale V, Cecchetti S, Coppola S, Stripo S, Cordeudo V, Macioce P, Gelb BD, Tartaglia M. *SHOC2* subcellular shuttling requires the KEKE motif-rich region and N-terminal leucine-rich repeat domain and impacts on ERK signalling. *Hum Mol Genet*. 2016;**25**(17):3824–3835.
202. Rojnuangnit K, Xie J, Gomes A, Sharp A, Callens T, Chen Y, Liu Y, Cochran M, Abbott MA, Atkin J, Babovic-Vuksanovic D, Barnett CP, Crenshaw M, Bartholomew DW, Basel L, Bellus G, Ben-Shachar S, Bialer MG, Bick D, Blumberg B, Cortes F, David KL, Destree A, Duat-Rodriguez A, Earl D, Escobar L, Eswara M, Ezquieta B, Frayling IM, Frydman M, Gardner K, Gripp KW, Hernández-Chico C, Heyrman K, Ibrahim J, Janssens S, Keena BA, Llano-Rivas I, Leppig K, McDonald M, Misra VK, Mulbury J, Narayanan V, Orenstein N, Galvin-Parton P, Pedro H, Pivnick EK, Powell CM, Randolph L, Raskin S, Rosell J, Rubin K, Seashore M, Schaaf CP, Scheuerle A, Schultz M, Schorry E, Schnur R, Siqveland E, Tkachuk A, Tongsgard J, Upadhyaya M, Verma IC, Wallace S, Williams C, Zackai E, Zonana J, Lazaro C, Claes K, Korf B, Martin Y, Legius E, Messiaen L. High incidence of Noonan syndrome features including short stature and pulmonic stenosis in patients carrying *NF1* missense mutations affecting p.Arg1809: genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*. 2015;**36**(11):1052–1063.
203. Avalefi R, Qutob N, Emmanouel R, Kerem-Paz A, Madore J, Elkahoun A, Wilcott JS, Gartner JJ, Di Pizio A, Winograd-Katz S, Sindiri S, Rotkopf R, Dutton-Regester K, Johansson P, Pritchard AL, Waddell N, Hill VK, Lin JC, Hevroni Y, Rosenberg SA, Khan J, Ben-Dor S, Niv MY, Ulitsky I, Mann GJ, Scolyer RA, Hayward NK, Samuels Y. Recurrent inactivating *RASA2* mutations in melanoma. *Nat Genet*. 2015;**47**(12):1408–1410.
204. Lisowski C, Kant SC, Stark Z, Schanze I, Zenker M. Copy number variants including RAS pathway genes: how much RASopathy is in the phenotype? *Am J Med Genet A*. 2015;**167**(11):2685–2690.
205. Nakamura T, Gulick J, Pratt R, Robbins J. Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;**106**(36):15436–15441.
206. Dalin MG, Zou Z, Scham-Tang M, Safari R, Karlsson C, Bergh MO. Myocardial *KRAS*(G12D) expression does not cause cardiomyopathy in mice. *Cardiovasc Res*. 2014;**101**(2):229–235.
207. Ismat FA, Xu J, Lu MM, Epstein JA. The neurofibromin GAP-related domain rescues endothelial but not neural crest development in *Nf1* mice. *J Clin Invest*. 2006;**116**(9):2378–2384.
208. Lakkis MM, Epstein JA. Neurofibromin modulation of ras activity is required for normal endocardial-mesenchymal transformation in the developing heart. *Development*. 1998;**125**(22):4359–4367.
209. Anastasaki C, Rauen KA, Parron FF. Continuous low-level MEK inhibition ameliorates cardio-facio-cutaneous phenotypes in zebrafish. *Dis Model Mech*. 2012;**5**(4):546–552.
210. Nakamura T, Gulick J, Colbert MC, Robbins J. Protein tyrosine phosphatase activity in the neural crest is essential for normal heart and skull development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;**106**(27):11270–11275.
211. Tajan M, Perrin-Grandjean J, Beton N, Gennero I, Capilla F, Neel BC, Araki T, Valet P, Tauber M, Salles JP, Yart A, Edouard T. Noonan syndrome-causing *SHP2* mutants impair ERK-dependent chondrocyte differentiation during endochondral bone growth. *Hum Mol Genet*. 2018;**27**(13):2276–2289.
212. Wang W, Nyman JS, Moss HE, Gutierrez G, Mundy GR, Yang X, Eleftheriou F. Local low-dose lovastatin delivery improves the bone-healing defect caused by *NF1* loss of function in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2010;**25**(7):1658–1667.
213. Zhang W, Rhodes SD, Zhao L, He Y, Zhang Y, Shen Y, Yang D, Wu X, Li X, Yang X, Park SJ, Chen S, Turner C, Yang FC. Primary osteopathy of vertebrae in a neurofibromatosis type 1 murine model. *Bone*. 2011;**48**(6):1378–1387.
214. Rhodes SD, Wu X, He Y, Chen S, Yang H, Staser KW, Wang J, Zhang P, Jiang C, Yokota H, Dong R, Peng X, Yang X, Murthy S, Azhar M, Mohammad KS, Xu M, Guise TA, Yang FC. Hyperactive transforming growth factor- β 1 signaling potentiates skeletal defects in a neurofibromatosis type 1 mouse model. *J Bone Miner Res*. 2013;**28**(12):2476–2489.
215. Sharma R, Wu X, Rhodes SD, Chen S, He Y, Yuan J, Li J, Yang X, Li X, Jiang L, Kim ET, Stevenson DA, Viskochil D, Xu M, Yang FC. Hyperactive Ras/MAPK signaling is critical for tibial nonunion fracture in neurofibromin-deficient mice. *Hum Mol Genet*. 2013;**22**(23):4818–4828.
216. Rhodes SD, Zhang W, Yang D, Yang H, Chen S, Wu X, Li X, Yang X, Mohammad KS, Guise TA, Bergner AL, Stevenson DA, Yang FC. Dystrophic spinal deformities in a neurofibromatosis type 1 murine model. *PLoS One*. 2015;**10**(3):e0119093.
217. Costa RM, Federov NB, Kogan JH, Murphy GG, Stern J, Olinio M, Kucherlapati R, Jacks T, Silva AJ. Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature*. 2002;**415**(6871):526–530.
218. Li W, Cui Y, Kushner SA, Brown RA, Jentsch JD, Frankland PW, Cannon TD, Silva AJ. The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol*. 2005;**15**(21):1961–1967.
219. Wang Y, Kim E, Wang X, Novitch BG, Yoshikawa K, Chang LS, Zhu Y. ERK inhibition rescues defects in fate specification of *Nf1*-deficient neural progenitors and brain abnormalities. *Cell*. 2012;**150**(4):816–830.

