



HAL
open science

Etude des anomalies du métabolisme énergétique associées au syndrome de Noonan

Sophie Branka

► **To cite this version:**

Sophie Branka. Etude des anomalies du métabolisme énergétique associées au syndrome de Noonan. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30056 . tel-02923727

HAL Id: tel-02923727

<https://theses.hal.science/tel-02923727v1>

Submitted on 27 Aug 2020

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.



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
Sophie BRANKA

Le 16 juillet 2019

**Etude des anomalies du métabolisme énergétique associées au
syndrome de Noonan**

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

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Armelle YART

Jury

M. Didier Lacombe, Rapporteur

M. Jean-François Tanti, Rapporteur

M. Didier Pisani, Rapporteur

Mme Béatrice Cousin-Delarue, Examinatrice

Mme Armelle YART, Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens en premier à remercier les membres du jury qui ont consacré leur temps à évaluer mon travail de thèse. **Madame Béatrice Cousin** pour avoir accepté de présider mon jury, Messieurs **Didier Lacombe**, **Jean-François Tanti** et **Didier Pisani**, en tant que rapporteurs, pour avoir décortiqué et analysé le manuscrit de thèse et ainsi avoir eu une discussion enrichissante. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, **Audrey C.** et **Rodrigue R.**, de m'avoir orientée durant ces travaux de thèse.

Aussi, je veux remercier notre grand chef d'équipe, le **Pr. Philippe Valet** de m'avoir accueillie dans son laboratoire (euh...dans sa pâtisserie ?) durant ces trois années et demies. Toujours à l'écoute, votre compassion et votre humour nous permet de garder le sourire. Vos précieux conseils en réunion d'équipe m'ont permis d'être guidée au mieux. J'espère vivement continuer d'échanger avec vous.

Je voudrais maintenant te remercier **Armelle**. Tu as cru en mes capacités en Master 2 et tu as bien voulu m'accepter pour poursuivre en doctorat. La direction de ma thèse a été possible grâce à ton aide à juste dose, ce qui m'a apporté une autonomie très appréciable. Les moments précieux où nous échangeons ont permis à chaque fois d'orienter ce travail de thèse de la meilleure des manières. J'ai apprécié ton analyse critique très poussée de chaque résultat et la formation que tu m'as apportée m'a vraiment sensibilisée à la justesse scientifique. Je te souhaite le meilleur pour la suite et j'espère que nous conserverons des contacts au moins aussi riches que ceux que nous avons eus.

Cette thèse n'aurait pas pu se réaliser sans l'aide incontournable de mes co-équipiers. **Cédric**, je te remercie pour toutes tes idées lumineuses qui, à chaque fois, permettent d'éclairer le schmilblick et d'ouvrir de nouvelles perspectives. **Bernard**, même si tu es devenu parisien, je garderai toujours un bon souvenir de ma thèse grâce à tes blagues et à ton écoute hors pair. **Jean-Philippe**, merci pour tous tes conseils innovants et pertinents. **Sophie LG**, un grand merci pour toutes les expériences de calorimétrie que tu as menées afin de pouvoir réaliser ces travaux. **Isabelle**, je te remercie pour ton écoute, ta gentillesse et tes conseils avisés. Je pense aussi à mes grand(e)s sœurs/frères de labo, **Gwendoline**, **Xiaohui**, **Aïcha**, **Jean** et **Romain P.**,... j'étais la plus petite des doctorantes (on ne parle pas de la taille, hein Gwendo ?), vous m'avez guidée et je vous en remercie.

Un remerciement spécial pour toi, **Veronika**, ma co-bureau devenue amie. Tu as toujours été super avec moi, nos moments de rigolades et de « pauses thé » ont été essentielles pour moi. Tu as apporté énormément d'humanité dans mon travail et c'est avec émotion que je te laisse, chère alliée. Merci aussi à toi, **Enzo** (seahorse-man), ta bonne humeur légendaire et ton âme artistique ont laissé planer dans notre bureau un air exquis de douceur. Je vous souhaite à tous les deux une réussite certaine.

Un très grand merci à vous deux, **Ophélie** et **Nancy**, qui ont toujours été présentes au bon moment. **Ophélie**, je n'oublierai pas tous les moments à l'Oroboros que tu m'as consacré et toute la formation technique que tu m'as apportée en M2. Toujours efficace, tu as été essentielle à la réalisation de cette thèse. **Nancy**, ta gentillesse, tes conseils pertinents et ton dévouement ont été très importants pour moi. Sans oublier bien-sûr, mon vol chronique de ta clef USB...j'espère qu'elle tiendra le choc encore longtemps et je suis prête à te la racheter pour cher ! **Alizée, Johanna, Vanessa, Romain M.**, je vous remercie également pour votre aide précieuse. Et aussi les anciens **Simon, Elsa**,...

Alexandre L. et **Lucie F.**, je vous remercie pour le temps passé à comprendre et réaliser certaines de mes expériences. Merci aussi à **Marie-Adeline, Claire G.** et **Emeline** de vous être bien occupées de mes petites cellules.

Elodie...comment te remercier ? Je n'ai pas assez de mots. Sept années que nous nous connaissons maintenant, ma binôme de choc et amie ! Toutes nos études, nous nous sommes soutenues. Je n'en serais pas là si tu n'avais pas été présente pour moi (bien-sûr, on n'oublie pas Vanille !). D'un point de vue technique, je te suis aussi très reconnaissante d'avoir participé activement à ce projet de thèse avec toute ton expertise en microscopie. Les mito-tongries n'ont plus de secrets pour nous. **Mouin**, merci aussi d'avoir été présent pour moi. Nos joggings et ta positivité m'ont vraiment soulagée dans les moments difficiles. Ce qui ne changera pas, c'est notre amour pour les cacahuètes ! **Rana**, nous nous sommes connues en master et tu as toujours été compréhensive et sincère. Tu es une vraie amie. Merci de m'avoir soutenue pendant ma thèse. Je n'oublie pas toute la bande **Mélanie, Antoine, Typhaine, Marie, Loubna, Manel, Tiffany** and co... vous avez été top !

Je remercie aussi tous les **stagiaires (Laëtitia, Audrey, Clémence, Marie, Marine, Jonathan, ...)** que j'ai pu côtoyer et avec qui j'ai partagé de bons moments. En particulier **Julien C.** que j'ai encadré. Nous nous sommes tout de suite bien entendus et ton intelligence, ton grain de folie et ta bonne humeur ont vraiment été un coup d'accélérateur au cours de ma thèse. Ce stage a été bénéfique pour nous deux et a ouvert une nouvelle amitié.

J'en viens à te remercier **Fabien B.**, spécial big up ! Parce que si j'ai choisi de m'orienter vers la recherche, c'est grâce à toi. Le premier stage en laboratoire que j'ai effectué avec toi m'a vraiment donné le goût de la science et tu as été un véritable mentor jusqu'à présent.

Surya, mon amie, nous nous sommes serré les coudes en M2R et même si toi aussi, tu es devenue parisienne, nos échanges mushuesques et stitchesques ont toujours été très importants pour moi. Et nous n'avons pas fini ! (si tu vois ce que je veux dire...). Merci de ton soutien inconditionnel. Mes chères **Mélina et Suzon**, merci d'avoir eu un soutien sans failles au cours de ces années. Ma chère **Audrey B.**, merci aussi de m'avoir boostée quand il le fallait. Merci à **tous mes amis** de façon générale.

Je tiens à remercier ma famille, **taties et tontons, grands-parents, cousins et cousines**.

Enfin, je vous remercie **mes parents**, grâce à qui j'ai eu la force d'arriver jusque-là. Votre soutien à toutes épreuves a été parfait. Vous êtes parfaits.

A mes adorables grands-parents et à François, partis trop tôt

Résumé

“Impact de mutations de SHP2 associées au syndrome de Noonan sur le métabolisme énergétique”

Le syndrome de Noonan (SN) est une maladie génétique relativement fréquente (prévalence ≈ 1/2000) associant de multiples défauts développementaux (cardiopathies congénitales, retard de croissance, dysmorphie et prédisposition tumorale). Le SN et des syndromes apparentés, regroupés au sein de famille des Rasopathies, sont causés par des mutations d'acteurs ou de régulateurs de la voie de signalisation Ras-MAPK et partagent l'hyperactivation de cette voie comme origine physiopathologique (Tajan et al., 2018). Au-delà des altérations développementales, de récentes études ont souligné que les Rasopathies pouvaient être associées à des anomalies du métabolisme énergétique (Dard et al., 2018). En effet, les patients atteints de Rasopathies, aussi bien que différents modèles murins de ces maladies, présentent une dépense énergétique augmentée et une réduction de leur indice de masse corporelle et de leur adiposité (Leoni, et al. 2016 ; Oba et al, 2018, Tajan et al, 2014). Cependant, les mécanismes sous-jacents à ces altérations métaboliques sont encore mal compris.

Dans cette étude, nous avons tiré parti d'un modèle murin du SN, portant à l'état hétérozygote une mutation du gène codant SHP2 (SHP2^{D61G/+}) fréquemment retrouvée chez les patients SN. Nous avons observé que les souris SN affichaient une augmentation de leur dépense énergétique sans modification majeure de leurs prises hydrique et alimentaire ou de leur activité locomotrice spontanée. De plus, les souris SN ont une réduction de tous leurs dépôts adipeux, sont résistantes à l'obésité lorsque mises en régime riche en graisse, et présentent des modifications fonctionnelles de leurs tissus adipeux. De façon intéressante, nous avons également documenté une augmentation de la densité mitochondriale, de la biogenèse et de la respiration dans le tissu adipeux inguinal des souris SN, suggérant un phénomène de « beigisation ». En accord avec ces résultats, UCP1 est spécifiquement surexprimé dans ce tissu et les souris SN présentent un phénotype de résistance au froid. D'un point de vue mécanistique, l'expression de mutants de SHP2 associés au SN augmente la transdifférenciation de cellules adipeuses souches multipotentes humaines (hMADS) vers un phénotype beige, révélant un processus cellule-autonome. De plus, un traitement chronique des souris SN par un inhibiteur pharmacologique de MEK1 normalise l'expression génique des marqueurs de mitochondriogenèse et d'UCP1, traduisant un phénotype Ras-MAPK dépendant. De manière surprenante, dans certains tissus non adipeux (foie, muscle) de même que dans une lignée cellulaire fibroblastique exprimant des mutants SN, nous avons mesuré une diminution de la fonction et/ou de la biogenèse mitochondriales, en accord avec des travaux antérieurs (Lee et al., 2009). Cette contradiction apparente pourrait être liée aux capacités oxydatives différentes des tissus/cellules considérés. A l'appui de cette hypothèse, les souris SN présentent un décalage plus rapide du quotient respiratoire vers l'utilisation du glucose, soulignant une gestion différentielle de ce substrat.

Ainsi, cette étude révèle que le mutant de SHP2 associé au SN promeut des dysfonctions métaboliques complexes, ouvrant de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie. Au-delà des maladies rares, cela pourrait ouvrir de nouvelles pistes dans l'identification de mécanismes responsables de désordres métaboliques plus fréquents.

Abstract

“Impact of SHP2 mutations associated with Noonan syndrome on energy metabolism”

Noonan syndrome (NS) is a relatively frequent genetic disease (prevalence \approx 1/2000) associating multiple developmental defects (e.g. cardiopathies, growth delay, dysmorphism, tumor predisposition). NS and related disorders, gathered into the so-called family of Rasopathies, are caused by mutations of actors or regulators of the Ras-MAPK signaling pathway and share Ras-MAPK hyperactivation as a pathophysiological origin (Tajan et al., 2018).

Besides developmental defects, recent studies have highlighted that Rasopathies could be associated to energy metabolism dysfunction (Dard et al, 2018). Indeed, patients with Rasopathies, as well as several mouse models, display increased energy expenditure and reduced body mass index and adiposity (Leoni, et al. 2016; Oba et al, 2018, Tajan et al, 2014). However, the mechanisms underlying these metabolic alterations are misunderstood.