220. Lee YS, Ehninger D, Zhou M, Oh JY, Kang M, Kwak C, Ryu HH, Butz D, Araki T, Cai Y, Balaji J, Sano Y, Nam CI, Kim HK, Kaang RK, Burger C, Neel BG, Silva AJ. Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nat Neurosci*. 2014;17(12):1736–1743.
221. Denayer E, Ahmed T, Brems H, Van Woerden G, Borgesius NZ, Callaerts-Vegh Z, Yoshimura A, Hartmann D, Elgersma Y, D'Hooghe R, Legius E, Balschun D. Spred1 is required for synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning. *J Neurosci*. 2008;28(53):14443–14449.
222. Krab LC, de Goede-Bolder A, Aarsen FK, Pluijm SM, Bouman MJ, van der Geest JN, Lequin M, Catsman CE, Arts WF, Kushner SA, Silva AJ, de Zeeuw CL, Moll HA, Elgersma Y. Effect of simvastatin on cognitive functioning in children with neurofibromatosis type 1: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;300(3):287–294.
223. van der Vaart T, Plasschaert E, Rietman AB, Renard M, Oostenbrink R, Vogels A, de Wit MC, Descheemaeker MJ, Vergouwe Y, Catsman-Berrevorts CE, Legius E, Elgersma Y, Moll HA. Simvastatin for cognitive deficits and behavioural problems in patients with neurofibromatosis type 1 (NF1-SIMCODA): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2013;12(11):1076–1083.
224. Mainberger F, Jung NH, Zenker M, Wahlländer U, Freudenberg L, Langer S, Berweck S, Winkler T, Straube A, Heinen F, Granström S, Mautner VF, Lidzba K, Mall V. Lovastatin improves impaired synaptic plasticity and phasic alertness in patients with neurofibromatosis type 1. *BMC Neurol*. 2013;13(1):131.
225. Zhang W, Chan RJ, Chen H, Yang Z, He Y, Zhang X, Luo Y, Yin F, Moh A, Miller LC, Payne RM, Zhang ZY, Fu XY, Shou W. Negative regulation of Stat3 by activating PTPN11 mutants contributes to the pathogenesis of Noonan syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *J Biol Chem*. 2009;284(33):22353–22363.
226. Jessen WJ, Miller SJ, Jousma E, Wu J, Rizvi TA, Brundage ME, Eaves D, Widemann B, Kim MO, Dombi E, Sabo J, Hardiman Dudley A, Niwa-Kawakita M, Page GP, Giovannini M, Aronow BJ, Cripe TP, Ratner N. MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. *J Clin Invest*. 2013;123(1):340–347.
227. Watson AL, Anderson LK, Greeley AD, Keng VW, Rahmann EP, Hallford AL, Powell NM, Collins MH, Rizvi T, Moertel CL, Ratner N, Largaespada DA. Co-targeting the MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in two genetically engineered mouse models of schwann cell tumors reduces tumor grade and multiplicity. *Oncotarget*. 2014;5(6):1502–1514.
228. Wang J, Chandrasekhar V, Abbadesse G, Yu Y, Schwartz B, Kontaridis MI. In vivo efficacy of the AKT inhibitor ARQ 092 in Noonan syndrome with multiple lentiginos-associated hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178905.
229. Rosenberger G, Meien S, Kutsche K. Oncogenic HRAS mutations cause prolonged PI3K signaling in response to epidermal growth factor in fibroblasts of patients with Costello syndrome. *Hum Mutat*. 2009;30(3):352–362.
230. Gremer L, De Luca A, Merbitz-Zahradnik T, Dallapiccola B, Morlot S, Tartaglia M, Kutsche K, Ahmadian MR, Rosenberger G. Duplication of Glu37 in the switch 1 region of HRAS impairs effector/GAP binding and underlies Costello syndrome by promoting enhanced growth factor-dependent MAPK and AKT activation. *Hum Mol Genet*. 2010;19(5):790–802.
231. Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Gutmann DH. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res*. 2005;65(7):2755–2760.
232. Roy R, Krenz M. Heterozygous deletion of AKT1 rescues cardiac contractility, but not hypertrophy, in a mouse model of Noonan syndrome with multiple lentiginos. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;112:83–90.
233. Hahn A, Lauriel J, Trul J, Behnke-Hall K, Logeswaran T, Schänzer A, Bögürçü N, Garvalov BK, Zenker M, Gelb BD, von Gerlach S, Kandolf R, Kontaridis MI, Schranz D. Rapidly progressive hypertrophic cardiomyopathy in an infant with Noonan syndrome with multiple lentiginos: palliative treatment with a rapamycin analog. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(4):744–751.
234. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(Suppl 2):S17–S27.
235. Kamiya N, Yamaguchi R, Aruwajoye O, Kim AJ, Kuroyanagi G, Phipps M, Adapala NS, Feng JQ, Kim HK. Targeted disruption of NF1 in osteocytes increases FGF23 and osteoid with osteomalacia-like bone phenotype. *J Bone Miner Res*. 2017;32(8):1716–1726.
236. Motegi S, Yokoyama Y, Ogino S, Yamada K, Uchiyama A, Perera B, Takeuchi Y, Ohnishi H, Ishikawa O. Pathogenesis of multiple lentiginos in LEOPARD syndrome with PTPN11 gene mutation. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(8):978–984.
237. Zheng H, Yu WM, Waclaw RR, Kontaridis MI, Neel BG, Qu CK. Gain-of-function mutations in the gene encoding the tyrosine phosphatase SHP2 induce hydrocephalus in a catalytically dependent manner. *Sci Signal*. 2018;11(522):ea01591.
238. Mulero-Navarro S, Sevilla A, Roman AC, Lee DF, D'Souza SL, Pardo S, Riess I, Su J, Cohen N, Schaniel C, Rodriguez NA, Baccarini A, Brown BD, Cave H, Caye A, Strullu M, Yalcin S, Park CY, Dhandapanay PS, Yongchao G, Edelmann L, Bahieg S, Raynal P, Flex E, Tartaglia M, Moore KA, Lemischka IR, Gelb BD. Myeloid dysregulation in a human induced pluripotent stem cell model of PTPN11-associated juvenile myelomonocytic leukemia. *Cell Rep*. 2015;13(3):504–515.
239. Xu D, Zheng H, Yu WM, Qu CK. Activating mutations in protein tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) enhance reactive oxygen species production that contributes to myeloproliferative disorder. *PLoS One*. 2013;8(5):e63152.
240. Xu D, Wang S, Yu WM, Chan G, Araki T, Bunting KD, Neel BG, Qu CK. A germline gain-of-function mutation in Ptpn11 (Shp-2) phosphatase induces myeloproliferative disease by aberrant activation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;116(18):3611–3621.
241. Dong L, Yu WM, Zheng H, Loh ML, Bunting ST, Pauly M, Huang G, Zhou M, Broxmeyer HE, Scadden DT, Qu CK. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature*. 2016;539(7628):304–308.
242. Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell*. 2005;8(2):119–130.
243. Wiesner SM, Geurts JL, Diers MD, Bergerson RJ, Hasz DE, Morgan KJ, Largaespada DA. NF1 mutant mice with p19ARF gene loss develop accelerated hematopoietic disease resembling acute leukemia with a variable phenotype. *Am J Hematol*. 2011;86(7):579–585.
244. Dodd RD, Mito JK, Eward WC, Chitalia R, Sachdeva M, Ma Y, Barretina J, Dodd L, Kirsch DG. NF1 deletion generates multiple subtypes of soft-tissue sarcoma that respond to MEK inhibition. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(9):1906–1917.
245. Lee I, Pecinova A, Pecina P, Neel BG, Araki T, Kucherlapati R, Roberts AE, Hüttemann M. A suggested role for mitochondria in Noonan syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(2):275–283.
246. Lupsa BC, Sachdev V, Lungu AO, Rosing DR, Gordon P. Cardiomyopathy in congenital and acquired generalized lipodystrophy: a clinical assessment. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89(4):245–250.
247. Östman-Smith I. Beta-blockers in pediatric hypertrophic cardiomyopathies. *Rev Recent Clin Trials*. 2014;9(2):82–85.
248. Hickey EJ, Mehta R, Elmi M, Asoh K, McCrindle BW, Williams WG, Manlhiot C, Benson L. Survival implications: hypertrophic cardiomyopathy in Noonan syndrome. *Congenit Heart Dis*. 2011;6(1):41–47.
249. Kirk JM, Betts PR, Butler GE, Donaldson MD, Dunger DB, Johnston DJ, Kelnar CJ, Price DA, Wilton P. UK KIGS Executive Group. Short stature in Noonan syndrome: response to growth hormone therapy. *Arch Dis Child*. 2001;84(5):440–443.
250. Noordam C, Peer PG, Francois I, De Schepper J, van den Burgt I, Otten BJ. Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11. *Eur J Endocrinol*. 2008;159(3):203–208.
251. Osio D, Dahlgren J, Wikland KA, Westphal O. Improved final height with long-term growth hormone treatment in Noonan syndrome. *Acta Paediatr*. 2005;94(9):1232–1237.
252. Raaijmakers R, Noordam C, Karagiannis G, Gregory JW, Hertel NT, Sipilä I, Otten BJ. Response to growth hormone treatment and final height in Noonan syndrome in a large cohort of patients in the KIGS database. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008;21(3):267–273.
253. Tamburrino F, Gibertoni D, Rossi C, Scarano E, Perri A, Montanari F, Fantini MP, Pession A, Tartaglia M, Mazzanti L. Response to long-term growth hormone therapy in patients affected by RASopathies and growth hormone deficiency. Patterns of growth, puberty and final height data. *Am J Med Genet A*. 2015;167(11):2786–2794.
254. Giacomozzi C, Deodati A, Shaikh MG, Ahmed SF, Cianfarani S. The impact of growth hormone therapy on adult height in Noonan syndrome: a systematic review. *Horm Res Paediatr*. 2015;83(3):167–176.
255. Limal JM, Parfait B, Cabrol S, Bonnet D, Leheup B, Lyonnet S, Vidaud M, Le Bouc Y. Noonan syndrome: relationships between genotype, growth, and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):300–306.
256. Stein RJ, Legault L, Daneman D, Weksberg R, Hamilton J. Growth hormone deficiency in Costello syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004;129A(2):166–170.
257. Noordam C, Draaisma JM, van den Nieuwenhof J, van der Burgt I, Otten BJ, Daniels O. Effects of growth hormone treatment on left ventricular

- dimensions in children with Noonan's syndrome. *Horm Res.* 2001;**56**(3-4):110-113.
258. Cottenill AM, McKenna WJ, Brady AF, Sharland M, Elswani M, Yamada M, Carnacho-Hübner C, Kelnar CJ, Dunger DB, Patton MA, Savage MO. The short-term effects of growth hormone therapy on height velocity and cardiac ventricular wall thickness in children with Noonan's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;**81**(6):2291-2297.
259. Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;**17**(11):676-691.
260. Sun X, Ren Y, Gunawan S, Teng P, Chen Z, Lawrence HR, Cai J, Lawrence NJ, Wu J. Selective inhibition of leukemia-associated SHP2E69K mutant by the allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Leukemia.* 2018;**32**:1246-1249.
261. Gao Y, Chang MT, McKay D, Na N, Zhou B, Yaeger R, Torres NM, Muniz K, Droscher M, Barbacid M, Caponigro G, Stuart D, Moebitz H, Solt D, Abdel-Wahab O, Taylor BS, Yao Z, Rosen N. Allele-specific mechanisms of activation of MEK1 mutants determine their properties. *Cancer Discov.* 2018;**8**(5):648-661.
262. Antony R, Emery CM, Sawyer AM, Garraway LA. C-RAF mutations confer resistance to RAF inhibitors. *Cancer Res.* 2013;**73**(15):4840-4851.
263. Wang M, Casey PJ. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;**17**(2):110-122.
264. Chen YN, LaMarche MJ, Chan JHM, Fekkes P, Garcia-Fontanet J, Acker MG, Antonakos B, Chen CH, Chen Z, Cooke VG, Dobson JR, Deng Z, Fei F, Firestone B, Fodor M, Fridrich C, Gao H, Grunenfelder D, Hao HX, Jacob J, Ho S, Hsiao K, Kang ZB, Karki R, Kato M, Larrow J, La Bonte LR, Lemoir F, Liu C, Liu S, Majumdar D, Meyer M, Palermo M, Perez L, Pu M, Price E, Quinn C, Shukya S, Shultz MD, Slioz J, Venkatesan K, Wang P, Warmuth M, Williams S, Yang C, Yuan J, Zhang JH, Zhu P, Ramsey T, Keen NJ, Sellers WR, Stams T, Fortin PD. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature.* 2016;**535**(7610):148-152.
265. Josowitz R, Mulero-Navarro S, Rodriguez NA, Falce C, Cohen N, Ullian EM, Weiss LA, Rauert KA, Sobie EA, Gelb BD. Autonomous and non-autonomous defects underlie hypertrophic cardiomyopathy in BRAF-mutant hiPSC-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Reports.* 2016;**7**(3):355-369.
266. Dhandapani PS, Fabris F, Tonk R, Ilastre A, Karakostas I, Sorounian M, Sheng J, Hajar RJ, Tartaglia M, Sobie EA, Lebeche D, Gelb BD. Cyclosporine attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by RAF1 mutants in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;**51**(1):4-15.
267. Cashman TJ, Josowitz R, Johnson BV, Gelb BD, Costa KD. Human engineered cardiac tissues created using induced pluripotent stem cells reveal functional characteristics of BRAF-mediated hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2016;**11**(1):e0146697.

Acknowledgments

We thank all past and present staff members and collaborators in particular the NSEuroNet European consortium for fruitful scientific discussions.

Financial Support: The work was supported in part by grants from INSERM (to A.Y.), Toulouse University Hospital (CHU), DGOS (to T.E.), and ERA-NET for research programmes on rare diseases (E-Rare, project NSEuroNet; European Network on Noonan Syndrome and Related Disorders to A.Y.).

Current Affiliation: M. Tajan's current affiliation is Francis Crick Institute, London, England.

Correspondence and Reprint Requests: Armelle Yart, INSERM UMR 1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (DMC), University of Toulouse Paul Sabatier, Avenue J Poulhès, 31042 Toulouse France. E-mail: Armelle.Yart@inserm.fr.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

*These authors contributed equally to this work.

Abbreviations

CFCS, cardio-facio-cutaneous syndrome; CR, conserved region; CS, Costello syndrome; EE, energy expenditure; GAP, GTPase-activating protein; GTP, guanosine triphosphate; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; iPSC, induced pluripotent stem cell; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; KI, knockout; LOF, loss-of-function; LS, Legius syndrome; MIM, Mendelian Inheritance in Man; MPD, myeloproliferative disorder; NF1, type 1 neurofibromatosis; NS, Noonan syndrome; NS-LAH, Noonan-like syndrome with loose anagen hair; NS-ML, Noonan syndrome with multiple lentigenes; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PTP, protein-tyrosine phosphatase; *PTPN11*, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11; PVS, pulmonary valve stenosis; rhGH, recombinant human growth hormone; SDS, standard deviation score.

Proof Only

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Agazie YM, Hayman MJ. (2003a) Molecular Mechanism for a Role of SHP2 in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 7875–7886.
- Agazie YM, Hayman MJ. (2003b) Molecular Mechanism for a Role of SHP2 in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 7875–7886.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. (2000) The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser³⁰⁷. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 9047–9054.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. (1998) B-Cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the b-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & Development*, **12**, 1763–1768.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. (2006) Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, **23**, 469–480.
- Alessi DR, James SR, Downes PC, Holmes AB, Gaffney PRJ et al. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B_α. *Current Biology*, **7**, 261–269.
- Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF et al. (2001) Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 7117–7136.
- Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S et al. (2013) Gain-of-Function Mutations in RIT1 Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **93**, 173–180.

- Araki T, Chan G, Newbigging S, Morikawa L, Bronson RT et al. (2009) Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 4736–4741.
- Araki T, Mohi MG, Ismat FA, Bronson RT, Williams IR et al. (2004) Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nature Medicine*, **10**, 849–857.
- Araki T, Nawa H, Neel BG. (2003) Tyrosyl Phosphorylation of Shp2 Is Required for Normal ERK Activation in Response to Some, but Not All, Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 41677–41684.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W et al. (2005) IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine*, **11**, 191–198.
- Austin RL, Rune A, Bouzakri K, Zierath JR, Krook A. (2008) siRNA-Mediated Reduction of Inhibitor of Nuclear Factor- κ B Kinase Prevents Tumor Necrosis Factor- α -Induced Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, **57**, 2066–2073.
- Banks AS, McAllister FE, Camporez JPG, Zushin P-JH, Jurczak MJ et al. (2015) An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature*, **517**, 391–395.
- Banno R, Zimmer D, De Jonghe BC, Atienza M, Rak K et al. (2010) PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *Journal of Clinical Investigation*, **120**, 720–734.
- Bard-Chapeau EA, Li S, Ding J, Zhang SS, Zhu HH et al. (2011) Ptpn11/Shp2 Acts as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinogenesis. *Cancer Cell*, **19**, 629–639.
- Bard-Chapeau EA, Yuan J, Droin N, Long S, Zhang EE et al. (2006) Concerted Functions of Gab1 and Shp2 in Liver Regeneration and Hepatoprotection. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 4664–4674.
- Barford D, Neel BG. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure*, **6**, 249–254.

- Bauler TJ, Kamiya N, Lapinski PE, Langewisch E, Mishina Y et al. (2011) Development of severe skeletal defects in induced SHP-2-deficient adult mice: a model of skeletal malformation in humans with SHP-2 mutations. *Disease Models & Mechanisms*, **4**, 228–239.
- Bennett AM, Tang TL, Sugimoto S, Walsh CT, Neel BG. (1994) Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor B to Ras. *PNAS*, **91**, 7335–7339.
- Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B et al. (2004) Activating Mutations of the Noonan Syndrome-Associated *SHPTP2* Gene in Human Solid Tumors and Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Research*, **64**, 8816–8820.
- Bento JL, Palmer ND, Mychaleckyj JC, Lange LA, Langefeld CD et al. (2004) Association of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Gene Polymorphisms With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, **53**, 3007–3012.
- Bettaieb A, Matsuo K, Matsuo I, Nagata N, Chahed S et al. (2011) Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism*, **60**, 1193–1201.
- Bettaieb A, Matsuo K, Matsuo I, Wang S, Melhem R et al. (2012) Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Potentiates PERK/eIF2a Signaling in Brown Adipocytes. *PLoS ONE*, **7**, 10.
- Billington EO, Grey A, Bolland MJ. (2015) The effect of thiazolidinediones on bone mineral density and bone turnover: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, **58**, 2238–2246.
- Binder G, Grathwol S, von Loeper K, Blumenstock G, Kaulitz R et al. (2012) Health and Quality of Life in Adults with Noonan Syndrome. *The Journal of Pediatrics*, **161**, 501-505.e1.
- Boden G, Cheung P, Stein TP, Kresge K, Mozzoli M. (2002) FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **283**, E12–E19.
- Bonetti M, Paardekooper Overman J, Tessadori F, Noël E, Bakkers J et al. (2014) Noonan and LEOPARD syndrome Shp2 variants induce heart displacement defects in zebrafish. *Development*, **141**, 1961–1970.

- Boon MR, Bakker LEH, Haks MC, Quinten E, Schaart G et al. (2015) Short-term high-fat diet increases macrophage markers in skeletal muscle accompanied by impaired insulin signalling in healthy male subjects. *Clinical Science*, **128**, 143–151.
- Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. (2014) Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **6**, a009191.
- Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F et al. (2003) Reduced Activation of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Increased Serine 636 Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 in Primary Culture of Skeletal Muscle Cells From Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, **52**, 1319–1325.
- Bowen ME, Ayturk UM, Kurek KC, Yang W, Warman ML. (2014) SHP2 Regulates Chondrocyte Terminal Differentiation, Growth Plate Architecture and Skeletal Cell Fates AOM Wilkie, Ed. *PLoS Genetics*, **10**, e1004364.
- Bowen ME, Boyden ED, Holm IA, Campos-Xavier B, Bonafé L et al. (2011) Loss-of-Function Mutations in PTPN11 Cause Metachondromatosis, but Not Ollier Disease or Maffucci Syndrome AOM Wilkie, Ed. *PLoS Genetics*, **7**, e1002050.
- Braiman L. (2001) Insulin Induces Specific Interaction between Insulin Receptor and Protein Kinase C in Primary Cultured Skeletal Muscle. *Molecular Endocrinology*, **15**, 565–574.
- Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. (2004) The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene*, **23**, 7957–7968.
- Bunda S, Burrell K, Heir P, Zeng L, Alamsahebpour A et al. (2015) Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis. *Nature Communications*, **6**.
- do Carmo JM, da Silva AA, Ebaady SE, Sessums PO, Abraham RS et al. (2014) Shp2 signaling in POMC neurons is important for leptin's actions on blood pressure, energy balance, and glucose regulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **307**, R1438–R1447.

- Case RD, Piccione E, Wolf G, Bennett AM, Neel BG et al. (1994) SH-PTP2 By SH2 Domain Binding Specificity Is Defined by Direct Interactions with Platelet-derived Growth Factor P-Receptor, Epidermal Growth Factor Receptor, and Insulin Receptor Substrate-1-derived Phosphopeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 10467–10474.
- Cederberg H, Saukkonen T, Laakso M, Jokelainen J, Harkonen P et al. (2010) Postchallenge Glucose, A1C, and Fasting Glucose as Predictors of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease: A 10-year prospective cohort study. *Diabetes Care*, **33**, 2077–2083.
- Chan G, Cheung LS, Yang W, Milyavsky M, Sanders AD et al. (2011) Essential role for Ptpn11 in survival of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, **117**, 4253–4261.
- Chan G, Kalaitzidis D, Usenko T, Kutok JL, Yang W et al. (2009) Leukemogenic Ptpn11 causes fatal myeloproliferative disorder via cell-autonomous effects on multiple stages of hematopoiesis. *Blood*, **113**, 4414–4424.
- Chan RJ. (2005) Human somatic PTPN11 mutations induce hematopoietic-cell hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **105**, 3737–3742.
- Chan RJ, Li Y, Hass MN, Walter A, Voorhorst CS et al. (2006) Shp-2 heterozygous hematopoietic stem cells have deficient repopulating ability due to diminished self-renewal. *Experimental Hematology*, **34**, 1229–1238.
- Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F et al. (2003) Preadipocyte Conversion to Macrophage: EVIDENCE OF PLASTICITY. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 9850–9855.
- Chen Y, Wen R, Yang S, Schuman J, Zhang EE et al. (2003) Identification of Shp-2 as a Stat5A Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 16520–16527.
- Chen Y-NP, LaMarche MJ, Chan HM, Fekkes P, Garcia-Fortanet J et al. (2016) Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature*, **535**, 148–152.

- Choi H, Shin P, Lee J, Choi W, Kang M et al. (2017) Anti-inflammatory effect of lovastatin is mediated via the modulation of NF- κ B and inhibition of HDAC1 and the PI3K/Akt/mTOR pathway in RAW264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, **41**, 1103–1109.
- Choi W-W, Yoo J-Y, Park K-C, Kim K-H. (2003) LEOPARD Syndrome with a New Association of Congenital Corneal Tumor, Choristoma. *Pediatric Dermatology*, **20**, 158–160.
- Choukair D, Hgel U, Sander A, Uhlmann L, Tnshoff B. (2014) Inhibition of IGF-I-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes. *Pediatric Research*, **76**, 245–251.
- Chughtai N, Schimchowitsch S, Lebrun J-J, Ali S. (2002) Prolactin Induces SHP-2 Association with Stat5, Nuclear Translocation, and Binding to the β -Casein Gene Promoter in Mammary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 31107–31114.
- Cleghon V, Feldmann P, Ghiglione C, Copeland TD, Perrimon N et al. (1998) Opposing Actions of CSW and RasGAP Modulate the Strength of Torso RTK Signaling in the Drosophila Terminal Pathway. *Molecular Cell*, **2**, 719–727.
- Clment S, Krause U, Desmedt F, Tanti J-F, Behrends J et al. (2001) The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature*, **409**, 92–97.
- Cooperberg BA, Cryer PE. (2010) Insulin Reciprocally Regulates Glucagon Secretion in Humans. *Diabetes*, **59**, 2936–2940.
- Copps KD, White MF. (2012) Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, **55**, 2565–2582.
- Dance M, Montagner A, Salles J-P, Yart A, Raynal P. (2008) The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cellular Signalling*, **20**, 453–459.
- Dardaei L, Wang HQ, Singh M, Fordjour P, Shaw KX et al. (2018) SHP2 inhibition restores sensitivity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors. *Nature Medicine*, **24**, 512–517.

- Darian E, Guvench O, Yu B, Qu C-K, MacKerell AD. (2011) Structural mechanism associated with domain opening in gain-of-function mutations in SHP2 phosphatase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **79**, 1573–1588.
- De Benedetti F, Alonzi T, Moretta A, Lazzaro D, Costa P et al. (1997) Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 643–650.
- De Fea K, Roth RA. (1997) Modulation of Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation and Function by Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 31400–31406.
- Deb TB, Wong L, Salomon DS, Zhou G, Dixon JE et al. (1998) A Common Requirement for the Catalytic Activity and Both SH2 Domains of SHP-2 in Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Activation by the ErbB Family of Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 16643–16646.
- DeFronzo RA. (1988) The Triumvirate: p-Cell, Muscle, Liver. A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes*, **37**.
- DeFronzo RA. (2009) From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*, **58**, 773–795.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH et al. (2015) Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 15019.
- Deng Z, Ma S, Zhou H, Zang A, Fang Y et al. (2015) Tyrosine phosphatase SHP-2 mediates C-type lectin receptor-induced activation of the kinase Syk and anti-fungal TH17 responses. *Nature Immunology*, **16**, 642–652.
- Denu JM, Dixon JE. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current Biology*, 633–641.
- Diamond J. (2003) The double puzzle of diabetes. *Nature*, **423**, 599–602.

- Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T et al. (2002) Grouping of Multiple-Lentiginos/LEOPARD and Noonan Syndromes on the PTPN11 Gene. *The American Journal of Human Genetics*, **71**, 389–394.
- Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ et al. (2010) High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse S Gaetani, Ed. *PLoS ONE*, **5**, e12191.
- Dixon G. (2003) A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine. *Journal of Endocrinology*, **179**, 447–454.
- Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C, Steffen Hermann T, Ihlemann N et al. (2005) Metabolic and Vascular Effects of Tumor Necrosis Factor- α Blockade with Etanercept in Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Vascular Research*, **42**, 517–525.
- Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. (2009) Islet Inflammation Impairs the Pancreatic β -Cell in Type 2 Diabetes. *Physiology*, **24**, 325–331.
- Dong L, Yu W-M, Zheng H, Loh ML, Bunting ST et al. (2016) Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature*, **539**, 304–308.
- Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R et al. (2008) Inactivation of Hepatic Foxo1 by Insulin Signaling Is Required for Adaptive Nutrient Homeostasis and Endocrine Growth Regulation. *Cell Metabolism*, **8**, 65–76.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S et al. (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 253–259.
- Duarte A, Poderoso C, Cooke M, Soria G, Cornejo Maciel F et al. (2012) Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis J-M Vanacker, Ed. *PLoS ONE*, **7**, e45829.

- Dubois E, Jacoby M, Blockmans M, Pernot E, Schiffmann SN et al. (2012) Developmental defects and rescue from glucose intolerance of a catalytically-inactive novel Ship2 mutant mouse. *Cellular Signalling*, **24**, 1971–1980.
- Edouard T, Combiér JP, Nedelec A, Bel-Vialar S, Metrich M et al. (2010) Functional Effects of PTPN11 (SHP2) Mutations Causing LEOPARD Syndrome on Epidermal Growth Factor-Induced Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Glycogen Synthase Kinase 3 Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, **30**, 2498–2507.
- Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N et al. (2012) Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link β Cell Dysfunction and Islet Inflammation. *Cell Metabolism*, **15**, 518–533.
- Eisenstein AB, Strack I. (1978) Amino Acid Stimulation of Glucagon Secretion by Perfused Islets of High-protein-fed Rats. *Diabetes*, **27**, 370–376.
- Elchebly M. (1999) Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science*, **283**, 1544–1548.
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D et al. (2000) SOCS-3 Is an Insulin-induced Negative Regulator of Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 15985–15991.
- Eminaga S, Bennett AM. (2008) Noonan Syndrome-associated SHP-2/ *Ptpn11* Mutants Enhance SIRP α and PZR Tyrosyl Phosphorylation and Promote Adhesion-mediated ERK Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 15328–15338.
- Eto H, Ishimine H, Kinoshita K, Watanabe-Susaki K, Kato H et al. (2013) Characterization of Human Adipose Tissue-Resident Hematopoietic Cell Populations Reveals a Novel Macrophage Subpopulation with CD34 Expression and Mesenchymal Multipotency. *Stem Cells and Development*, **22**, 985–997.
- Farooqi IS, Yeo GSH, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA et al. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, **106**, 271–279.

- Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P et al. (2011) Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Annals of Neurology*, **70**, 550–565.
- Fedele C, Ran H, Diskin B, Wei W, Jen J et al. (2018) SHP2 Inhibition Abrogates MEK inhibitor Resistance in Multiple Cancer Models.
- Feng G-S. (2006) Shp2 as a therapeutic target for leptin resistance and obesity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **10**, 135–142.
- Fink LN, Costford SR, Lee YS, Jensen TE, Bilan PJ et al. (2014) Pro-Inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-Fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans: Muscle Macrophages in Obesity and Diabetes. *Obesity*, **22**, 747–757.
- Fisher TJ, Williams N, Morris L, Cundy PJ. (2013) Metachondromatosis: more than just multiple osteochondromas. *Journal of Children's Orthopaedics*, **7**, 455–464.
- Florez H, Luo J, Castillo-Florez S, Mitsi G, Hanna J et al. (2010) Impact of Metformin-Induced Gastrointestinal Symptoms on Quality of Life and Adherence in Patients with Type 2 Diabetes. *Postgraduate Medicine*, **122**, 112–120.
- Fragale A, Tartaglia M, Wu J, Gelb BD. (2004) Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation. *Human Mutation*, **23**, 267–277.
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D. (2013) Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, **9**, 25–53.
- Gastaldelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A et al. (2007) Thiazolidinediones improve β -cell function in type 2 diabetic patients. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **292**, E871–E883.
- Girousse A, Tavernier G, Valle C, Moro C, Mejhert N et al. (2013) Partial Inhibition of Adipose Tissue Lipolysis Improves Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity Without Alteration of Fat Mass S O'Rahilly, Ed. *PLoS Biology*, **11**, e1001485.

- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E et al. (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, **518**, 547–551.
- Goriely A, McVean GAT, Røjmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AOM. (2003) Evidence for Selective Advantage of Pathogenic FGFR2 Mutations in the Male Germ Line. *Science, New Series*, **301**, 643–646.
- Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J et al. (2005) Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *Journal of Lipid Research*, **46**, 697–705.
- Gouveia TLF, Scorza FA, Silva MJV, Bandeira T de A, Perosa SR et al. (2011) Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators in the hippocampus and blocks the hyperthermia of rats submitted to long-lasting status epilepticus. *Epilepsy & Behavior*, **20**, 1–5.
- Green HF, Nolan YM. (2014) Inflammation and the developing brain: Consequences for hippocampal neurogenesis and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **40**, 20–34.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. (2011) Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, **29**, 415–445.
- Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. (2007) α -Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains. *Endocrine Reviews*, **28**, 84–116.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, **87**, 99–109.
- Guglielmo GMD, Drake PG, Baass PC, Authier F, Posner BI et al. (1998) Insulin receptor internalization and signalling. In: *Insulin Action*, AK Srivastava, BI Posner, Eds., Springer US, Boston, MA, pp. 59–63.
- Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL et al. (2009) The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, **9**.

- Guler HP, Schmid C, Zapf J, Froesch ER. (1989) Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 2868–2872.
- Guo S. (2014) Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*, **220**, T1–T23.
- Guo W, Liu W, Chen Z, Gu Y, Peng S et al. (2017) Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation via ANT1-dependent mitochondrial homeostasis. *Nature Communications*, **8**.
- Gutch MJ, Flint AJ, Keller J, Tonks NK, Hengartner MO. (1998) The Caenorhabditis elegans SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oogenesis and vulval development. *Genes & Development*, **12**, 571–585.
- Hahn A, Lauriol J, Thul J, Behnke-Hall K, Logeswaran T et al. (2015) Rapidly progressive hypertrophic cardiomyopathy in an infant with Noonan syndrome with multiple lentigines: Palliative treatment with a rapamycin analog. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **167**, 744–751.
- Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho C-H et al. (2010) Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, **115**, 957–964.
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Matsumoto K, Nishida E. (2004) Shp2, an SH2-containing Protein-tyrosine Phosphatase, Positively Regulates Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Dephosphorylating and Inactivating the Inhibitor Sprouty. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 22992–22995.
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E. (2002) Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature Cell Biology*, **4**, 850–858.
- Hanna N, Montagner A, Lee WH, Miteva M, Vidal M et al. (2006) Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: Consequences for PI3K binding on Gab1. *FEBS Letters*, **580**, 2477–2482.

- He Z, Zhang SS, Meng Q, Li S, Zhu HH et al. (2012) Shp2 Controls Female Body Weight and Energy Balance by Integrating Leptin and Estrogen Signals. *Molecular and Cellular Biology*, **32**, 1867–1878.
- He Z, Zhu HH, Bauler TJ, Wang J, Ciaraldi T et al. (2013) Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, E79–E88.
- Hernandez AV, Usmani A, Rajamanickam A, Moheet A. (2011) Thiazolidinediones and Risk of Heart Failure in Patients with or at High Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, **11**, 115–128.
- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R et al. (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 179–183.
- Heuberger J, Kosel F, Qi J, Grossmann KS, Rajewsky K et al. (2014) Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 3472–3477.
- Higa M, Zhou Y-T, Ravazzola M, Baetens D, Orci L et al. (1999) Troglitazone prevents mitochondrial alterations, β cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **6**.
- Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. (1998) Crystal Structure of the Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Cell*, **92**, 441–450.
- Hong J, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K. (2007) Fatty acid-induced effect on glucagon secretion is mediated via fatty acid oxidation. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, **23**, 202–210.
- Hopkins BD, Pauli C, Du X, Wang DG, Li X et al. (2018) Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors. *Nature*, **560**, 499–503.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. (1993) Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*, **259**, 87–91.

- Hsu AY, Gurol T, Sobreira TJP, Zhang S, Moore N et al. (2018) Development and Characterization of an Endotoxemia Model in Zebra Fish. *Frontiers in Immunology*, **9**.
- Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S et al. (2001) Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *The New England Journal of Medicine*, **345**, 790–797.
- Hu Z, Lee IH, Wang X, Sheng H, Zhang L et al. (2007) PTEN Expression Contributes to the Regulation of Muscle Protein Degradation in Diabetes. *Diabetes*, **56**, 2449–2456.
- Hugues L, Cavé H, Philippe N, Pereira S, Fenaux P et al. (2005) Mutations of PTPN11 are rare in adult myeloid malignancies. *Haematologica*, **90**, 853–854.
- Ishida H, Kogaki S, Narita J, Ichimori H, Nawa N et al. (2011) LEOPARD-type SHP2 mutant Gln510Glu attenuates cardiomyocyte differentiation and promotes cardiac hypertrophy via dysregulation of Akt/GSK-3 α / β -catenin signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **301**, 1531–1539.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K et al. (2001) Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care*, **24**, 683–689.
- Ito H, Ishida H, Takeuchi Y, Antoku S, Abe M et al. (2010) Long-term effect of metformin on blood glucose control in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition & Metabolism*, **7**, 83.
- Ivanovs A, Rybtsov S, Ng ES, Stanley EG, Elefanty AG et al. (2017) Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish. *Development*, **144**, 2323–2337.
- de Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulffele MG, van der Kolk J et al. (2010) Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ*, **340**, c2181–c2181.
- Jakob S, Schroeder P, Lukosz M, Büchner N, Spyridopoulos I et al. (2008) Nuclear Protein Tyrosine Phosphatase Shp-2 Is One Important Negative Regulator of Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 33155–33161.