In this study, we took advantage of a well-established NS mouse model, carrying a SHP2 mutation (SHP2^{D61G/+}) often borne by NS patients. We observed that NS mice displayed increased energy expenditure without significant changes of food and water intake or their spontaneous locomotor activity. Moreover, NS mice have a reduction of all fat deposits. Interestingly, we documented an increase of mitochondrial density, biogenesis and respiration in inguinal adipose tissue of NS mice, suggesting a “beiging” phenomenon. Consistently, UCP1 was specifically overexpressed in this tissue and NS mice displayed a cold resistance phenotype. Expression on NS-causing mutants enhanced the transdifferentiation of human multipotent adipose derived stem cells (hMADs) toward “beiging”, highlighting a cell-autonomous process. Intriguingly, when expressed in a fibroblast cell line, NS-causing mutants resulted in decreased mitochondrial function and biogenesis, in accordance with a previous report (Lee et al, 2009). This suggests that NS-associated mutant could have different impacts on mitochondrial function depending on the cell type, which might be linked to different oxidative capacities. This hypothesis is also supported by a faster shift toward the use of glucose of the respiratory quotient of NS mice, highlighting possible changes in the management of this substrate.

This study reveals that NS-associated SHP2 mutant promotes complex metabolic dysfunctions, which could help to better understand the pathophysiology of this disease, but can also provide new insights into the knowledge of more frequent metabolic disorders.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION GENERALE	11
CONTEXTE : HISTOIRE ET BIOLOGIE DES MALADIES RARES	15
CHAPITRE I. LE SYNDROME DE NOONAN ET LES RASOPATHIES.....	18
1 LE SYNDROME DE NOONAN (SN).....	18
1.1 INTRODUCTION	18
1.2 TRAITS CLINIQUES DU SN	19
- <i>Cardiopathies</i>	19
- <i>Retard de croissance</i>	19
- <i>Dysmorphies cranio-faciales</i>	19
- <i>Autres symptômes</i>	21
1.3 DIAGNOSTIC ET VIE QUOTIDIENNE DES PATIENTS ATTEINTS DU SN.....	21
1.4 STRATEGIES THERAPEUTIQUES	22
1.5 GENETIQUE DU SN ET CONSEQUENCES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES MUTATIONS	23
- <i>La voie RAS/MAPK</i>	23
- <i>La protéine tyrosine phosphatase SHP2</i>	26
- <i>Mutations de SHP2</i>	27
- <i>Autres mutations</i>	30
2 RASOPATHIES	30
2.1 INTRODUCTION	30
2.2 SPECTRE CLINIQUE ET GENETIQUE.....	31
2.3 ATTEINTES METABOLIQUES : UN NOUVEAU TRAIT CLINIQUE ?	32
- <i>Anomalies de l'adiposité et du métabolisme lipidique</i>	32
- <i>Anomalies du métabolisme glucidique</i>	33
- <i>Anomalies du métabolisme énergétique</i>	33
CHAPITRE II. METABOLISME ENERGETIQUE ET MITOCHONDRIES, MOTEURS ENERGETIQUES DU VIVANT.....	34
1 METABOLISME ENERGETIQUE INTEGRE.....	34
1.1 METABOLISME GLOBAL ET FLEXIBILITE METABOLIQUE	34
1.2 DEPENSE ENERGETIQUE	35
1.3 REGULATION DE LA DEPENSE ENERGETIQUE	36
1.4 APPORTS ENERGETIQUES	37
2 METABOLISME ENERGETIQUE A L'ECHELLE CELLULAIRE	37
2.1 VOIES PRINCIPALES DU CATABOLISME.....	38
- <i>Métabolisme du glucose</i>	38
- <i>Métabolisme des lipides</i>	39
2.2 SENSEURS REGULATEURS DU METABOLISME CELLULAIRE.....	41
- <i>L'AMPK</i>	42
- <i>Autres</i>	43
3 LES MITOCHONDRIES, MOTEURS ENERGETIQUES DU VIVANT	44
3.1 INTRODUCTION : ORIGINE, STRUCTURE, FONCTION ET RENOUVELLEMENT DES MITOCHONDRIES	44
- <i>Origine des mitochondries</i>	44

-	<i>Structure et fonction des mitochondries</i>	45
-	<i>Renouvellement et dynamique des mitochondries</i>	46
3.2	MECANISTIQUE INTRINSEQUE A LA MITOCHONDRIE.....	47
-	<i>Introduction</i>	47
-	<i>Le couplage : chaîne de transport des électrons, complexes mitochondriaux, production d'ATP et consommation d'oxygène</i>	48
-	<i>Découplage mitochondrial : thermogenèse « non-frissonnante »</i>	50
3.3	ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES.....	52
-	<i>Mécanistique et protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale de fusion/fission</i>	52
-	<i>Implication des protéines de fusion (Mitofusines) et de fission (P-DRP1) dans la régulation du métabolisme mitochondrial et de la survie cellulaire</i>	54
-	<i>Les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales</i>	55
3.4	PHYSIOPATHOLOGIE ASSOCIEE AUX DEFAUTS MITOCHONDRIAUX.....	57
-	<i>Dynamique mitochondriale dans la physiopathologie</i>	57
-	<i>Exemples de maladies mitochondriales et conséquences physiopathologiques</i>	58
4	DEPENSE ENERGETIQUE ET MITOCHONDRIES : EXEMPLE DES RASOPATHIES	59
4.1	DEREGULATIONS ENERGETIQUES OBSERVEES DANS LES RASOPATHIES.....	59
4.2	DEREGULATIONS ENERGETIQUES LIEES A SHP2.....	61
CHAPITRE III. LES TISSUS ADIPEUX : IMPLICATION DANS LE METABOLISME ENERGETIQUE		63
1	LE TISSU ADIPEUX BLANC	63
1.1	LOCALISATION ANATOMIQUE, COMPOSITION ET DIFFERENCIATION.....	63
-	<i>Localisation</i>	63
-	<i>Composition</i>	64
-	<i>Différenciation</i>	65
1.2	FONCTIONS METABOLIQUES.....	66
-	<i>Stockage des acides gras</i>	66
-	<i>Production des acides gras : lipolyse</i>	70
1.3	AUTRES FONCTIONS (SOUTIEN, ISOLATION, ENDOCRINE).....	72
1.4	PLASTICITE.....	73
1.5	TERRITORIALITE ET DYSMORPHISME SEXUEL.....	73
2	LE TISSU ADIPEUX BRUN	74
2.1	LOCALISATION ANATOMIQUE, COMPOSITION ET DIFFERENCIATION.....	74
-	<i>Localisation</i>	74
-	<i>Composition</i>	75
-	<i>Différenciation</i>	75
2.2	FONCTION THERMOGENIQUE.....	76
2.3	ACTIVATION DU TISSU ADIPEUX BRUN.....	77
3	LE TISSU ADIPEUX BEIGE	79
3.1	LOCALISATION ANATOMIQUE, COMPOSITION ET APPARITION.....	79
-	<i>Localisation</i>	79
-	<i>Composition</i>	80
-	<i>Apparition : Différenciation vs Trans-différenciation</i>	81
3.2	FONCTION THERMOGENIQUE (UCP1 DEPENDANTE ET INDEPENDANTE).....	83
3.3	INDUCTEURS DE LA THERMOGENESE ADIPOCYTAIRE BEIGE.....	84
-	<i>Le froid, le tonus adrénergique et les peptides natriurétiques</i>	85
-	<i>Autres signaux inducteurs</i>	86
4	ROLE DES TISSUS ADIPEUX DANS LA REGULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE	87
4.1	ROLES DU TISSU ADIPEUX DANS L'OBESITE, L'INSULINO-RESISTANCE, LES LIPODYSTROPHIES ET LE CANCER.....	87
4.2	CAS DE LA LEPTINE.....	88
4.3	AMELIORATIONS ET ALTERATIONS METABOLIQUES LIEES A LA THERMOGENESE DU TISSU ADIPEUX.....	89

-	<i>Améliorations métaboliques</i>	89
-	<i>Altérations métaboliques : cas du cancer</i>	90
4.4	STRATEGIES A VISEE THERAPEUTIQUE	91
-	<i>Traitement de l'obésité et des désordres associés</i>	91
-	<i>Traitement d'autres pathologies</i>	92
-	<i>Nouvelles stratégies thermogéniques</i>	93
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	95
	MATERIELS ET METHODES	125
	DISCUSSION GENERALE : HYPOTHESES ET PERSPECTIVES	133
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
	ANNEXE 1	169
	ANNEXE 2	195

Liste des figures

Introduction bibliographique :

Figure 1 : Illustrations historiques de maladies génétiques rares	17
Figure 2 : Traits cliniques du SN.....	20
Figure 3 : La voie de signalisation Ras-MAPK.....	25
Figure 4 : Activation de SHP2 (<i>adapté de Tajan et al., 2015</i>)	29
Figure 5 : Modulation hormonale de la dépense énergétique.....	36
Figure 6 : Voies métaboliques générales de la cellule.....	40
Figure 7 : Implication de l'AMPK dans le métabolisme cellulaire	43
Figure 8 : Structure de la mitochondrie (<i>adapté de « ALBERT » ; general-biology/cellular-respiration-and-other-metabolic-processes/mitochondrial-structure</i>).....	45
Figure 9 : Programme d'expression génique induisant la biogenèse mitochondriale.....	47
Figure 10 : Chaîne de Transport des Electrons (CTE).....	50
Figure 11 : Découplage de la CTE	51
Figure 12 : Dynamique mitochondriale : mécanismes de fusion et de fission (<i>adapté de Tilokani et al., 2018</i>)	53
Figure 13 : Les « Mitochondria-Associated-Membranes » (MAM).....	55
Figure 14 : Production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales	56
Figure 15 : Dépôts adipeux blancs chez l'Homme et chez la souris (<i>adapté de Bartness et al., 2014</i>)	63
Figure 16 : L'adipocyte blanc et la Fraction Stromale Vasculaire (FSV)	64
Figure 17 : Cascade de différenciation adipocytaire blanche.....	66
Figure 18 : Entrée des acides gras dans l'adipocyte.....	68
Figure 19 : Production du TAG avec estérification des acides gras	69
Figure 20 : Lipogenèse de novo	70
Figure 21 : Inducteurs de lipolyse	71
Figure 22 : Détails moléculaires de la lipolyse	72
Figure 23 : Localisations du tissu adipeux brun chez l'Homme et chez la souris (<i>adapté d'Ikeda et al., 2018</i>)	74
Figure 24 : Composition de l'adipocyte brun	75
Figure 25 : Cascade de différenciation adipocytaire brune.....	76
Figure 26 : Régulation adrénérergique du tissu adipeux brun (<i>adapté de Cao et al., 2004</i>).....	78
Figure 27 : Régionalisation de la beigisation au sein du dépôt adipeux sous-cutané inguinal (<i>adapté de Barreau et al., 2016</i>).....	79
Figure 28 : Constitution du tissu adipeux beige.....	80
Figure 29 : Origines, étapes et marqueurs de différenciation beige	83
Figure 30 : Inducteurs de beigisation (<i>adapté de Harms et Seale, 2013</i>)	86
Figure 31 : Actions de la leptine	89
Tableau 1 : Altérations bioénergétiques dans les Rasopathies (<i>adapté de Dard et al., 2018</i>)	62

Résultats expérimentaux :

Figure 1 : Les souris SN ont une augmentation de leur dépense énergétique normalisée.....	100
Figure 2 : Augmentation de la densité, de la biogenèse et de la respiration mitochondriale dans le tissu adipeux inguinal des souris SN	102
Figure 3 : UCP1 est spécifiquement surexprimé dans le tissu adipeux inguinal et les souris SN semblent présenter un phénotype de résistance au froid	105
Figure 4 : Le phénotype beige induit par l'expression de mutants de SHP2 associés au SN semble être un mécanisme cellule-autonome	109
Figure 5 : Le phénomène de beigisation du tissu adipeux SC SN semble dépendant de la voie Ras-MAPK	110
Figure 6 : L'expression d'une mutation SN de SHP2 dans des cellules fibroblastiques altère la fonction mitochondriale.....	112
Figure 7 : L'expression d'une mutation SN de SHP2 semble affecter la balance fusion/fission mitochondriale.....	116

Figure Supplémentaire 1 : Les souris SN âgées de 10-15 semaines ont une augmentation de leur dépense énergétique normalisée, mais moins marquée que les souris plus âgées	123
Figure Supplémentaire 2 : Augmentation de l'expression de gènes hypoxiques et tendance à l'augmentation du lactate extracellulaire des cellules MEFs SN SHP2-D61del.....	124

Discussion générale :