- Jamieson RC, van der Burgt I, Brady AF, Van Reen M, Elswawi MM et al. (1994) Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nature Genetics*, **8**, 357–360.
- Jamshidi Y, Gooljar SB, Snieder H, Wang X, Ge D et al. (2007) SHP-2 and PI3-kinase genes PTPN11 and PIK3R1 may influence serum apoB and LDL cholesterol levels in normal women. *Atherosclerosis*, **194**, e26–e33.
- Jang JY, Min JH, Chae YH, Baek JY, Wang SB et al. (2014) Reactive Oxygen Species Play a Critical Role in Collagen-Induced Platelet Activation SHP-2 Oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling*, **20**, 2528–2540.
- Jia Z-F, Cao X-Y, Cao D-H, Kong F, Kharbuja P et al. (2013) Polymorphisms of PTPN11 gene could influence serum lipid levels in a sex-specific pattern. *Lipids in Health and Disease*, **12**, 72.
- Jiang G, Zhang BB. (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **284**, E671–E678.
- Jopling C, van Geemen D. (2007) Shp2 Knockdown and Noonan/LEOPARD Mutant Shp2-Induced Gastrulation Defects. *PLoS Genetics*, **3**, 9.
- Kagawa S, Sasaoka T, Yaguchi S, Ishihara H, Tsuneki H et al. (2005) Impact of Src Homology 2-Containing Inositol 5'-Phosphatase 2 Gene Polymorphisms Detected in a Japanese Population on Insulin Signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**, 2911–2919.
- Kaisaki PJ, Delepine M, Woon PY, Sebag-Montefiore L, Wilder SP et al. (2004) Polymorphisms in Type II SH2 Domain-Containing Inositol 5-Phosphatase (INPPL1, SHIP2) Are Associated With Physiological Abnormalities of the Metabolic Syndrome. *Diabetes*, **53**, 1900–1904.
- Kan C, Yang F, Wang S. (2018) SHP2-Mediated Signal Networks in Stem Cell Homeostasis and Dysfunction. *Stem Cells International*, **2018**, 1–10.
- Kang HJ, Chung D-H, Sung CO, Yoo SH, Yu E et al. (2017) SHP2 is induced by the HBx-NF- κ B pathway and contributes to fibrosis during human early hepatocellular carcinoma development. *Oncotarget*, **8**.

- Karmali S, Brar B, Shi X, Sharma AM, de Gara C et al. (2013) Weight Recidivism Post-Bariatric Surgery: A Systematic Review. *Obesity Surgery*, **23**, 1922–1933.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA et al. (2000) Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **85**, 9.
- Kazankov K, Barrera F, Møller HJ, Bibby BM, Vilstrup H et al. (2014) Soluble CD163, a macrophage activation marker, is independently associated with fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C. *Hepatology*, **60**, 521–530.
- Ke Y, Zhang EE, Hagihara K, Wu D, Pang Y et al. (2007) Deletion of Shp2 in the Brain Leads to Defective Proliferation and Differentiation in Neural Stem Cells and Early Postnatal Lethality. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 6706–6717.
- Keilhack H, David FS, McGregor M, Cantley LC, Neel BG. (2005) Diverse Biochemical Properties of Shp2 Mutants: IMPLICATIONS FOR DISEASE PHENOTYPES. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 30984–30993.
- Keren B. (2004) PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience. *Journal of Medical Genetics*, **41**, e117–e117.
- Khan IM, Perrard X-Y, Brunner G, Lui H, Sparks LM et al. (2015) Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. *International Journal of Obesity*, **39**, 1607–1618.
- Kim HK, Feng G-S, Chen D, King PD, Kamiya N. (2014) Targeted Disruption of *Shp2* in Chondrocytes Leads to Metachondromatosis With Multiple Cartilaginous Protrusions: A NOVEL METACHONDROMATOSIS MOUSE MODEL. *Journal of Bone and Mineral Research*, **29**, 761–769.
- Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. (2000) Mechanism of Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 8456–8460.

- Kim LC, Song L, Haura EB. (2009) Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **6**, 587–595.
- Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WHI et al. (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic b cell growth. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**, 1839–1847.
- Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S. (2003) The Influence of GLP-1 on Glucose-Stimulated Insulin Secretion: Effects on β -Cell Sensitivity in Type 2 and Nondiabetic Subjects. *Diabetes*, **52**, 380–386.
- Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL et al. (2000) Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 5479–5489.
- Knowler WC, Barrett-connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM et al. (2002) Reduction In The Incidence Of Type 2 Diabetes With Lifestyle Intervention Or Metformin. *New England Journal of Medicine*, **346**, 393–403.
- Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. (2006) *PTPN11* (Shp2) Mutations in LEOPARD Syndrome Have Dominant Negative, Not Activating, Effects. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 6785–6792.
- Koo S-H, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreteron RA et al. (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, **437**, 1109–1114.
- Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, Boss O, Kahn BB. (2004) GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *Journal of Clinical Investigation*, **114**, 1666–1675.
- Koudova M, Seemanova E, Zenker M. (2009) Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence. *European Journal of Medical Genetics*, **52**, 337–340.
- Kraja AT, Chasman DI, North KE, Reiner AP, Yanek LR et al. (2014) Pleiotropic genes for metabolic syndrome and inflammation. *Molecular Genetics and Metabolism*, **112**, 317–338.

- Krajewska M, Banares S, Zhang EE, Huang X, Scadeng M et al. (2008) Development of Diabetes in Mice with Neuronal Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase. *The American Journal of Pathology*, **172**, 1312–1324.
- Kratz CP, Franke L, Peters H, Kohlschmidt N, Kazmierczak B et al. (2015) Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes. *British Journal of Cancer*, **112**, 1392–1397.
- Krenz M. (2005) Noonan Syndrome Mutation Q79R in Shp2 Increases Proliferation of Valve Primordia Mesenchymal Cells via Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling. *Circulation Research*, **97**, 813–820.
- Krenz M, Gulick J, Osinska HE, Colbert MC, Molkentin JD et al. (2008) Role of ERK1/2 signaling in congenital valve malformations in Noonan syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 18930–18935.
- Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA et al. (2011) Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 16381–16385.
- Kurlawalla-Martinez C, Stiles B, Wang Y, Devaskar SU, Kahn BB et al. (2005) Insulin Hypersensitivity and Resistance to Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice Lacking PTEN in Adipose Tissue. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 2498–2510.
- Kurokawa J, Nagano H, Ohara O, Kubota N, Kadowaki T et al. (2011) Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 12072–12077.
- Lackey DE, Olefsky JM. (2016) Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology*, **12**, 15–28.

- Lam YY, Ha CWY, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A et al. (2012) Increased Gut Permeability and Microbiota Change Associate with Mesenteric Fat Inflammation and Metabolic Dysfunction in Diet-Induced Obese Mice RR Zhang, Ed. *PLoS ONE*, **7**, e34233.
- Lauriol J, Kontaridis MI. (2011) PTPN11-Associated Mutations in the Heart: Has LEOPARD Changed Its RASspots? *Trends in Cardiovascular Medicine*, **21**, 97–104.
- Lauriol J, Jaffré F, Kontaridis MI. (2015) The role of the protein tyrosine phosphatase SHP2 in cardiac development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **37**, 73–81.
- Laux D, Kratz C, Sauerbrey A. (2008) Common Acute Lymphoblastic Leukemia in a Girl With Genetically Confirmed LEOPARD Syndrome: *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **30**, 602–604.
- Le Marchand SJ, Piston DW. (2010) Glucose Suppression of Glucagon Secretion: METABOLIC AND CALCIUM RESPONSES FROM α -CELLS IN INTACT MOUSE PANCREATIC ISLETS. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 14389–14398.
- Lechleider RJ, Sugimoto S, Bennett AM, Kashishian AS, Cooper JA et al. (1993) Activation of the SH2-containing Phosphotyrosine Phosphatase SH-PTP2 by Its Binding Site, Phosphotyrosine 1009, on the Human Platelet-derived Growth Factor Receptor B*. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 21478–21481.
- Lee I, Pecinova A, Pecina P, Neel BG, Araki T et al. (2010) A suggested role for mitochondria in Noonan syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1802**, 275–283.
- Lee Y-S, Ehninger D, Zhou M, Oh J-Y, Kang M et al. (2014) Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nature Neuroscience*, **17**, 1736–1743.
- Legius E. (2002) PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *Journal of Medical Genetics*, **39**, 571–574.

- Leoni C, Onesimo R, Giorgio V, Diamanti A, Giorgio D et al. (2016) Understanding Growth Failure in Costello Syndrome: Increased Resting Energy Expenditure. *The Journal of Pediatrics*, **170**, 322–324.
- Leto D, Saltiel AR. (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 383–396.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S et al. (1997) PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science, New Series*, **275**, 1943–1947.
- Li P, Fan W, Xu J, Lu M, Yamamoto H et al. (2011) Adipocyte NCoR Knockout Decreases PPAR γ Phosphorylation and Enhances PPAR γ Activity and Insulin Sensitivity. *Cell*, **147**, 815–826.
- Li P, Liu S, Lu M, Bandyopadhyay G, Oh D et al. (2016) Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance. *Cell*, **167**, 973-984.e12.
- Li P, Oh DY, Bandyopadhyay G, Lagakos WS, Talukdar S et al. (2015) LTB $_4$ promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. *Nature Medicine*, **21**, 239–247.
- Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, Wheeler MB. (2002) Glucagon-Like Peptide-1 Inhibits Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channels via a Protein Kinase A- and ADP-Dependent Mechanism. *Molecular Endocrinology*, **16**, 2135–2144.
- Lima MHM, Ueno M, Thirone ACP, Rocha EM, Carvalho CRO et al. (2002) Regulation of IRS-1/SHP2 Interaction and AKT Phosphorylation in Animal Models of Insulin Resistance. *Endocrine*, **18**, 01–12.
- Limongelli G, Pacileo G, Marino B, Digilio MC, Sarkozy A et al. (2007) Prevalence and Clinical Significance of Cardiovascular Abnormalities in Patients With the LEOPARD Syndrome. *The American Journal of Cardiology*, **100**, 736–741.

- Limongelli G, Sarkozy A, Pacileo G, Calabrò P, Digilio MC et al. (2008) Genotype–phenotype analysis and natural history of left ventricular hypertrophy in LEOPARD syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **146A**, 620–628.
- Loh ML. (2004) Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood*, **103**, 2325–2331.
- Loh ML, Martinelli S, Cordeddu V, Reynolds MG, Vattikuti S et al. (2005) Acquired PTPN11 mutations occur rarely in adult patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia Research*, **29**, 459–462.
- Lopez-Guadamillas E, Muñoz-Martin M, Martinez S, Pastor J, Fernandez-Marcos PJ et al. (2016) PI3K α inhibition reduces obesity in mice. *Aging*, **8**, 2747–2753.
- Lorenzo C, Wagenknecht LE, Hanley AJG, Rewers MJ, Karter AJ et al. (2010) A1C Between 5.7 and 6.4% as a Marker for Identifying Pre-Diabetes, Insulin Sensitivity and Secretion, and Cardiovascular Risk Factors: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care*, **33**, 2104–2109.
- Lu W, Gong D, Bar-Sagi D, Cole PA. (2001) Site-Specific Incorporation of a Phosphotyrosine Mimetic Reveals a Role for Tyrosine Phosphorylation of SHP-2 in Cell Signaling. *Molecular Cell*, **8**, 759–769.
- Lu Y, Dollé MET, Imholz S, van 't Slot R, Verschuren WMM et al. (2008) Multiple genetic variants along candidate pathways influence plasma high-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Journal of Lipid Research*, **49**, 2582–2589.
- Luche E, Sengenès C, Arnaud E, Laharrague P, Casteilla L et al. (2015) Differential Hematopoietic Activity in White Adipose Tissue Depending on its Localization: SITE-SPECIFIC HEMATOPOIETIC ACTIVITY IN WAT. *Journal of Cellular Physiology*, **230**, 3076–3083.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 175–184.