Figure A : Les souris SN maintenues en régime gras ne présentent pas d'augmentation plus forte de la dépense énergétique qu'en régime standard	135
Figure B : Diminution de l'activité du complexe II mitochondrial dans le foie de souris SN à jeun	135
Figure C : La dépense énergétique des souris SN semble être plus sensible à un traitement à la leptine que les souris WT, sans modification significative de la prise alimentaire	138
Figure D : Schéma explicatif de l'action de la leptine en conditions normales, SN et SN/Db	139

Liste des abréviations

ADP : Adénosine di-phosphate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ATP : Adénosine tri-phosphate
CFC : syndrome Cardio-Facio-Cutané
CTE : Chaîne de Transport des Électrons
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
GAP : GTPases-activating proteins
GEF : Guanine Exchange Factor
GH : Growth hormone = Hormone de croissance
GTPase : Guanosine TriPhosphatase
hMADS : Human Multipotent Adipose-derived Stem cells
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
IMC : Indice de Masse Corporelle
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
MAM : Mitochondria-Associated Membranes
MAPK : Ras-Mitogen-Activated Protein Kinases
Mfn : Mitofusine
NF1 : Neurofibromatose de type I
OXPHOS : Phosphorylations oxydatives mitochondriales
PG : Péri-Gonadique
PGC1 α/β : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma coactivator α/β
PKA : Protéine kinase A
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
Prdm16 : PR domain zinc finger protein 16
Pref1 : Preadipocyte factor 1
PTPN11 : Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type11
QR : Quotient Respiratoire
RAS : Rat sarcoma
RE : Réticulum Endoplasmique
ROS : Reactive Oxygen Species = Espèces Réactives de l'Oxygène
RTK : Récepteur à activité Tyrosines Kinases
SC : Syndrome de Costello
SC : Sous-Cutané
SHP2 : Src Homology domain Phosphatase 2
SN : Syndrome de Noonan
SN-LM : Syndrome de Noonan avec Lentigines Multiples
TAG : Triacylglycérol
UCP1 : UnCoupling Protein 1
WT : Wild-type

Introduction Générale

La plupart des maladies métaboliques comme le diabète ou l'obésité sont aujourd'hui un fléau qui touche plusieurs millions de personnes et dont la recherche scientifique ne cesse de progresser pour faire face à cet enjeu de santé publique. Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ces maladies, il est nécessaire de comprendre comment l'organisme gère l'utilisation des différents substrats (carbohydrates, lipides, ...) par les tissus afin de maintenir une homéostasie énergétique.

De façon intéressante, l'étude des maladies rares a pris de l'ampleur au cours de ces dernières années grâce aux avancées de la génétique, mais aussi parce que, partageant souvent des traits cliniques avec des maladies plus communes, elles représentent des modèles d'exploration pour comprendre la physiopathologie. C'est notamment le cas de la famille des Rasopathies, maladies génétiques rares affichant, en plus de multiples anomalies congénitales, des désordres énergétiques importants. Comprendre la physiopathologie des anomalies métaboliques associées aux Rasopathies peut donc améliorer notre connaissance de ces maladies, mais aussi avoir des retombées dans le domaine de maladies métaboliques plus communes. Dans le premier chapitre de l'introduction de cette thèse, nous abordons donc les aspects cliniques, génétiques et biochimiques des Rasopathies, notamment de la plus fréquente et mieux étudiée d'entre elles, le syndrome de Noonan (SN). Puis, nous décrivons les principales anomalies métaboliques associées aux Rasopathies, notamment les dérégulations du métabolisme énergétique et la réduction d'adiposité. Cela nous amène, dans un deuxième chapitre, à décrire l'importance de la balance énergétique en décortiquant notamment les voies métaboliques intracellulaires permettant de la maintenir à l'équilibre. De plus, le fonctionnement capital des mitochondries, organites cellulaires au carrefour de ces voies métaboliques et moteurs énergétiques de la cellule, est mis en avant. Un troisième chapitre s'attache à présenter les tissus adipeux en tant qu'organes à part entière et pouvant grandement influencer l'état métabolique général de l'organisme, leur fonctionnement et leur action systémique. Nous présentons également l'avancée des travaux à visée thérapeutique, et plus particulièrement l'effet thermogénique des tissus adipeux brun et beige sur le métabolisme énergétique.

Dans la partie expérimentale de ce manuscrit, nous présentons les travaux de thèse qui ont ainsi visé à comprendre l'impact métabolique d'une mutation fréquemment retrouvée chez les patients atteints du SN. Pour réaliser cette étude, nous avons tiré parti d'un modèle murin SN bien établi et récapitulant toutes les caractéristiques de la maladie. Nous avons alors mis en évidence que les souris SN présentaient une dépense énergétique accrue par rapport à des animaux sains, sans modifications majeures des paramètres généraux pouvant affecter la balance énergétique (prise alimentaire et hydrique ou activité locomotrice spontanée). Une analyse par résonance magnétique de la composition corporelle des souris SN révèle que ce phénotype d'augmentation de dépense énergétique est accompagné d'une diminution de l'adiposité et plus précisément, d'une réduction de tous les dépôts adipeux. Nous nous sommes donc penchés sur l'aspect énergétique du tissu adipeux SN pouvant éventuellement expliquer la modification de la dépense énergétique. Nous avons mis en évidence une augmentation de la densité, de la biogenèse et de la respiration mitochondriale, spécifiquement dans le tissu adipeux sous-cutané inguinal des animaux. Cette caractéristique s'accompagne d'un phénomène de beigisation avec notamment l'augmentation de la protéine mitochondriale découplante et thermogénique, UCP1. En accord avec ces résultats, nous avons montré que les souris SN semblaient être résistantes au froid. Ainsi, la beigisation du tissu adipeux pourrait participer à l'augmentation de la dépense énergétique des souris SN. Mécanistiquement, les pré-adipocytes SN montrent un défaut/retard de différenciation et le processus de beigisation semble être « cellule-autonome ». Enfin, nous avons montré que la beigisation et l'augmentation de la biogenèse mitochondriale associée étaient dépendantes de la voie Ras-MAPK, cascade de signalisation intracellulaire, particulièrement responsable des défauts développementaux de cette maladie et d'autres Rasopathies. Contre toute attente, l'analyse d'autres tissus métaboliquement actifs comme le foie et le muscle squelettique montre à l'inverse une tendance à la baisse du nombre de mitochondries et de la respiration basale mitochondriale pour le foie. Corroborant ces résultats, nous montrons que l'expression exogène d'un mutant SN de SHP2 dans des cellules fibroblastiques, « non adipeuses », induit également une réduction de la fonction mitochondriale (biogenèse, respiration et phénomène de fission), suggérant des effets différentiels des mutants de SHP2 sur la biogenèse et la fonction mitochondriale selon le tissu considéré.

La confrontation de ces résultats à la littérature, alimentée par des données préliminaires, nous amène à discuter, dans une dernière partie de cette thèse, des perspectives de ce travail, concernant une possible gestion différentielle des substrats énergétiques dans les Rasopathies, les causes et conséquences physiopathologiques de la beigisation du tissu adipeux et d'autres anomalies métaboliques associées à ces maladies, l'impact des dysfonctions mitochondriales, et enfin, les possibles retombées thérapeutiques.

En conclusion, ces travaux de thèse permettent de mieux comprendre la physiopathologie du SN et des autres Rasopathies, en caractérisant les anomalies du métabolisme énergétique associées, ce qui pourrait avoir des retombées concernant le suivi et la prise en charge des patients. Au-delà des maladies rares, ces travaux pourraient certainement ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension de maladies métaboliques plus fréquentes, et peut être à plus long terme, dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques, pour le traitement de l'obésité par exemple.

Introduction Bibliographique

Contexte : histoire et biologie des maladies rares

A l'échelle mondiale, l'ensemble des maladies non transmissibles (maladies cardiovasculaires, cancers, obésité, diabète et autres maladies métaboliques majeures) sont devenues un enjeu de santé publique et constituent aujourd'hui la première cause de décès « prématurés » par an à travers le monde (71% soit 41 millions ; OMS, 2018). En parallèle, les maladies transmises par des virus ou bactéries restent également un défi car elles provoquent de nombreux décès et pour certaines d'entre elles, le développement de la résistance aux médicaments antimicrobiens conduit à renforcer la menace qu'elles constituent. A l'inverse, les maladies rares restent peu étudiées et sont caractérisées par une prévalence de moins d'une naissance sur deux mille regroupant en majorité des maladies de cause génétique. C'est pourquoi, au cours de l'histoire, les maladies rares sont longtemps restées incomprises et ont été source de mystère du fait de leur rareté et de la nature polymalformative de nombre d'entre elles.

Parmi ces maladies, on peut citer quelques exemples historiques. Des études sur l'un des plus influents pharaons d'Égypte, Akhénoton (aussi appelé Amenotep IV, époux de Nefertiti), montrent qu'il semblait être atteint d'un trouble génétique rare qui fut transmis à sa descendance et qui pourrait être le syndrome de Marfan. Les représentations d'Akhénoton et de certains de ses enfants mettent en avant un buste court, un crâne, un cou, des bras, des mains et des pieds de forme particulièrement allongée, ainsi qu'un faible tonus musculaire (Figure 1 A,B) (Hawass et al., 2010). Plus d'actualité, l'acteur Peter Mayhew, décédé le 30 avril 2019, qui incarnait le personnage Chewbacca du film « Star Wars » était aussi atteint du syndrome de Marfan. Cette maladie, bien que peu commune, pourrait pourtant être à l'origine de la fin de la XVIII^{ème} dynastie égyptienne de par une mort prématurée de la descendance du pharaon Akhénoton. Des siècles plus tard, les maladies rares tourmentent toujours et sans explications rationnelles, l'aspect malformatif des personnes atteintes de ces maladies était à l'époque considéré comme un avertissement envoyé par la divinité. Ambroise Paré, célèbre chirurgien du seizième siècle, affirmait d'ailleurs que des malformations chez l'enfant relevaient de « relations infidèles et coupables de la mère avec le diable, dont la semence était pervertie ». Au dix-huitième siècle, l'intérêt scientifique pour les maladies rares est clair. On peut citer l'exemple du compagnon du roi Stanislas (roi déchu de Pologne et

dernier duc de Lorraine) qui mourut à l'âge de vingt-trois ans pour cause de nanisme et qui fut autopsié par le médecin du roi à sa demande (Histoire des sciences médicales-Tome XXX-n°3-19). Alors considérées comme des anomalies de la nature, les personnes atteintes seront à la fois craintes et moquées, souvent montrées comme bêtes de foire, tel Elephant man, en réalité atteint du syndrome de Protée, ou les enfants à tête de lion, atteints de formes rares d'hypertrichose congénitale. Les maladies rares atteignent aussi d'éminents personnages, fortement causales de leur style artistique pour certains ; ce fut le cas de Henri de Toulouse-Lautrec, un peintre français du dix-neuvième siècle, atteint de Pycnodysostose caractérisée entre autres par une petite taille, une réduction de la longueur des membres par rapport aux standards de l'adulte, un visage déformé, une tête volumineuse et une métachondromatose (altérations des cartilages). Cette maladie entraîna Henri de Toulouse-Lautrec à se renfermer sur lui-même et sombrer dans l'alcoolisme pour oublier la douleur, ce qui influença très certainement le caractère de ses œuvres, notamment à cause d'hallucinations visuelles, de crises de délirium et d'appréciation de lui-même. Par exemple, dans sa célèbre toile "Le Bal du Moulin Rouge", il se représenta avec un aspect très déformé (Figure 1 C) (Markatos et al., 2018). Il s'exprimait sur ce sujet en disant « Toujours et partout, la beauté peut s'exprimer dans la disgrâce ».

Après tant de spéculations sur la cause diabolique de ces altérations, les origines des maladies rares commencent à être étudiées. Pour la plupart, elles sont causées par des mutations génétiques ou par des anomalies de nombre, de structure ou de répartition chromosomique. La difficulté de compréhension de ces maladies réside alors dans la variabilité phénotypique induite par un grand nombre d'altérations génétiques. Ce n'est aussi qu'au XIX^{ème} siècle que les premiers principes de transmission génétique sont relatés par Gregor Mendel à travers des relations de dominance-récessivité entre allèles. Ainsi, le caractère récessif de certaines de ces maladies rares est à l'origine de leur apparition soudaine, tandis que la dominance explique les formes familiales avec une transmission de génération en génération. La découverte de l'ADN comme support de l'hérédité a aussi permis ensuite l'identification de mutations responsables de ces maladies génétiques.