- Luo X, Liao R, Hanley KL, Zhu HH, Malo KN et al. (2016) Dual Shp2 and Pten Deficiencies Promote Non-alcoholic Steatohepatitis and Genesis of Liver Tumor-Initiating Cells. *Cell Reports*, **17**, 2979–2993.
- Ma K, Cheung SM, Marshall AJ, Duronio V. (2008) PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P2 levels determine PKB activity. *Cellular Signalling*, **20**, 684–694.
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI et al. (2002) Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**, 11.
- Magkos F, Su X, Bradley D, Fabbrini E, Conte C et al. (2012) Intrahepatic Diacylglycerol Content Is Associated With Hepatic Insulin Resistance in Obese Subjects. *Gastroenterology*, **142**, 1444-1446.e2.
- Maher GJ, McGowan SJ, Giannoulatou E, Verrill C, Goriely A et al. (2016) Visualizing the origins of selfish de novo mutations in individual seminiferous tubules of human testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 2454–2459.
- Malaisse WJ, Hutton JC, Carpinelli AR, Sener A. (1980) The Stimulus-secretion Coupling of Amino Acid-induced Insulin Release. *Diabetes*, **29**, 7.
- Malaquias AC, Brasil AS, Pereira AC, Arnhold IJP, Mendonca BB et al. (2012) Growth standards of patients with Noonan and Noonan-like syndromes with mutations in the RAS/MAPK pathway. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **158A**, 2700–2706.
- Marin TM, Keith K, Davies B, Conner DA, Guha P et al. (2011) Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *Journal of Clinical Investigation*, **121**, 1026–1043.
- Maroun CR, Naujokas MA, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Park M. (2000) The Tyrosine Phosphatase SHP-2 Is Required for Sustained Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and

- Epithelial Morphogenesis Downstream from the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 8513–8525.
- Martinelli S, Nardoza AP, Delle Vigne S, Sabetta G, Torreri P et al. (2012) Counteracting Effects Operating on Src Homology 2 Domain-containing Protein-tyrosine Phosphatase 2 (SHP2) Function Drive Selection of the Recurrent Y62D and Y63C Substitutions in Noonan Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 27066–27077.
- Martinelli S, Torreri P, Tinti M, Stella L, Bocchinfuso G et al. (2008) Diverse driving forces underlie the invariant occurrence of the T42A, E139D, I282V and T468M SHP2 amino acid substitutions causing Noonan and LEOPARD syndromes. *Human Molecular Genetics*, **17**, 2018–2029.
- Martínez-Quintana E, Rodríguez-González F. (2012) LEOPARD Syndrome: Clinical Features and Gene Mutations. *Molecular Syndromology*.
- Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Morris DL. (2014) The developing story of Sprouty and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, **33**, 695–720.
- Matsuo K, Delibegovic M, Matsuo I, Nagata N, Liu S et al. (2010) Altered Glucose Homeostasis in Mice with Liver-specific Deletion of Src Homology Phosphatase 2. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 39750–39758.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 412–419.
- Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K et al. (2002) Reduced expression of the murine p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, **109**, 141–149.
- McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. (2017) Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*, **127**, 5–13.

- Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E. (1993) Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 3865–3869.
- Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, Denechaud P-D, Yu RT et al. (2011) Class IIa Histone Deacetylases Are Hormone-Activated Regulators of FOXO and Mammalian Glucose Homeostasis. *Cell*, **145**, 607–621.
- Miyamoto D, Miyamoto M, Takahashi A, Yomogita Y, Higashi H et al. (2008) Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene*, **27**, 3508–3515.
- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J et al. (2002) Effect of Pioglitazone on Abdominal Fat Distribution and Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **87**, 2784–2791.
- Mohi MG, Williams IR, Dearolf CR, Chan G, Kutok JL et al. (2005) Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations. *Cancer Cell*, **7**, 179–191.
- Montagner A, Yart A, Dance M, Perret B, Salles J-P et al. (2005) A Novel Role for Gab1 and SHP2 in Epidermal Growth Factor-induced Ras Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 5350–5360.
- Morinaga H, Mayoral R, Heinrichsdorff J, Osborn O, Franck N et al. (2015) Characterization of Distinct Subpopulations of Hepatic Macrophages in HFD/Obese Mice. *Diabetes*, **64**, 1120–1130.
- Motegi S, Yokoyama Y, Ogino S, Yamada K, Uchiyama A et al. (2015) Pathogenesis of Multiple Lentigines in LEOPARD Syndrome with PTPN11 Gene Mutation. *Acta Dermato Venereologica*, **95**, 978–984.
- Mulero-Navarro S, Sevilla A, Roman AC, Lee D-F, D’Souza SL et al. (2015) Myeloid Dysregulation in a Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of PTPN11 -Associated Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Cell Reports*, **13**, 504–515.

- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW et al. (2014) Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, **41**, 14–20.
- Myers MG, Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R et al. (1998) The COOH-terminal Tyrosine Phosphorylation Sites on IRS-1 Bind SHP-2 and Negatively Regulate Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 26908–26914.
- Nagata N, Matsuo K, Bettaieb A, Bakke J, Matsuo I et al. (2012) Hepatic Src Homology Phosphatase 2 Regulates Energy Balance in Mice. *Endocrinology*, **153**, 3158–3169.
- Nakamura T, Colbert M, Krenz M, Molkenstein JD, Hahn HS et al. (2007) Mediating ERK1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 2123–2132.
- Nakamura T, Gulick J, Pratt R, Robbins J. (2009) Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 15436–15441.
- Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. (2018) Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry*, **77**, 548–567.
- Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP et al. (1986) Incretin Effects of Increasing Glucose Loads in Man Calculated from Venous Insulin and C-Peptide Responses*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **63**, 492–498.
- NCD Risk Factor Collaboration. (2016) Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *The Lancet*, **387**, 1513–1530.
- Neel BG. (1993) Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases. *Cell Biology*, **4**, 419–432.
- Neel BG, Gu H, Pao L. (2003) The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 284–293.

- Neznanov N, Neznanova L, Kondratov RV, O'Rourke DM, Ullrich A et al. (2004) The Ability of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 to Suppress NF κ B Can Be Inhibited by Dominant Negative Mutant of SIRPa. *DNA and Cell Biology*, **23**, 175–182.
- Nguyen TV, Ke Y, Zhang EE, Feng G-S. (2006) Conditional Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Thymocytes Suppresses Both Pre-TCR and TCR Signals. *The Journal of Immunology*, **177**, 5990–5996.
- Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T et al. (2005) Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *Journal of Human Genetics*, **50**, 192–202.
- Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR. (2014) Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Frontiers in Genetics*, **5**.
- Nishikido T, Oyama J, Shiraki A, Komoda H, Node K. (2016) Deletion of Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)/CD5L Attenuates the Inflammatory Response and Infarct Size in Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, **5**, e002863.
- Noguchi T, Matozaki T, Horita K, Fujioka Y, Kasuga M. (1994) Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 6674–6682.
- Nolan CJ, Madiraju MSR, Delghingaro-Augusto V, Peyot M-L, Prentki M. (2006) Fatty Acid Signaling in the β -Cell and Insulin Secretion. *Diabetes*, **55**, S16–S23.
- Noonan JA. (1968) Hypertelorism with Turner Phenotype: A new Syndrome with Associated Congenital Heart Disease. *American Journal of Disease of Children*, **116**, 373–380.
- Nordmann TM, Dror E, Schulze F, Traub S, Berishvili E et al. (2017) The Role of Inflammation in β -cell Dedifferentiation. *Scientific Reports*, **7**.
- Ogihara T, Mirmira RG. (2010) An islet in distress: β cell failure in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*.

- Oishi K, Gaengel K, Krishnamoorthy S, Kamiya K, Kim I-K et al. (2006) Transgenic *Drosophila* models of Noonan syndrome causing PTPN11 gain-of-function mutations. *Human Molecular Genetics*, **15**, 543–553.
- Oishi K, Zhang H, Gault WJ, Wang CJ, Tan CC et al. (2009) Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during *Drosophila* development. *Human Molecular Genetics*, **18**, 193–201.
- Olbrot M, Rud J, Moss LG, Sharma A. (2002) Identification of β -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 6737–6742.
- O’Neill S, O’Driscoll L. (2015) Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies: Metabolic syndrome. *Obesity Reviews*, **16**, 1–12.
- Ortega-Molina A, Lopez-Guadamillas E, Mattison JA, Mitchell SJ, Muñoz-Martin M et al. (2015) Pharmacological Inhibition of PI3K Reduces Adiposity and Metabolic Syndrome in Obese Mice and Rhesus Monkeys. *Cell Metabolism*, **21**, 558–570.
- Ouwens DM, Gomes de Mesquita DS, Dekker J, Maassen JA. (2001) Hyperosmotic stress activates the insulin receptor in CHO cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1540**, 97–106.
- Ozaki K, Awazu M, Tamiya M, Iwasaki Y, Harada A et al. (2016) Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **310**, E643–E651.
- Paccoud R, Tajan M, Branka S, Edouard T, Yart A. (2018) The Rasopathy family: Consequences of germline activation of the RAS/MAPK pathway. *Endocrine Reviews*.
- Pagani MR, Oishi K, Gelb BD, Zhong Y. (2009) The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction. *Cell*, **139**, 186–198.

- Pal A, Barber TM, Van de Bunt M, Rudge SA, Zhang Q et al. (2012) Mutations as a Cause of Constitutive Insulin Sensitivity and Obesity. *New England Journal of Medicine*, **367**, 1002–1011.
- Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K et al. (2007) Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics*, **39**, 1007–1012.
- Panzhinskiy E, Ren J, Nair S. (2013) Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Insulin Resistance: Role of Endoplasmic Reticulum Stress/Reactive Oxygen Species/Nuclear Factor Kappa B Axis M Ushio-Fukai, Ed. *PLoS ONE*, **8**, e77228.
- Park KS, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE et al. (1998) Troglitazone Regulation of Glucose Metabolism in Human Skeletal Muscle Cultures from Obese Type II Diabetic Subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 1636–1643.
- Patsouris D, Neels JG, Fan W, Li P-P, Nguyen MTA et al. (2009) Glucocorticoids and Thiazolidinediones Interfere with Adipocyte-mediated Macrophage Chemotaxis and Recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 31223–31235.
- Peng L, Xu L, Ouyang W. (2013) Role of Peripheral Inflammatory Markers in Postoperative Cognitive Dysfunction (POCD): A Meta-Analysis K Hashimoto, Ed. *PLoS ONE*, **8**, e79624.
- Peraldi P, Zhao Z, Filloux C, Fischer EH, Van Obberghen E. (1994) Protein-tyrosine-phosphatase 2C is phosphorylated and inhibited by 44-kDa mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 5002–5006.
- Perkins LA, Larsen I, Perrimon N. (1992) corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. *Cell*, **70**, 225–236.
- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E et al. (1994) Early Lymphocyte Expansion Is Severely Impaired in Interleukin 7 Receptor-deficient Mice. *Journal of Experimental Medicine*, **180**, 1955–1960.

- Pettinelli P, del Pozo T, Araya J, Rodrigo R, Araya AV et al. (2009) Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: Correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1792**, 1080–1086.
- Piya MK, Tahrani AA, Barnett AH. (2010) Emerging treatment options for type 2 diabetes: Emerging therapies for type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **70**, 631–644.
- van Poelje PD, Potter SC, Erion MD. (2011) Fructose-1, 6-Bisphosphatase Inhibitors for Reducing Excessive Endogenous Glucose Production in Type 2 Diabetes. In: *Diabetes - Perspectives in Drug Therapy*, M Schwanstecher, Ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 279–301.
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP et al. (2006) Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *The Journal of Nutrition*, **136**, 873–876.
- Prada PO, Quaresma PGF, Caricilli AM, Santos AC, Guadagnini D et al. (2013) Tub Has a Key Role in Insulin and Leptin Signaling and Action In Vivo in Hypothalamic Nuclei. *Diabetes*, **62**, 137–148.
- Prendiville TW, Gauvreau K, Tworog-Dube E, Patkin L, Kucherlapati RS et al. (2014) Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, **99**, 629–634.
- Princen F, Bard E, Sheikh F, Zhang SS, Wang J et al. (2009) Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Muscle Leads to Dilated Cardiomyopathy, Insulin Resistance, and Premature Death. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 378–388.
- Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L et al. (2006) From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Experimental Cell Research*, **312**, 727–736.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J et al. (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, **129**, 118–129.

- Purcell NH, Tang G, Yu C, Mercurio F, DiDonato JA et al. (2001) Activation of NF- B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 6668–6673.
- Qiu W, Wang X, Romanov V, Hutchinson A, Lin A et al. (2014) Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11). *BMC Structural Biology*, **14**, 10.
- Qu CK, Shi ZQ, Shen R, Tsai FY, Orkin SH et al. (1997) A deletion mutation in the SH2-N domain of Shp-2 severely suppresses hematopoietic cell development. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 5499–5507.
- Qu C-K, Yu W-M, Azzarelli B, Cooper S, Broxmeyer HE et al. (1998) Biased Suppression of Hematopoiesis and Multiple Developmental Defects in Chimeric Mice Containing Shp-2 Mutant Cells. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 6075–6082.
- Quaio CRDC, Carvalho JF, da Silva CA, Bueno C, Brasil AS et al. (2012) Autoimmune disease and multiple autoantibodies in 42 patients with RASopathies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **158A**, 1077–1082.
- Ren Y, Meng S, Mei L, Zhao ZJ, Jove R et al. (2004) Roles of Gab1 and SHP2 in Paxillin Tyrosine Dephosphorylation and Src Activation in Response to Epidermal Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 8497–8505.
- Rines AK, Sharabi K, Tavares CDJ, Puigserver P. (2016a) Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, **15**, 786–804.
- Rines AK, Sharabi K, Tavares CDJ, Puigserver P. (2016b) Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, **15**, 786–804.
- Rizos CV, Kei A, Elisaf MS. (2016) The current role of thiazolidinediones in diabetes management. *Archives of Toxicology*, **90**, 1861–1881.
- Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. (2013) Noonan syndrome. *The Lancet*, **381**, 333–342.

- Rocchi S, Tartare-Deckert S, Sawka-Verhelle D, Gamha A, Van Obberghen E. (1996) Interaction of SH2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase 2 with the Insulin Receptor and the Insulin-Like Growth Factor-I Receptor: Studies of the Domains Involved Using the Yeast Two-Hybrid System. *Endocrinology*, **137**, 4944–4952.
- Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A et al. (2004) A Role for the Malonyl-CoA/Long-Chain Acyl-CoA Pathway of Lipid Signaling in the Regulation of Insulin Secretion in Response to Both Fuel and Nonfuel Stimuli. *Diabetes*, **53**, 1007–1019.
- Rouillé Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. (1994) Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in aTC1-6 cells. *PNAS*, **91**, 3242–3246.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. (2002) SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated Degradation of IRS1 and IRS2. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 42394–42398.
- Salmond RJ, Huyer G, Kotsoni A, Clements L, Alexander DR. (2005) The src Homology 2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatase 2 Regulates Primary T-Dependent Immune Responses and Th Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*, **175**, 6498–6508.
- Salvi M, Toninello A. (2004) Effects of polyamines on mitochondrial Ca²⁺ transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1661**, 113–124.
- Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S et al. (2004) Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 32345–32353.
- Samuel VT, Liu Z-X, Wang A, Beddow SA, Geisler JG et al. (2007) Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 739–745.
- Sarafidis PA, Lasaridis AN, Nilsson PM, Pikilidou MI, Stafilas PC et al. (2007) Validity and reproducibility of HOMA-IR, 1/HOMA-IR, QUICKI and McAuley's indices in patients with hypertension and type II diabetes. *Journal of Human Hypertension*, **21**, 709–716.

- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, **307**, 1098–1101.
- Sarkozy A. (2004) Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentigines LEOPARD syndrome. *Journal of Medical Genetics*, **41**, e68–e68.
- Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC et al. (2009) Germline *BRAF* mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: Molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Human Mutation*, **30**, 695–702.
- Sarkozy A, Digilio M, Dallapiccola B. (2008) Leopard syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **3**, 13.
- Saxton TM, Pawson T. (1999) Morphogenetic movements at gastrulation require the SH2 tyrosine phosphatase Shp2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 3790–3795.
- Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, Shen R, Rossi DJ et al. (1997) Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *The EMBO Journal*, **16**, 2352–2364.
- Schramm C, Edwards MA, Krenz M. (2013) New Approaches to Prevent LEOPARD Syndrome-associated Cardiac Hypertrophy by Specifically Targeting Shp2-dependent Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 18335–18344.
- Schramm C, Fine DM, Edwards MA, Reeb AN, Krenz M. (2012) The *PTPN11* loss-of-function mutation Q510E-Shp2 causes hypertrophic cardiomyopathy by dysregulating mTOR signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **302**, H231–H243.
- Schuh K, Pahl A. (2009) Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury. *Biochemical Pharmacology*, **77**, 1827–1834.
- Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y et al. (2016) Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature Communications*, **7**, 10321.

- Seishima M, Mizutani Y, Shibuya Y, Arakawa C, Yoshida R et al. (2007) Malignant melanoma in a woman with LEOPARD syndrome: identification of a germline PTPN11 mutation and a somatic BRAF mutation. *British Journal of Dermatology*, **157**, 1267–1304.
- Seki N, Hashimoto N, Taira M, Yagi S, Yoshida Y et al. (2007) Regulation of Src homology 2–containing protein tyrosine phosphatase by advanced glycation end products: the role on atherosclerosis in diabetes. *Metabolism*, **56**, 1591–1598.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. (2002) Interleukin-6 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes. *Diabetes*, **51**, 3391–3399.
- Serra-Nedelec ADR, Edouard T, Treguer K, Tajan M, Araki T et al. (2012) Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor 1 release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 4257–4262.
- Sharland G. (2012) Fetal cardiac screening and variation in prenatal detection rates of congenital heart disease: why bother with screening at all? *Future Cardiology*, **8**, 189–202.
- Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA. (2006) The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. *Archives of Disease in Childhood*, **92**, 128–132.
- Shi H, Cave B, Inouye K, Bjorbaek C, Flier JS. (2006) Overexpression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Adipose Tissue Causes Local but Not Systemic Insulin Resistance. *Diabetes*, **55**, 699–707.
- Sica A, Mantovani A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, **122**, 787–795.
- Siegfried A, Cances C, Denuelle M, Loukh N, Tauber M et al. (2017) Noonan syndrome, *PTPN11* mutations, and brain tumors. A clinical report and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, **173**, 1061–1065.
- Sleeman MW, Wortley KE, Lai K-MV, Gowen LC, Kintner J et al. (2005) Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nature Medicine*, **11**, 199–205.

- Smeets PJH, Teunissen BEJ, Planavila A, de Vogel-van den Bosch H, Willemsen PHM et al. (2008) Inflammatory Pathways Are Activated during Cardiomyocyte Hypertrophy and Attenuated by Peroxisome Proliferator-activated Receptors PPAR α and PPAR δ . *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 29109–29118.
- Sobreira NLM, Cirulli ET, Avramopoulos D, Wohler E, Oswald GL et al. (2010) Whole-Genome Sequencing of a Single Proband Together with Linkage Analysis Identifies a Mendelian Disease Gene GS Barsh, Ed. *PLoS Genetics*, **6**, e1000991.
- Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. (2004) Does the Metabolic Syndrome Improve Identification of Individuals at Risk of Type 2 Diabetes and/or Cardiovascular Disease? *Diabetes Care*, **27**, 2676–2681.
- Stewart RA, Sanda T, Widlund HR, Zhu S, Swanson KD et al. (2010) Phosphatase-Dependent and -Independent Functions of Shp2 in Neural Crest Cells Underlie LEOPARD Syndrome Pathogenesis. *Developmental Cell*, **18**, 750–762.
- Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP et al. (2004) Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *PNAS*, **101**, 2082–2087.
- Street ME, Ziveri MA, Spaggiari C, Viani I, Volta C et al. (2006) Inflammation is a modulator of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-binding protein system inducing reduced bioactivity of IGFs in cystic fibrosis. *European Journal of Endocrinology*, **154**, 47–52.
- Strullu M, Cavé H. (2017) Juvenile myelomonocytic leukemia. *Hématologie*, 144–153.
- Su X, Feng X, Terrando N, Yan Y, Chawla A et al. (2012) Dysfunction of Inflammation-Resolving Pathways Is Associated with Exaggerated Postoperative Cognitive Decline in a Rat Model of the Metabolic Syndrome. *Molecular Medicine*, **18**, 1481–1490.
- Sun B, Li S, Yang L, Damodaran T, Desai D et al. (2009) Activation of glycolysis and apoptosis in glycogen storage disease type Ia. *Molecular Genetics and Metabolism*, **97**, 267–271.