Aujourd'hui, malgré leur définition de prévalence rare, il existe au moins 7000 maladies rares, concernant au final trente millions de patients en Europe (Orphanet, 2018). Cependant, du fait du faible nombre de cas pour chaque maladie, de l'atteinte de nombreux systèmes de

l'organisme, et de ce fait, du manque de médecins spécialistes, la prise en charge des patients atteints de maladies rares est complexe. C'est pourquoi au cours des dix dernières années, plusieurs plans nationaux maladies rares (PNMR) ont été mis en place pour améliorer le diagnostic et structurer la prise en charge des patients, avec notamment la création de centres de compétence ou de référence pour de nombreuses familles de maladies génétiques.

Par ailleurs, faute notamment d'intérêts économiques, la recherche sur les maladies rares est longtemps restée confidentielle, freinant le développement de traitements spécifiques. La société et la communauté scientifique se sont cependant emparées de la question, avec par exemple l'essor du Téléthon et plus récemment plusieurs programmes européens (E-rare), ceux-ci permettant l'attribution d'un soutien financier aux équipes européennes de recherche dans le but d'effectuer une recherche translationnelle et coopérative entre les états membres. De la recherche sur ces maladies rares, considérant que dans la plupart des cas, elles partagent de nombreux symptômes avec des maladies plus communes, il ressort qu'elles peuvent avoir des retombées plus vastes quant à la découverte de nouveaux mécanismes éventuellement redondants dans un contexte de maladies plus communes. Ainsi, l'industrie pharmaceutique se découvre un intérêt pour ces pathologies, qui constituent des « expériences de la nature » pour évaluer l'impact systémique et à long terme de la dérégulation du produit d'un gène.

Le vaste champ de recherche et de questionnements généré par la rareté de ces maladies constitue finalement un caractère précieux certain.

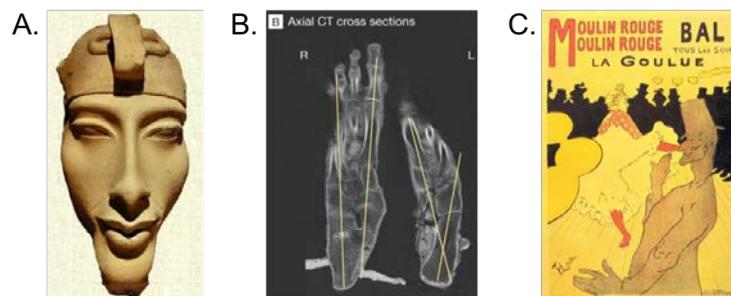


Figure 1 : Illustrations historiques de maladies génétiques rares

(A) Sculpture du faciès allongé du pharaon Akhénaton

(B) Radiographie des pieds déformés de la descendance d'Akhénaton (Toutankhamon)
(Hawass et al., 2010)

(C) « Bal du moulin rouge », *Henri de Toulouse-Lautrec*

CHAPITRE I. Le syndrome de Noonan et les Rasopathies

La famille des Rasopathies, comprenant le syndrome de Noonan (SN) et des syndromes apparentés, constitue une des plus grandes familles de maladie génétiques polymalformatives. Associant de multiples atteintes congénitales, mais aussi des anomalies métaboliques d'identification plus récente, ces maladies partagent comme cause génétique des mutations affectant la voie de signalisation Ras-Mitogen-Activated Protein Kinase (Ras-MAPK). Dans cette première partie introductive, nous détaillerons les traits cliniques du syndrome de Noonan (SN) ainsi que ses origines génétiques et sa physiopathologie, avec un focus particulier sur l'importance de la dérégulation de la voie Ras-MAPK. Ensuite, nous élargirons notre propos à l'ensemble des Rasopathies, en nous intéressant plus particulièrement aux anomalies métaboliques identifiées dans ces différents syndromes.

1 Le Syndrome de Noonan (SN)

1.1 Introduction

Le syndrome de Noonan (SN, OMIM 163950), décrit pour la première fois en 1968 par la cardio-pédiatre Jacqueline Noonan, est une pathologie génétique polymalformative relativement fréquente dont la prévalence est estimée entre 1/1000 et 1/2500 naissances. De transmission autosomique dominante, on distingue des formes familiales et *de novo*. Le SN se caractérise par une triade phénotypique regroupant des cardiopathies congénitales (80%) avec sténose pulmonaire et cardiomyopathie hypertrophique, un retard de croissance et des anomalies squelettiques, et une dysmorphie cranio-faciale, à laquelle viennent s'ajouter de nombreux autres symptômes comme une prédisposition tumorale, des anomalies cutanées ou encore, un retard à l'apprentissage. Cette triade phénotypique est retrouvée, avec une pénétrance et une sévérité variables, dans d'autres syndromes apparentés (SN avec lentigines multiples, syndrome de Costello, syndrome Cardio-Facio-Cutané, neurofibromatose de type I). L'ensemble de ces maladies forme la famille des Rasopathies ainsi nommée suite à l'identification de mutations sur des gènes causant ces pathologies et codant des acteurs ou des régulateurs de la voie de signalisation RAS-Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)

(Tartaglia et al., 2011). Ce n'est qu'au début des années 2000 que la principale cause du SN a été identifiée, des études génétiques ayant en effet révélé que la majorité des patients atteints du SN portait des mutations ponctuelles faux sens du gène *PTPN11* codant la protéine SHP2 ((Tartaglia et al., 2001) ; (Tartaglia et al., 2006)). Outre *PTPN11*, une douzaine de gènes ont cependant été recensés comme étant causaux de cette maladie : *SOS1*, *SOS2*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *BRAF*, *MEK1*, *SHOC2*, *CBL*, *RIT1*, *LZTR1* ; le point commun de ces mutations étant d'agir sur certains acteurs et régulateurs de la voie de signalisation intracellulaire RAS-MAPK.

1.2 Traits cliniques du SN

(Figure 2)

- **Cardiopathies**

Dans 80 à 90% des cas, les patients SN sont atteints d'une altération cardiaque. Le défaut le plus commun retrouvé chez ces patients est une sténose des valves pulmonaires (60-70%) suivi d'une cardiomyopathie hypertrophique (20-30%). Des altérations comme un défaut atrio-septal (10-30%), un défaut du canal atrioventriculaire (5-15%) ou encore des anomalies de la valve mitrale (5-10%) ont aussi été rapportées. Des défauts vasculaires sont plus rarement décrits (Pierpont & Digilio, 2018).

- **Retard de croissance**

La deuxième altération associée au SN est un retard staturo-pondéral, retrouvé dans 80% des cas. Bien que la taille et le poids des nourrissons restent dans la norme à la naissance, la croissance devient rapidement réduite et le paramètre de la taille passe en dessous du 3^{ème} centile dès les premières années de vie (Cessans et al., 2016).

Ce retard de croissance s'accompagne souvent d'une atténuation pubertaire ainsi qu'un retard de développement osseux. A noter que certains patients rattrapent pourtant ce retard de croissance à la fin de l'adolescence (Tartaglia et al., 2011).

- **Dysmorphies cranio-faciales**

Les patients atteints du SN présentent également une dysmorphie du crâne, du cou et du visage. Les caractéristiques du SN incluent un grand front, une particularité au niveau des yeux avec une augmentation de la distance entre les deux yeux (hypertélorisme), une ouverture des paupières affectée avec des fentes palpébrales tombantes et une chute des paupières

supérieures (ptosis). La position des oreilles est basse et/ou en rotation postérieure et les patients ont un cou court et large à l'aspect palmé ainsi qu'une implantation postérieure basse des cheveux.

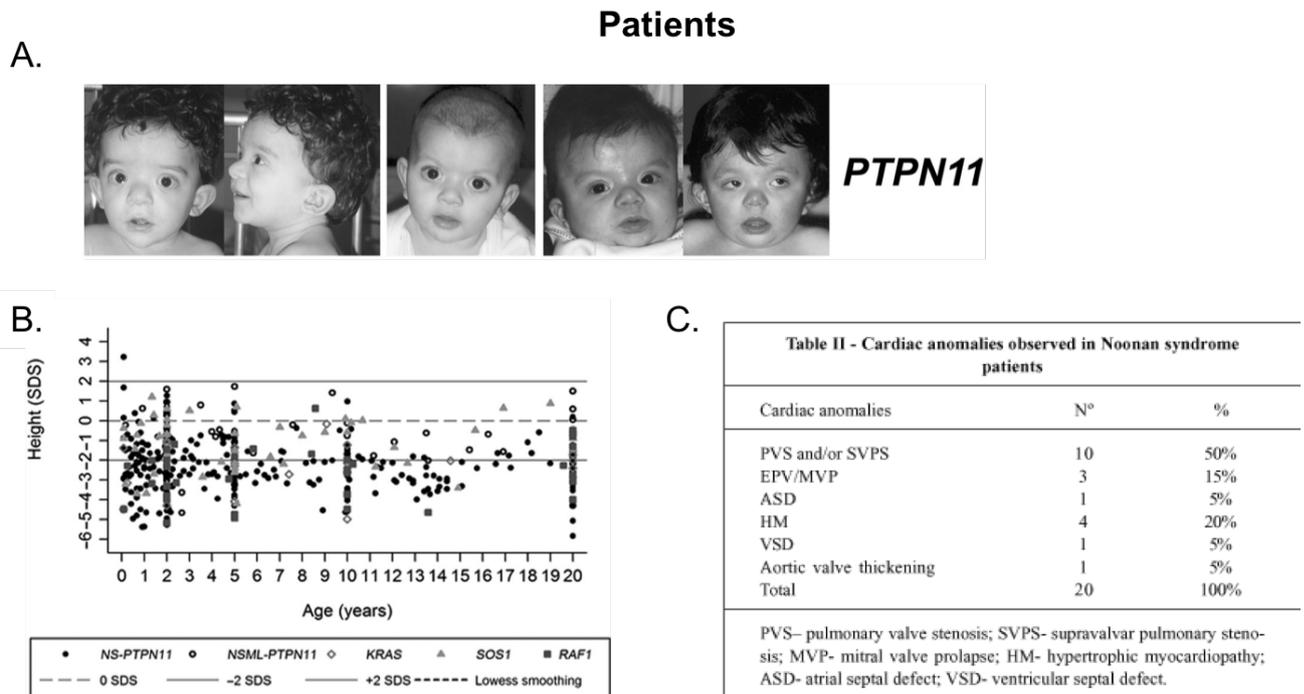


Figure 2 : Traits cliniques du SN

- (A) Photographies de patients atteints du SN avec une mutation du gène *Ptpn11* présentant une dysmorphie faciale (Tartaglia et al., 2011)
- (B) Taille réduite des patients atteints du SN quel que soit leur âge, leur sexe ou leur génotype (Cessans et al., 2016)
- (C) Augmentation d'anomalies cardiaques chez les patients SN (Bertola et al., 2000)

Désordres hématopoïétiques

Outre cette triade phénotypique, certaines mutations associées au SN (*PTPN11* ou *KRAS*) induisent aussi des problèmes d'hématopoïèse. En effet, bien que peu de patients soient affectés, il existe une augmentation notable de l'apparition de leucémie juvénile myélomonocytaire chez les enfants touchés par le SN, définie par une prolifération déraisonnée de la lignée cellulaire myéloïde ((Tartaglia et al., 2011) ; (Cavé et al., 2016)). De façon intéressante, des mutations de *PTPN11* sont également retrouvées dans 30% des cas de JMML sporadiques.

- **Autres symptômes**

Les patients atteints du SN peuvent présenter de multiples autres signes comme une difficulté à manger qui se résorbe dès l'âge de 18 mois mais qui, dans les cas les plus sévères, implique l'installation d'une sonde gastrique.

On note aussi qu'un retard à l'apprentissage peut affecter certains patients ; 30 à 50% d'entre eux montrent en effet un déficit cognitif. Par exemple, une étude montre que ces patients peuvent avoir un retard lors d'un exercice de rappel d'une liste d'éléments ainsi qu'une défaillance de reconnaissance visuelle ou spatiale lors de ces tests de mémoire à long terme (Alfieri et al., 2011). De façon générale, les désordres cognitifs sont variables d'un patient à l'autre.

Par ailleurs, des anomalies squelettiques peuvent apparaître telles qu'un cubitus valgus, des défauts des vertèbres ou encore, une scoliose.

Aussi, certains patients présentent une absence de testicule(s) dans les bourses (cryptorchidie). De façon générale chez les patients masculins SN (avec ou sans cryptorchidie), on retrouve une réduction significative du taux de certaines hormones sexuelles, traduisant une dysfonction des cellules de Sertoli qui pourrait être à l'origine de leur infertilité (Moniez et al., 2018).