- Sun J, Lu S, Ouyang M, Lin L-J, Zhuo Y et al. (2013) Antagonism between binding site affinity and conformational dynamics tunes alternative cis-interactions within Shp2. *Nature Communications*, **4**.
- Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M et al. (2014) Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 9597–9602.
- Tajan M, Batut A, Cadoudal T, Deleruyelle S, Le Gonidec S et al. (2014) LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, E4494–E4503.
- Tajan M, Pernin-Grandjean J, Beton N, Gennero I, Capilla F et al. (2018) Noonan syndrome-causing SHP2 mutants impair ERK-dependent chondrocyte differentiation during endochondral bone growth. *Human Molecular Genetics*, **27**, 2276–2289.
- Tajan M, de Rocca Serra A, Valet P, Edouard T, Yart A. (2015) SHP2 sails from physiology to pathology. *European Journal of Medical Genetics*, **58**, 509–525.
- Tang TL, Freeman RM, O'Reilly AM, Neel BG, Sokol SY. (1995) The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early xenopus development. *Cell*, **80**, 473–483.
- Tao B, Jin W, Xu J, Liang Z, Yao J et al. (2014) Myeloid-Specific Disruption of Tyrosine Phosphatase Shp2 Promotes Alternative Activation of Macrophages and Predisposes Mice to Pulmonary Fibrosis. *The Journal of Immunology*, **193**, 2801–2811.
- Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. (2011) Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **25**, 161–179.
- Tartaglia M, Martinelli S, Iavarone I, Cazzaniga G, Spinelli M et al. (2005) Somatic PTPN11 mutations in childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, **129**, 333–339.

- Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E et al. (2006) Diversity and Functional Consequences of Germline and Somatic PTPN11 Mutations in Human Disease. *The American Journal of Human Genetics*, **78**, 279–290.
- Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG et al. (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, **29**, 465–468.
- Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J et al. (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*, **34**, 148–150.
- Tartaglia M, Zampino G, Gelb BD. (2010) Noonan Syndrome: Clinical Aspects and Molecular Pathogenesis. *Molecular Syndromology*, **1**, 2–26.
- Tasian SK, Casas JA, Posocco D, Gandre-Babbe S, Gagne AL et al. (2018) Mutation-specific signaling profiles and kinase inhibitor sensitivities of juvenile myelomonocytic leukemia revealed by induced pluripotent stem cells. *Leukemia*.
- Thaik CM, Calderone A, Takahashi N, Colucci WS. (1995) Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 1093–1099.
- Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M et al. (2017) Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, **542**, 450–455.
- Tremblay F, Brule S, Hee Um S, Li Y, Masuda K et al. (2007) Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 14056–14061.
- Tsutsumi R, Masoudi M, Takahashi A, Fujii Y, Hayashi T et al. (2013) YAP and TAZ, Hippo Signaling Targets, Act as a Rheostat for Nuclear SHP2 Function. *Developmental Cell*, **26**, 658–665.
- Uçar C, Calyskan Ü, Martini S, Heinritz W. (2006) Acute Myelomonocytic Leukemia in a Boy With LEOPARD Syndrome (PTPN11 Gene Mutation Positive): *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **28**, 123–125.

- Ueki K, Kondo T, Kahn CR. (2004) Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 5434–5446.
- Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A, Adachi M, Olefsky JM et al. (1996) Expression of Dominant Negative Mutant SHPTP2 Attenuates Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activity via Modulation of Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 12595–12602.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M et al. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, **431**, 200–205.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW. (1997) Protection from obesity- induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, **389**, 5.
- Van Schravendijk CFH, Heylen L, Van den Brande JL, Pipeleers DG. (1990) Direct effect of insulin and insulin-like growth factor-I on the secretory activity of rat pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **33**, 649–653.
- Vijayakumar A, Aryal P, Wen J, Syed I, Vazirani RP et al. (2017) Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport. *Cell Reports*, **21**, 1021–1035.
- Virkkamaki A, Korshennikova E, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T et al. (2001) Intramyocellular Lipid Is Associated With Resistance to In Vivo Insulin Actions on Glucose Uptake, Antilipolysis, and Early Insulin Signaling Pathways in Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, **50**, 2337–2343.
- Vogel W, Ullrich A. (1996) Multiple in Vivo Phosphorylated Tyrosine Phosphatase SHP-2 Engages Binding to Grb2 via Tyrosine 584. *Cell Growth & Differentiation*, **7**, 1589–1597.
- de Vries ACH, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. (2010) Molecular basis of juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*, **95**, 179–182.

- Wang J, Mizui M, Zeng L-F, Bronson R, Finnell M et al. (2016) Inhibition of SHP2 ameliorates the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, **126**, 2077–2092.
- Wang L, Tian Y, Yao X, Zhu Y, Cao W. (2014) Predicting grain yield and protein content in wheat by fusing multi-sensor and multi-temporal remote-sensing images. *Field Crops Research*, **164**, 178–188.
- Wascher TC, Lindeman JH, Sourij H, Kooistra T, Pacini G et al. (2011) Chronic TNF- α Neutralization Does Not Improve Insulin Resistance or Endothelial Function in “Healthy” Men with Metabolic Syndrome. *Molecular Medecine*, **17**, 189–193.
- Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N et al. (2005) Muscle-Specific Pten Deletion Protects against Insulin Resistance and Diabetes. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 1135–1145.
- Wilding JPH. (2014) The importance of weight management in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Clinical Practice*, **68**, 682–691.
- Wong GS, Zhou J, Liu JB, Wu Z, Xu X et al. (2018) Targeting wild-type KRAS-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition. *Nature Medicine*, **24**, 968–977.
- Wong JT, Kim PTW, Peacock JW, Yau TY, Mui AL-F et al. (2007) Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity. *Diabetologia*, **50**, 395–403.
- Woywodt A, Welzel J, Haase H, Duerholz A, Wiegand U et al. (1998) Cardiomyopathic Lentiginosis/LEOPARD Syndrome Presenting as Sudden Cardiac Arrest. *Chest*, **113**, 1415–1417.
- Wu D, Pang Y, Ke Y, Yu J, He Z et al. (2009) A Conserved Mechanism for Control of Human and Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation by Shp2 Tyrosine Phosphatase M Capogrossi, Ed. *PLoS ONE*, **4**, e4914.

- Wu H, Ballantyne CM. (2017) Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, **127**, 43–54.
- Wu TR, Hong YK, Wang X-D, Ling MY, Dragoi AM et al. (2002) SHP-2 Is a Dual-specificity Phosphatase Involved in Stat1 Dephosphorylation at Both Tyrosine and Serine Residues in Nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 47572–47580.
- Xu D, Liu X, Yu W-M, Meyerson HJ, Guo C et al. (2011) Non-lineage/stage-restricted effects of a gain-of-function mutation in tyrosine phosphatase *Ptpn11* (Shp2) on malignant transformation of hematopoietic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **208**, 1977–1988.
- Xu D, Zheng H, Yu W-M, Qu C-K. (2013) Activating Mutations in Protein Tyrosine Phosphatase *Ptpn11* (Shp2) Enhance Reactive Oxygen Species Production That Contributes to Myeloproliferative Disorder KD Bunting, Ed. *PLoS ONE*, **8**, e63152.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1821–1830.
- Yamashita H, Kotani T, Park J, Murata Y, Okazawa H et al. (2014) Role of the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2 in Homeostasis of the Intestinal Epithelium R Sugiura, Ed. *PLoS ONE*, **9**, e92904.
- Yang W, Klamann LD, Chen B, Araki T, Harada H et al. (2006) An Shp2/SFK/Ras/Erk Signaling Pathway Controls Trophoblast Stem Cell Survival. *Developmental Cell*, **10**, 317–327.
- Yang X, Tang C, Luo H, Wang H, Zhou X. (2017) Shp2 confers cisplatin resistance in small cell lung cancer via an AKT-mediated increase in CA916798. *Oncotarget*, **8**.
- Yang Z, Li Y, Yin F, Chan RJ. (2008) Activating PTPN11 mutants promote hematopoietic progenitor cell-cycle progression and survival. *Experimental Hematology*, **36**, 1285–1296.
- Yki-Järvinen H, Sammalkorpi K, Koivisto VA, Nikkilä EA. (1989) Severity, Duration, and Mechanisms of Insulin Resistance during Acute Infections*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **69**, 317–323.

- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z et al. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 131–138.
- You M, Flick LM, Yu D, Feng G-S. (2001) Modulation of the Nuclear Factor κ B Pathway by Shp-2 Tyrosine Phosphatase in Mediating the Induction of Interleukin (IL)-6 by IL-1 or Tumor Necrosis Factor. *J Biol Chem*, **276**, 9.
- You M, Yu D-H, Feng G-S. (1999) Shp-2 Tyrosine Phosphatase Functions as a Negative Regulator of the Interferon-Stimulated Jak/STAT Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 2416–2424.
- Yu Z-H, Xu J, Walls CD, Chen L, Zhang S et al. (2013) Structural and Mechanistic Insights into LEOPARD Syndrome-Associated SHP2 Mutations. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 10472–10482.
- Zhang R-Y, Yu Z-H, Zeng L, Zhang S, Bai Y et al. (2016) SHP2 phosphatase as a novel therapeutic target for melanoma treatment. *Oncotarget*, **7**.
- Zhang SQ, Tsiaras WG, Araki T, Wen G, Minichiello L et al. (2002) Receptor-Specific Regulation of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation by the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 4062–4072.
- Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G et al. (2004) Shp2 Regulates Src Family Kinase Activity and Ras/Erk Activation by Controlling Csk Recruitment. *Molecular Cell*, **13**, 341–355.
- Zhang W, Chan RJ, Chen H, Yang Z, He Y et al. (2009) Negative Regulation of Stat3 by Activating *PTPN11* Mutants Contributes to the Pathogenesis of Noonan Syndrome and Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 22353–22363.
- Zhao JJ, Cheng H, Jia S, Wang L, Gjoerup OV et al. (2006) The p110 isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 16296–16300.
- Zhao L, Guo M, Matsuoka T -a., Hagman DK, Parazzoli SD et al. (2005) The Islet Cell-enriched MafA Activator Is a Key Regulator of Insulin Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 11887–11894.

- Zhao L, Xia J, Li T, Zhou H, Ouyang W et al. (2016) Shp2 Deficiency Impairs the Inflammatory Response Against *Haemophilus influenzae* by Regulating Macrophage Polarization. *Journal of Infectious Diseases*, **214**, 625–633.
- Zheng H, Li S, Hsu P, Qu C-K. (2013) Induction of a Tumor-associated Activating Mutation in Protein Tyrosine Phosphatase *Ptpn11* (Shp2) Enhances Mitochondrial Metabolism, Leading to Oxidative Stress and Senescence. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 25727–25738.
- Zheng H, Yu W-M, Waclaw RR, Kontaridis MI, Neel BG et al. (2018) Gain-of-function mutations in the gene encoding the tyrosine phosphatase SHP2 induce hydrocephalus in a catalytically dependent manner. *Science Signaling*, **11**, eaao1591.