Enfin, il a été montré que le SN serait associé à une baisse de l'activation plaquettaire, en lien avec un défaut de coagulation sanguine, expliquant d'une part un risque hémorragique accru ainsi que l'apparition fréquente d'hématomes au niveau des membres inférieurs ((Nugent et al., 2018) ; (Bellio et al., 2019, en cours de publication)).

1.3 Diagnostic et vie quotidienne des patients atteints du SN

Depuis la découverte du SN dans la fin des années soixante et encore aujourd'hui, le diagnostic du SN repose essentiellement sur les caractéristiques précédemment décrites et un système de score a été établi pour permettre de déceler plus facilement la maladie. Néanmoins, il n'est pas forcément évident de diagnostiquer le SN car les symptômes sont variables entre les patients et évoluent différemment en fonction de l'âge. Par exemple, le retard de croissance n'apparaît qu'après quelques années de vie alors que les dysmorphies cranio-faciales s'atténuent en fin d'adolescence (Tartaglia et al., 2011). Aussi, si la suspicion du SN est forte, il peut être détecté en pré-natal par ultrasonographie mais ne peut s'appuyer

que sur une éventuelle cardiomyopathie hypertrophique, une malformation cranio-faciale, ou un hygroma kystique (Croonen et al., 2013). Avec la découverte des mutations génétiques responsables du SN, le diagnostic clinique peut maintenant, et doit, être confirmé par des tests génétiques. Aussi, des analyses technologiques de pointe permettent l'identification de syndromes par reconnaissance faciale. C'est le cas de la technologie "DeepGestalt", qui utilise des algorithmes basés sur la quantification de similarités d'une centaine de syndromes et qui est capable d'identifier le SN sur plusieurs centaines d'images (Gurovich et al., 2019).

D'autre part, une partie des adultes SN ne possèdent pas de suivi médical du fait d'un non diagnostic dû au peu de recul sur la maladie ou bien d'un mode de vie convenable. Néanmoins, une enquête montre que le pourcentage de personnes qui vivent avec un partenaire ou bien qui ont une expérience de vie commune est nettement inférieur à la population générale. De la même façon, la proportion d'adultes SN ayant obtenu un diplôme d'études supérieures est moindre mais le nombre de personnes ayant un emploi reste équivalent au reste de la population (Binder et al., 2012). Enfin, plusieurs personnes SN rapportent des altérations motrices, une diminution de la force musculaire et des douleurs dans leur vie quotidienne. A travers une étude basée sur des consultations cliniques et des questionnaires, les douleurs les plus fréquemment ressenties par les patients SN se localisent au niveau musculaire et articulaire affectant plus particulièrement leurs jambes (Leoni et al., 2019). Les quelques citations de patients SN (ou de leurs parents) qui suivent permettent alors d'illustrer de façon très concrète leurs ressentis (Croonen et al., 2016) :

« Quand j'étais enfant, je pleurais la nuit à cause de douleurs dans mes jambes. Le docteur appelait cela des douleurs de croissance. C'est tellement grave que le rhumatologue me reconnaît maintenant »

« Marcher était très ardu pour lui ; après une courte distance il était toujours fatigué »

« J'ai des difficultés à me rappeler des choses »

1.4 Stratégies thérapeutiques

En ce qui concerne les approches thérapeutiques actuellement utilisées, les patients atteints de défauts cardiaques congénitaux subissent souvent une chirurgie afin de corriger les malformations des valves ou encore, l'hypertrophie ventriculaire avec une myectomie.

Certains patients sont aussi traités par des β -bloquants, ce qui semble améliorer la fonction diastolique ainsi que le remodelage ventriculaire. En revanche, pour le retard de croissance, un traitement à l'hormone de croissance est en général utilisé mais son efficacité reste débattue, ce qui pourrait être relié dans certains cas à son insensibilité. Au-delà de ces stratégies thérapeutiques déjà mises en place, de nouvelles approches semblent être prometteuses. C'est notamment le cas de molécules pharmacologiques visant à normaliser le niveau d'activation de voies de signalisation mises en jeu. Aussi, des stratégies pharmacologiques visant à rétablir directement la fonction normale de la protéine mutée sont en cours de développement. Cependant, des effets secondaires et des mécanismes de résistance pourraient exister en réponse à ces molécules (Annexe : Tajan et al., 2018).

1.5 Génétique du SN et conséquences physiopathologiques des mutations

La moitié des patients atteints de SN présentent des mutations du gène *PTPN11* codant SHP2. Pour la moitié des autres personnes atteintes par le SN, on dénombre également une douzaine de gènes responsables de la maladie (*SOS1*, *RAF1*, *SOS2*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *SHOC2*, *CBL*, *RIT1*, *LZTR1*), dont la fréquence d'apparition reste moindre. L'ensemble de ces gènes codent pour des acteurs ou des régulateurs de la voie de signalisation RAS-MAPK-ERK1/2. Après avoir rapidement présenté cette voie de signalisation et ses fonctions, nous nous intéresserons plus particulièrement à SHP2. Ensuite, nous détaillerons l'impact biochimique et physiopathologique des mutations associées au SN.

- **La voie RAS/MAPK**

La voie de signalisation intracellulaire RAS-MAPK intervient généralement en réponse à un signal provenant d'un récepteur membranaire associé à une activité tyrosine kinase, comme les RTK (Récepteur à activité Tyrosines Kinases) et permet ainsi de relayer un signal du milieu extérieur à la cellule (de type hormone, facteur de croissance, cytokine) en un message lisible et utilisable par la cellule. Une fois le RTK actif, la protéine adaptatrice GRB2 est recrutée au récepteur puis mobilise une GEF (« Guanine Exchange factor » ; ici, de la famille des SOS) pour permettre l'échange nucléotidique du RAS-GDP en RAS-GTP, forme active de la protéine RAS. A noter qu'il existe quatre isoformes différents de cette protéine (HRAS, NRAS, KRAS4a et KRAS4b). Sous sa forme liée au GTP, RAS est capable d'activer

différents effecteurs, dont la kinase RAF, initiant alors une cascade de phosphorylations protéiques (RAF → MEK → ERK). Les protéines ERK1/2 activées prennent ensuite le relais pour stimuler des effecteurs, la plupart desquels étant des facteurs de transcription nucléaires. Afin de revenir à sa forme inactive, la RAS liée au GTP est soumise à l'action de « GTPases-activating proteins » (GAP) (Figure 3).

La voie RAS-MAPK est une voie ubiquiste et impliquée dans de nombreux processus cruciaux de l'organisme tels que la prolifération et la croissance cellulaire, le développement et l'homéostasie de l'organisme. L'observation développementale de plusieurs modèles invertébrés et murins ayant des modifications génétiques de la voie RAS-MAPK a ainsi permis de mettre en avant l'implication directe de cette voie dans le développement de l'organisme. Ces aspects sont plus amplement détaillés dans une revue présentée en annexe (Tajan et al., 2018).

A côté de l'importance cruciale de la voie RAS-MAPK dans le développement, elle a également été impliquée dans de nombreuses fonctions endocrines et métaboliques. Elle peut effectivement avoir un rôle de médiateur en réponse à des hormones telles que l'insuline, la leptine ou l'hormone de croissance mais elle peut aussi participer au métabolisme glucidique et lipidique hépatique par exemple (Lawan & Bennett, 2017). On peut alors citer une étude qui démontre que le KO spécifique d'ERK2 dans le foie de souris induit une résistance à la prise de poids, une stéatose hépatique, une élévation de la glycémie et une diminution de la réponse à l'insuline (Kujiraoka et al., 2013). De plus, un KO total d'ERK1 chez la souris induit une réduction de l'adiposité avec une diminution du nombre d'adipocytes, une résistance à l'obésité induite par un régime gras et une protection contre l'insulino-résistance. La culture in vitro de ces adipocytes révèle une réduction des marqueurs de différenciation adipeuse tels que aP2, PPAR γ , l'adiponectine ou encore la leptine (Bost et al., 2005). Cependant, une autre étude complémentaire montre que la perte totale d'ERK1 chez la souris induit au contraire une prise de poids et une résistance à l'insuline sous régime gras. Dans ce dernier modèle, ce phénotype métabolique délétère est associé à une phosphorylation d'ERK2 dans le foie, ce qui n'était pas le cas dans l'étude de 2005 (Khan et al., 2017). Il n'existe à ce jour aucune explication évidente à ces phénotypes opposés mais il semblerait qu'ils soient attribués à la composition du régime. Par ailleurs, la perte d'ERK1 dans des souris obèses et déficientes en leptine (*ob/ob*) amène à une augmentation de l'insulino-sensibilité associée à

une augmentation de la captation de glucose musculaire, une protection contre la stéatose hépatique et une diminution des transcrits de marqueurs pro-inflammatoires dans le tissu adipeux (Jager et al., 2011).

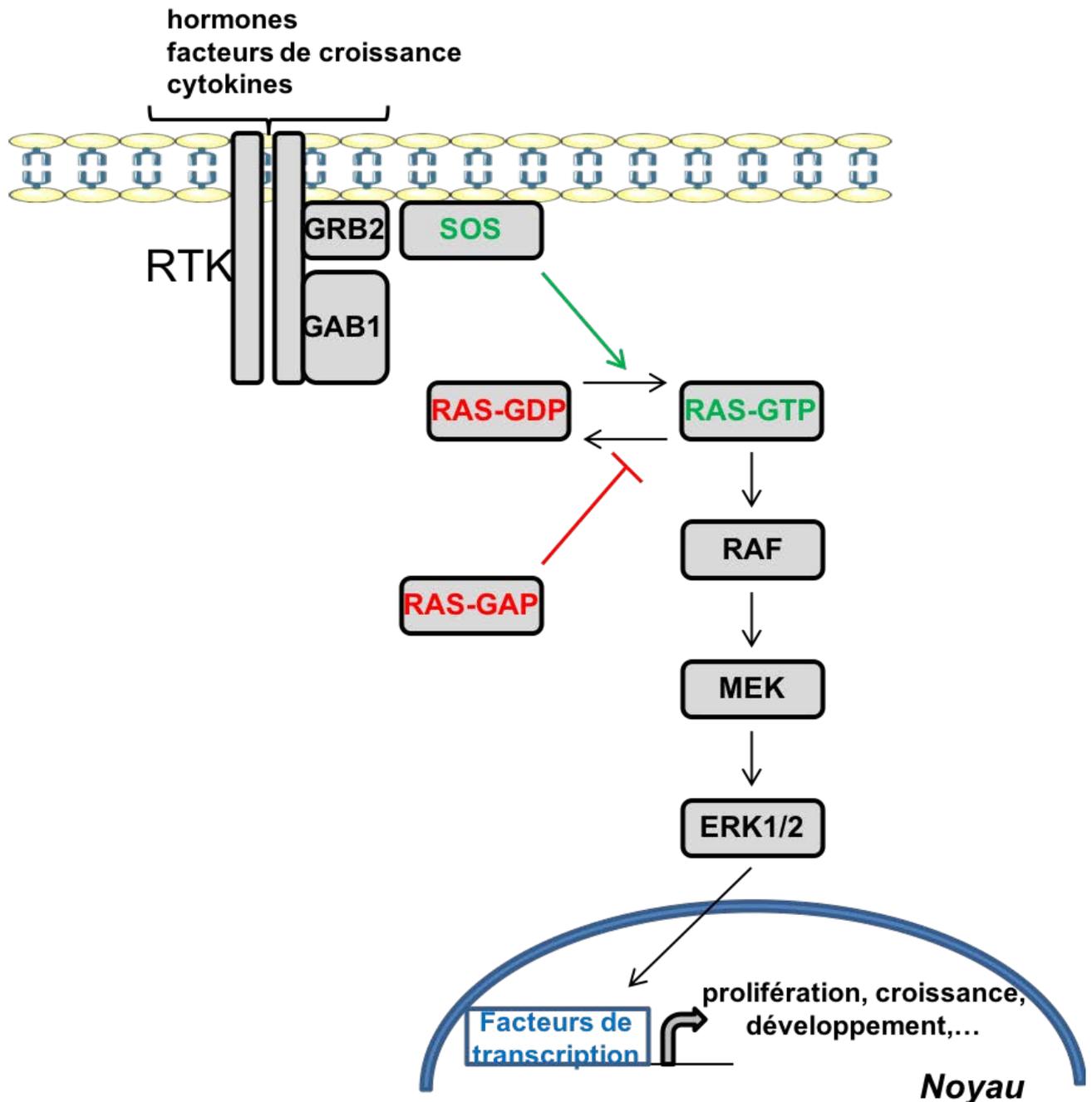


Figure 3 : La voie de signalisation Ras-MAPK

- La protéine tyrosine phosphatase SHP2

Le gène *PTPN11*, situé sur le chromosome 12, code une protéine tyrosine phosphatase (PTP) ubiquiste appelée SHP2 (Src Homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2) qui est essentielle au cours du développement et qui est conservée sous forme d'orthologues entre les espèces, des vers aux mammifères. SHP2 est composée de deux domaines régulateurs SH2 en N-ter, capables de lier des tyrosines phosphorylées situées sur des activateurs, et d'un domaine catalytique PTP en C-ter, permettant la déphosphorylation de substrats sur leurs résidus tyrosine (Figure 4). Contrairement aux autres phosphatases ayant généralement des fonctions inhibitrices des voies de signalisation intracellulaires, la fonction la mieux décrite de SHP2 est de promouvoir l'activation de la voie RAS-MAPK. Plus globalement, la protéine SHP2 est impliquée dans la régulation de voies de signalisation intracellulaires ubiquistes et essentielles au bon développement et à l'homéostasie de l'organisme (survie, prolifération, croissance, migration, morphogenèse, métabolisme) (Tajan et al., 2015).

Grâce à de nombreux modèles animaux de délétion globale de SHP2, il a été montré que la présence de la protéine SHP2 était absolument essentielle au bon développement de l'organisme. Pour pallier la létalité précoce de ces modèles et ainsi mieux comprendre l'implication de SHP2 dans le développement de chaque tissu, des modèles de knockouts tissus spécifiques ont été mis au point, notamment chez la souris, révélant des rôles majeurs pour SHP2 dans le développement de nombreux tissus/organes (e.g. cerveau, os, foie, muscle, intestin, rein). Ses effets pléiotropiques sont liés à son rôle dans la régulation fine de flux de signalisation en réponse à de nombreux facteurs de croissance, cytokines et hormones. En plus de la voie RAS-MAPK, SHP2 régule aussi les voies PI3K-Akt, Jak-STAT, mais selon le contexte génétique et environnemental, son implication dans leur modulation n'est pas encore très claire. Il est intéressant de noter que les altérations développementales observées sont dépendantes de RAS pour la plupart des modèles cités ci-dessus (Tajan et al., 2015).

Au-delà de ses rôles développementaux, la protéine SHP2 agit de façon complexe à divers niveaux de la sphère métabolique, comme l'attestent les anomalies métaboliques sévères (obésité, défaut d'adipogenèse, résistance à la leptine, à l'insuline...) relatées dans de nombreux modèles murins d'inactivation tissu-spécifique de SHP2 ((Zhang et al., 2004) ; (Princen et al., 2009) ; (Nagata et al., 2012) ; (Xu et al., 2014)). Par exemple, une inactivation

de SHP2 dans le foie de souris entraîne une amélioration de l'insulino-sensibilité et de la tolérance au glucose, et une résistance à l'obésité en régime obésogène ((Matsuo et al., 2010) ; (Nagata et al., 2012)). Par contre, son invalidation dans le muscle provoque une insulino-résistance, révélant la contribution de mécanismes différents selon le tissu (Princen et al., 2009). Son invalidation dans le cerveau résulte en une obésité consécutive à une hyperphagie, en lien avec une dérégulation de la réponse à la leptine ((Zhang et al., 2004) ; (Banno et al., 2010)). Son rôle au niveau du tissu adipeux reste controversé puisque l'invalidation de son gène dans un modèle AdipoQ-Cre n'induit pas de phénotype (Bettaieb et al., 2011), tandis que sa délétion dans un modèle aP2-Cre résulte en une lipodystrophie sévère avec une adipogenèse altérée ainsi qu'une mort précoce. Ce phénotype serait dû à une inhibition de l'activation de la protéine p38 conduisant à la stabilisation de sa cible p300 et par conséquent, une augmentation de l'expression de PPAR γ pour jouer son rôle pro-adipogénique (He et al., 2013). A l'appui de ces observations, dans une lignée cellulaire adipocytaire (3T3-L1), une étude montre qu'une surexpression de SHP2, résulte en une différenciation adipogénique augmentée. L'utilisation d'un ARN interférant pour abolir l'expression de SHP2 conduit à une inhibition de la différenciation, notamment avec la suppression totale de l'expression d'un régulateur majeur de l'adipogenèse, PPAR γ (Uehara et al., 2007).

- Mutations de SHP2

Les mutations de *PTPN11*, ayant été les premières identifiées comme cause du SN et étant les plus fréquentes, ont également fait l'objet du plus grand nombre d'études. Ainsi, d'un point de vue biochimique, il a été mis en évidence que les mutations de *PTPN11* associées au SN étaient de type *gain de fonction* et induisaient une augmentation d'activité de SHP2 (Figure 4). De multiples études ont démontré que ces formes mutées induisaient une hyperactivation de la voie RAS-MAPK dans de nombreux modèles ((Tartaglia et al., 2001) ; (Tartaglia et al., 2006) ; (Araki et al., 2004)). Afin de comprendre la mécanistique associée à la physiopathologie du SN, plusieurs modèles cellulaires et animaux ont été nécessaires. L'expression de protéines mutées dans des modèles cellulaires mais aussi l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites de patients (iPSC) ont permis de comprendre comment les mutations altéraient la signalisation et les fonctions cellulaires.

Au sein du gène *PTPN11*, la mutation D61G a été la plus étudiée du fait de sa haute fréquence chez les patients SN. Ainsi en 2004, l'équipe de BG. Neel a été la première à décrire qu'une souris portant à l'état hétérozygote cette mutation (souris Knock-in *Ptpn11*^{D61G/+}) présentait les traits canoniques du SN : retard de croissance, anomalies cranio-faciales, cardiopathie (Araki et al., 2004). Différentes études, sur ce modèle et d'autres, ont ensuite exploré en détail la physiopathologie de chaque atteinte. Ainsi, Araki et al. montrent que des embryons de souris portant la mutation D61G présentent des défauts des valves cardiaques, via notamment une hyperactivation de la voie de signalisation RAS-MAPK (ERK1/2), mécanisme retrouvé dans un autre modèle exprimant la mutation K79R spécifiquement dans le cœur ((Araki et al., 2004) ; (Araki et al., 2009) ; (Nakamura et al., 2007)).

Comme chez les humains atteints par le SN, le modèle de souris *Ptpn11*^{D61G/+} présente une réduction de la taille et du poids corporel, avec une préservation des proportions morphologiques globales. En 2012, De Rocca Serra-Nédélec et al., montrent dans ce même modèle murin que le retard de croissance associé au SN est dû à une résistance à l'hormone de croissance (GH ; growth hormone). En effet, l'hyperactivation de ERK induite par la mutation de SHP2 induit une inhibition du relargage de l'IGF1 (insulin-like growth factor 1) via la GH (Serra-Nédélec et al., 2012). Plus récemment, d'autres travaux de l'équipe ont révélé des altérations du processus de différenciation chondrocytaire au niveau de la plaque de croissance, là encore en lien avec l'hyperactivation de RAS-MAPK, comme contribuant au retard de croissance (Tajan et al., 2018).

Aussi, le crâne de ces souris est significativement plus court que celui des WT, l'intervalle entre les yeux est plus élevé et elles présentent une apparence faciale en forme « triangulaire » caractérisée par un museau large et aplati (Araki et al., 2004). Ces anomalies peuvent être corrigées par l'inhibition de la voie RAS-MAPK au cours de la gestation (Nakamura et al., 2009).

En 2004, Araki et ses collaborateurs ont également montré que ce modèle murin *Ptpn11*^{D61G/+} présentait des désordres myéloprolifératifs modérés dès cinq mois de vie avec une augmentation significative du nombre de neutrophiles et de lymphocytes totaux. L'expression ciblée de certains mutants spécifiquement dans la lignée myéloïde suffit à induire des défauts plus ou moins marqués de la lignée hématopoïétique, pouvant aller jusqu'à la myéloprolifération (Pandey et al., 2017). Cependant, plus récemment, des travaux montrent que des mutations activatrices de *Ptpn11* dans les cellules du microenvironnement de la

moelle osseuse de souris suffisent à promouvoir le développement et la progression d'un syndrome myéloprolifératif. En effet, les mutations des cellules mésenchymales souches et des progéniteurs causent une production excessive de la chimiokine CCL3, impliquée dans le recrutement de monocytes. Via la libération d'IL-1 β et possiblement de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes, les cellules souches deviennent hyperactives, conduisant à une hyperprolifération ((Dong et al., 2016) ; (Dong et al., 2017)). Cependant, la mécanistique associée au syndrome myéloprolifératif et aux leucémies juvéniles aiguës myéloïdes retrouvées chez quelques patients est encore débattue quant à une possible activation de la voie Ras-MAPK ou bien de la voie STAT.

En 2014, une équipe montre que le modèle murin SN associé à la mutation D61G présente des déficiences de l'apprentissage spatial dépendantes de l'hippocampe et un déficit de la potentialisation à long terme de l'hippocampe, associés à une dérégulation de l'excitation synaptique (Lee et al., 2014). Ces données confirment des observations antérieures faites sur un modèle de drosophile exprimant des mutants hyperactifs de SHP2, qui présente des défauts de mémoire à long terme (Pagani et al., 2009). Des anomalies d'expression de récepteur synaptiques ont été proposées comme causes à ce phénotype (Oh et al., 2017).

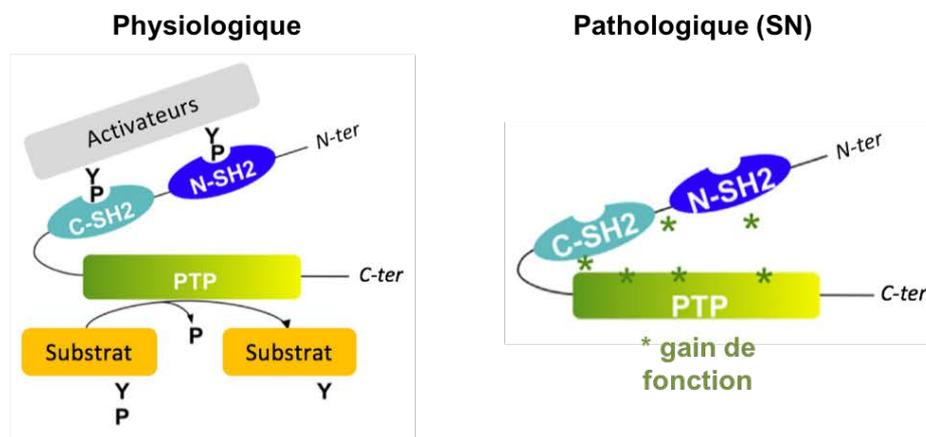


Figure 4 : Activation de SHP2 (adapté de Tajan et al., 2015)

- (A) Physiologique : SHP2 est composé d'un domaine catalytique PTP et de deux domaines régulateurs SH2. Lorsque les domaines SH2 interagissent avec des activateurs phosphorylés sur tyrosine, la protéine adopte une conformation ouverte, ce qui permet une déphosphorylation de substrats phosphorylés sur des motifs tyrosines.
- (B) Pathologique (SN) : Une cinquantaine de mutations SN « gain de fonction », présentes sur les domaines SHP2 ou PTP, exacerbent l'activité phosphatase de SHP2, notamment en induisant une ouverture constitutive de la protéine.

- Autres mutations

Le deuxième gène le plus fréquemment muté dans le SN est *SOS1* (10% des cas), codant une RAS-GEF. Les mutations de *SOS1* sont des gains-de-fonction entraînant une hyperactivation de la voie RAS-MAPK, associées à une haute prévalence d'anomalies ectodermiques (Tartaglia et al., 2007). En comparaison aux individus porteurs de mutations du gène *PTPN11*, les patients ayant des mutations de *SOS1* montrent une plus forte fréquence de sténose pulmonaire mais sont moins atteints par un défaut cardiaque atrio-septal (Roberts et al., 2007).

Un peu moins fréquemment, des mutations du gène *RAF1* sont retrouvées chez 3 à 5% des patients SN, qui code une sérine-thréonine kinase qui phosphoryle un maillon de la voie Ras-MAPK. Une étude montre notamment dans un modèle murin portant une mutation de *RAF1* associée au SN que les animaux développent une hypertrophie cardiaque et des défauts de croissance sévères (Wu et al., 2012).

Les autres mutations représentent le pourcentage restant et induisent des symptômes caractéristiques du SN avec une sévérité variable. Toutefois, la moindre fréquence de ces mutations rend les corrélations phénotypes/génotypes plus difficiles, et des études supplémentaires sont encore nécessaires pour comprendre les spécificités de chacune de ces mutations.

2 Rasopathies

2.1 Introduction

Comme évoqué en introduction, le SN fait partie d'une famille plus large de syndromes, regroupés sous le terme de Rasopathies. Avec une incidence cumulée d'environ une naissance sur mille, ces maladies partagent avec une pénétrance et une sévérité variable les mêmes traits cliniques que le SN, et sont tous causés par des mutations d'acteurs ou de régulateurs de la voie Ras-MAPK. Les similitudes et différences entre ces différents syndromes, de même que leur physiopathologie, ont fait l'objet d'une revue, récemment publiée dans *Endocrine Reviews* intitulée « The RASopathy Family : Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway », présentée en annexe 1, et ne seront donc pas détaillées dans ce chapitre (Tajan et al., 2018). Après avoir présenté succinctement les

différentes Rasopathies, nous détaillerons les anomalies métaboliques récemment décrites dans ces syndromes, qui ont constitué les fondations de ce travail de thèse.

2.2 Spectre clinique et génétique

Dans le cas du syndrome de Noonan avec lentigines multiples (SN-LM), 1 personne sur 100.000 est affectée. Le SN-LM est allélique avec le SN, dans la mesure où 85 % des patients présentent une mutation sur le gène *PTPN11*. Toutefois l'impact biochimique de ces mutations est différent, résultant en une baisse de l'activité catalytique de SHP2, avec des conséquences fonctionnelles encore mal comprises. Il présente des caractéristiques distinctes du SN telles que des lésions pigmentaires multiples (appelées lentigines) ou encore, une surdité pour 20% des patients. La vaste majorité des patients SN-LM présente plutôt une cardiomyopathie hypertrophique. Néanmoins, le défaut de croissance est moins prononcé que chez les patients atteints du SN. Pour le syndrome Cardio-Facio-Cutané (CFC), majoritairement causé par des mutations de BRAF ou MEK, on retrouve les caractéristiques du SN mais les anomalies ectodermiques sont plus élevées. Le syndrome de Costello (SC) est causé par des mutations germinales activatrices de HRAS codant un membre de la sous-famille des petites GTPases monomériques RAS. Comme la plupart des Rasopathies, des altérations développementales sont retrouvées chez ces patients, mais elles sont souvent plus sévères. De plus, une des caractéristiques du SC est un risque tumoral très élevé et un défaut cranio-facial plus prononcé que dans les autres Rasopathies. Par ailleurs, bien que la Neurofibromatose de type 1 (NF1, causée par des mutations du gène codant la Neurofibromine) soit la deuxième Rasopathie la plus fréquente après le SN avec une incidence d'une naissance sur trois mille, elle ne ressemble que partiellement au SN. En effet, on retrouve des manifestations cardiaques rares, des taches pigmentaires, des malformations osseuses et des tumeurs bénignes telles que des neurofibromes par exemple.

Ces disparités s'expliquent par les différents types de mutations induisant un défaut biochimique de la protéine associée plus ou moins prononcé. Elles semblent aussi s'expliquer d'une part par le fait que les différents types de mutations n'impactent pas de la même façon la voie RAS-MAPK, certaines mutations étant plus hyperactivatrices que d'autres ou ayant des effets limités à certains tissus ou très ubiquistes. D'autre part, bien que la voie RAS-MAPK ait été incriminée dans la majorité des défauts observés, notamment grâce à de nombreux

modèles animaux et stratégies génétiques, des mécanismes indépendants de la voie RAS-MAPK sont également à l'origine de certains traits de ces maladies. Par exemple, une hyperactivation de la voie de signalisation PI3K-AKT a été rapporté dans le SN-LM et a été associée à l'hypertrophie des cardiomyocytes ((Edouard et al., 2010) ; (Marin et al., 2011)). Dans le cas du SC, une dérégulation de la PI3K a directement été liée au phénotype d'hypertension (Schuhmacher et al., 2008). Dans le SN, l'hyperactivation de PI3K-AKT a aussi été retrouvée dans les cellules hématopoïétiques et a été associée aux leucémies juvéniles aiguës myélomonocytiques (Mohi et al., 2005). Toutefois, une hypophosphorylation de STAT3 a également été décrite dans ces leucémies apparaissant dans le SN (Zhang et al., 2009).

2.3 Atteintes métaboliques : un nouveau trait clinique ?

Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons les aspects métaboliques, récemment décrits, associés aux Rasopathies. En effet, outre les anomalies développementales sévères qu'un défaut de la voie Ras-MAPK engendre et à l'égal du SN, de récentes études montrent également que les Rasopathies sont associées à des défauts du métabolisme glucidique, lipidique et de l'adiposité mais aussi, du métabolisme énergétique.

- **Anomalies de l'adiposité et du métabolisme lipidique**

Plusieurs études rapportent que les patients atteints du SN et d'autres Rasopathies présentent un indice de masse corporelle (IMC) plus bas que la population générale, et une moindre propension au surpoids et à l'obésité ((Binder et al., 2012) ; (Malaquias et al., 2012) ; (Cessans et al., 2016)).

De façon intéressante, les travaux de Tajan et al., utilisant un modèle murin mimant le SN-LM, révèle que les souris présentent un phénotype métabolique particulier avec une réduction du poids corporel et de l'adiposité associée à une altération de la différenciation adipocytaire, ainsi qu'une résistance à l'obésité induite par un régime gras (Tajan et al., 2014).

Une étude regroupant des patients atteints du SC révèle qu'ils présentent une élévation de leur cholestérol sanguin (Leoni et al., 2016). Très récemment, une autre étude montre que les souris HRAS^{G12S/+} sont résistantes à l'obésité sous régime riche en graisses et qu'elles développent une stéatose hépatique. Lorsque ces souris sont soumises au jeûne, une élévation sanguine d'acides gras à longues chaînes de type acylcarnitines a été observé, ce qui

laisse penser que l'oxydation mitochondriale des lipides est altérée dans ce modèle (Oba et al., 2018).

- **Anomalies du métabolisme glucidique**

Une étude italienne réalisée chez onze patients atteints du SC (homme, femmes et âges confondus) a récemment montré qu'ils présentaient une hypoglycémie (Leoni et al., 2016). De plus un modèle murin récapitulant les caractéristiques du SC (HRAS^{G12S/+}), lorsque soumis à un régime riche en graisse, présente une meilleure tolérance au glucose que des animaux contrôles, probablement secondaire à une moindre prise de masse grasse. Par ailleurs, un modèle de souris mimant le SN-LM, portant la mutation T468M de SHP2 de façon ubiquiste, présente également une amélioration de la tolérance au glucose et de l'insulino-sensibilité, là encore en lien, au moins en partie, avec l'adiposité réduite des animaux (Tajan et al., 2014). Concernant le SN, une étude menée au laboratoire révèle également une légère hypoglycémie à jeun chez des patients SN, mais de façon surprenante, ces patients présentent également les signes d'une intolérance au glucose lors d'un test d'hyperglycémie provoquée orale. Ce phénotype, dont les mécanismes physiopathologiques sont en cours d'investigation, est également retrouvé dans le modèle murin *Ptpn11*^{D61G/+} (cf. annexe 2).

- **Anomalies du métabolisme énergétique**

Différentes études ont rapporté des dérégulations du métabolisme énergétiques dans plusieurs Rasopathies, soulignant l'implication de la voie RAS-MAPK dans la bioénergétique. Cet aspect sera détaillé dans la deuxième partie de cette thèse après que nous ayons détaillé les grandes notions du métabolisme énergétique (cf. Chapitre II.4).

Conclusion (chapitre I) :

En conclusion de cette première partie d'introduction, au-delà des altérations développementales du SN et de la famille des Rasopathies, les données le plus récentes révèlent que ce sont également des pathologies métaboliques. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, pour certaines altérations responsables de ces maladies, la bibliographie soulève leur implication dans la régulation de la fonction mitochondriale, centrale énergétique de la cellule.

CHAPITRE II. Métabolisme énergétique et mitochondries, moteurs énergétiques du vivant

L'homéostasie énergétique est essentielle à la survie des espèces et notamment, à la modulation du poids corporel. Elle représente une balance permanente entre apports et dépenses et elle est très finement régulée par des stimuli hormonaux par exemple. Il existe toutefois une variabilité interindividuelle qui est dépendante de multiples facteurs. Par ailleurs, l'oxydation des substrats nécessaires à la gestion métabolique des tissus est permise par diverses voies intracellulaires, constituant notamment l'apport énergétique des mitochondries.

1 Métabolisme énergétique intégré

1.1 Métabolisme global et flexibilité métabolique

Le métabolisme énergétique global est caractérisé par la balance des apports et des dépenses énergétiques, nécessaire au maintien des fonctions vitales de l'organisme. L'équation énergétique est donc positive lorsque les apports sont supérieurs aux dépenses et elle est à l'inverse négative quand la dépense devient plus élevée que les apports (Galvani & Ravussin, 2008). En condition physiologique, l'équilibre de cette balance est dépendant de nombreux facteurs (âge, sexe, activité, etc...) mais aussi de modifications de l'environnement de l'organisme (jeûne, nourriture, température, stress...). L'adaptation permanente de l'organisme aux variations de ces paramètres définit la flexibilité métabolique, nécessaire au maintien de l'homéostasie. La sédentarité, le genre ou l'ethnie de l'individu, ou encore la fonte musculaire due au vieillissement peuvent prédisposer à une inflexibilité métabolique dans laquelle l'adaptabilité à oxyder des substrats pour mobiliser de l'énergie devient moindre. Au contraire, l'activité physique augmente la flexibilité métabolique ((Weyer et al., 1999); (Bergouignan et al., 2012) ; (Rynders et al., 2018)). De plus, des désordres métaboliques tels que l'obésité, l'insulino-résistance et le diabète de type 2 ont été associés à une inflexibilité métabolique se traduisant par un transport de glucose et une oxydation de substrats altérés dans les différents organes (Kelley & Mandarino, 2000). Il est intéressant de noter que certaines mutations génétiques prédisposent à une balance énergétique positive, affectant notamment la régulation de l'appétit et favorisant l'apparition de l'obésité. C'est par

exemple le cas pour des souris déficientes pour le gène codant la leptine (souris ob/ob), hormone satiétogène et activatrice de la dépense énergétique (cf. *Chapitre III*).

1.2 Dépense énergétique

La dépense énergétique d'un organisme est constituée de différentes composantes que sont le métabolisme de base, l'activité physique et, pour les homéothermes, la thermorégulation. L'énergie métabolisée représente finalement la différence entre l'énergie absolue contenue dans les substrats utilisés (carbohydrates, lipides, protéines, alcool) et la perte de cette énergie dans les fécès et l'urine (Hall et al., 2010). Il est possible de calculer la dépense énergétique grâce à l'utilisation de cages métaboliques, que ce soit chez le rongeur ou chez l'homme, par une technique de calorimétrie indirecte qui permet de mesurer l'échange de gaz en soustrayant l'apport en O₂ consommé pour brûler les substrats et le volume de CO₂ produit. De plus, la détermination du quotient respiratoire (QR) chez le mammifère permet de voir la proportion de substrats oxydés (Valeurs de référence : Carbohydrates = 1 et Lipides = 0,7). Bien qu'encore controversé, ce paramètre est intimement corrélé au poids corporel ou bien à la proportion de masse maigre ou grasse de l'individu.

Le métabolisme de base est défini par la dépense énergétique minimale nécessaire pour maintenir les fonctions vitales de l'organisme. Elle est mesurée sur vingt-quatre heures, au repos, et à thermoneutralité. Le métabolisme basal est propre à chaque individu puisqu'il dépend principalement de la proportion de masse maigre (foie, cerveau, cœur, reins, muscles) et en particulier du pourcentage de masse musculaire.

Outre la dépense énergétique quotidienne représentée par le métabolisme basal, d'autres facteurs interviennent dans la dépense énergétique. On les classe alors en deux grands groupes que sont l'activité physique volontaire et l'activité quotidienne non liée à l'exercice (marche, travail, posture, etc...). Ainsi, l'activité non liée à l'exercice volontaire peut varier de 2000kcal/jour entre deux individus selon leur mode de vie. Chez un homme sédentaire par exemple, cette proportion représente en moyenne 15% de la dépense énergétique journalière.

De plus, pour les organismes homéothermes, la composante de thermorégulation pour maintenir une température corporelle constante contribue de façon importante à la dépense énergétique. Elle est cependant contrée par le port de vêtements chez l'humain, ce qui induit

une mise à thermoneutralité locale. A l'inverse, de nombreuses études récentes ont révélé l'importance de la thermogénèse dans la physiologie mais aussi dans de nombreux processus physiopathologiques, des résultats très variables étant obtenus selon que les souris de laboratoire sont maintenues à température standard (21°C, soit en dessous de leur zone de thermoneutralité) ou à thermoneutralité ((Levine, 2007) ; (Garland et al., 2011) ; (Ganeshan et Chawla, 2017)).

1.3 Régulation de la dépense énergétique

La dépense énergétique est un paramètre finement régulé par des signaux intervenant différemment selon l'activité, le statut nutritionnel ou la température corporelle afin de préserver une homéostasie énergétique. Les stimuli délivrés par le système nerveux et les niveaux d'hormones circulantes sont directement liés à la modulation de la dépense énergétique. Parmi ces signaux, on peut noter le rôle prépondérant de l'activation du tissu adipeux brun (et beige) par des afférences nerveuses sympathiques induisant une augmentation de la dépense énergétique (*cf. chapitre III*). Le relargage d'hormones thyroïdiennes contrôlé par l'hypothalamus induit aussi une augmentation de la dépense énergétique en agissant sur différents tissus incluant la fonction cardiaque, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun. Selon le statut nutritionnel (nourri ou à jeun), d'autres hormones telles que la leptine (*cf. Chapitre III, 4.2*) ou la ghréline, ont pour rôle respectif d'augmenter ou de diminuer la dépense énergétique en agissant sur le cerveau (Münzberg et al., 2016) (Figure 5).

Il faut également noter l'action de neurotransmetteurs influençant le comportement face à l'activité locomotrice spontanée. On relève par exemple le rôle stimulant de l'orexine et de la neuromédine U sur l'activité locomotrice et sur l'augmentation de la dépense énergétique (Kotz et al., 2008) (Figure 5).



Figure 5 : Modulation hormonale de la dépense énergétique

1.4 Apports énergétiques

Les apports énergétiques sont définis par les calories fournies par les nutriments provenant de l'alimentation et de façon dépendante de la valeur énergétique de chaque nutriment. L'apport énergétique ingéré inclut trois groupes majeurs de macronutriments : les carbohydrates (4kcal/g), les protéines (4kcal/g) et les lipides (9kcal/g), ainsi qu'une petite part provenant de l'alcool. Habituellement, si l'on fait référence à un homme pesant 70kg, son apport journalier moyen représente 2500 Kcalories et est constitué de 40 % de carbohydrates, 20 % de protéines et 40 % de lipides. L'apport énergétique provenant de la nourriture est très variable selon la composition du repas et la sensation de satiété de l'individu ((Galgani & Ravussin, 2008) ; (Hall, 2010)). Selon leur nature, ces nutriments seront différemment métabolisés et stockés. Ainsi, les carbohydrates constituent la source principale stockage énergétique, sous forme de glycogène ou de lipides. Seul 1% des protéines ingérées quotidiennement est stocké en réponse à des stimuli hormonaux, un entraînement physique ou encore une prise de poids. Comme pour les protéines, l'ingestion de lipides journaliers représente moins de 1% du stockage total des graisses. Les nutriments non stockés intègrent différentes voies métaboliques pour fournir de l'énergie ou de la biomasse.

2 Métabolisme énergétique à l'échelle cellulaire

Chez les organismes non photosynthétiques, le métabolisme énergétique de la cellule est une balance permanente entre dégradation (catabolisme) et synthèse (anabolisme) de substrats (sucres, lipides, acides aminés) qui est régie par une multitude de voies interconnectées afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Ce processus permet ainsi de générer ou d'utiliser de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Les différents circuits de réactions biochimiques impliqués dans le métabolisme se répartissent à la fois dans le cytosol et dans les mitochondries. En adéquation avec le thème de cette thèse, il ne sera ici détaillé que les voies métaboliques principales de catabolisme du glucose et des lipides, deux substrats essentiels.

2.1 Voies principales du catabolisme

- Métabolisme du glucose

Le glucose provenant du sang est transporté dans la cellule grâce à des transporteurs membranaires puis est pris en charge par la glycolyse qui a lieu dans le cytosol. La glycolyse se déroule en deux phases. La première consomme de l'ATP (deux molécules consommées) et la deuxième en produit à partir d'adénosine diphosphate (ADP) (quatre molécules synthétisées). Pour une molécule de glucose, deux molécules d'ATP sont produites par la glycolyse. Il y a d'abord une transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) grâce à cinq réactions successives. Puis les deux molécules de G3P sont à leur tour converties en deux molécules de pyruvate via cinq autres réactions en cascade. Le pyruvate est le produit final de la glycolyse et a plusieurs devenir possibles en fonction de l'absence ou de la présence d'oxygène. En absence d'oxygène, la glycolyse s'achève par la transformation du pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), ce qui a pour conséquence d'acidifier l'environnement de la cellule. En revanche, lorsque l'oxygène est disponible dans le milieu, le pyruvate est transporté dans la mitochondrie et utilisé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) afin d'être décarboxylé en acétyl CoA puis être pris en charge par le cycle de KREBS (ou cycle de l'acide citrique) au niveau de la matrice mitochondriale. A noter que le pyruvate peut également être transformé en oxaloacétate, composant du cycle de KREBS, par la pyruvate carboxylase. Ce cycle est constitué de différentes réactions enzymatiques qui a alors pour rôle de générer des coenzymes réduits (NADH, FADH₂), substrats utilisables par la machinerie mitochondriale et ainsi optimiser la production d'ATP en présence d'oxygène. Une molécule d'acétyl CoA génère ainsi entre autres trois molécules de NADH et une molécule de FADH₂. A noter que le cycle de KREBS peut également être alimenté par un autre substrat qu'un métabolite issu originellement du glucose : l' α -cétoglutarate, dérivé du catabolisme de la glutamine par la glutaminolyse. La chaîne de transport des électrons formée par les complexes protéiques de la membrane interne mitochondriale prend finalement en charge ces substrats jusqu'à l'O₂, accepteur final des électrons (*cf. Chapitre II, 3.2*) pour permettre la production d'ATP. La glycolyse cytosolique, le cycle de KREBS et les phosphorylations oxydatives de la mitochondrie (OXPHOS) permettent in fine de produire trente-six molécules d'ATP à partir d'une seule molécule de glucose initiale.

En plus de l'origine alimentaire du glucose, la glycogénolyse est une voie de production de glucose au niveau du muscle, où il sera directement utilisé par la cellule musculaire, et au niveau hépatique, où il sera versé dans la circulation. De façon intéressante, lors d'une privation en nutriments comme lors d'une période de jeûne par exemple, la voie de la néoglucogenèse permet la régénération de glucose à partir de substrats non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et la plupart des acides aminés. Cette voie se produit essentiellement dans le foie.

Enfin, dans des situations de stress métabolique comme dans certaines cellules cancéreuses par exemple, on peut assister à une relocalisation du flux des carbohydrates dérivés du glucose. En effet, ce phénomène se traduit par une production préférentielle d'ATP par la glycolyse plutôt que par la mitochondrie, et ce, malgré la présence d'oxygène. Plus communément appelé effet Warburg (découverte par Otto Warburg dans les années 1920s), cette utilisation majoritaire de glycolyse aérobie signe souvent une dysfonction mitochondriale. Elle peut également être induite par une inhibition de la pyruvate déshydrogénase, empêchant la production de pyruvate, point d'entrée essentiel au cycle de KREBS (Figure 6A).

- **Métabolisme des lipides**

La biosynthèse des acides gras s'effectue principalement dans le foie et le tissu adipeux à partir d'acétyl CoA, lui-même généré depuis le pyruvate ou le citrate provenant du cycle de KREBS. La synthèse des acides gras requiert une oxydation du NADPH en NADP⁺ fourni principalement par la voie des pentoses phosphates. Cette voie consiste entre autres à produire du ribose-5-phosphate à partir d'un intermédiaire de la glycolyse, le glucose-6-phosphate. On peut également noter que le ribose-5-phosphate est essentiel à la biosynthèse des acides nucléiques. Les acides gras utilisables par la cellule peuvent aussi provenir des lipides stockés dans la cellule adipeuse sous forme de triglycérides ou bien de la circulation sanguine (*Cf. Chapitre III, 1.2.*).

Pour être utilisés, les acides gras prennent le chemin de la β -oxydation qui a lieu essentiellement dans les mitochondries mais aussi, dans les péroxysomes. Les acides gras libres sont alors couplés à l'acyl CoA cytosolique par la fatty acyl-CoA synthase (FACS) dans un premier temps pour former un acide gras à longue chaîne. Puis, cet acide gras est transféré

dans l'organelle cible grâce à un système de transporteurs (carnitine pour la mitochondrie ; coenzyme A pour les péroxysomes). Au niveau de la mitochondrie, les acides gras sont d'abord transformés par l'acyl-CoA synthase en acyl CoA. Le transport d'acyl CoA est alors permis par un système de transférase localisées à la surface des membranes mitochondriales (carnitines palmitoyltransférases 1 (membrane externe) et 2 (membrane interne) \Leftrightarrow CPT1 et 2) ; à noter qu'il existe différents isoformes selon leur localisation tissulaire. Ils sont ensuite transformés en acétyl CoA qui pourra alors alimenter le cycle de KREBS ou être réutilisé. Le nombre de molécules d'acétyl CoA produites dépend de la longueur de la chaîne carbonnée de l'acide gras qui est oxydé. La β -oxydation est la voie la plus contributive à la production d'ATP et génère d'ailleurs du NADH ainsi que du $FADH_2$ ((Schrader et al., 2015) ; (University of Alberta, & Lopaschuk, 2011)) (Figure 6B).

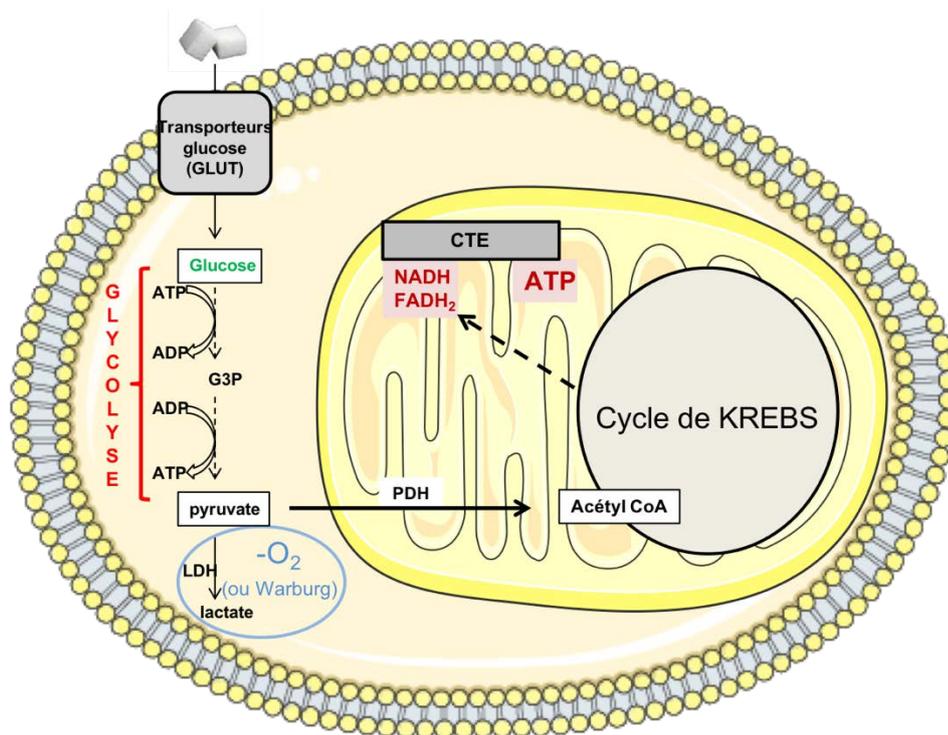


Figure 6 : Voies métaboliques générales de la cellule

(A) Catabolisme du glucose

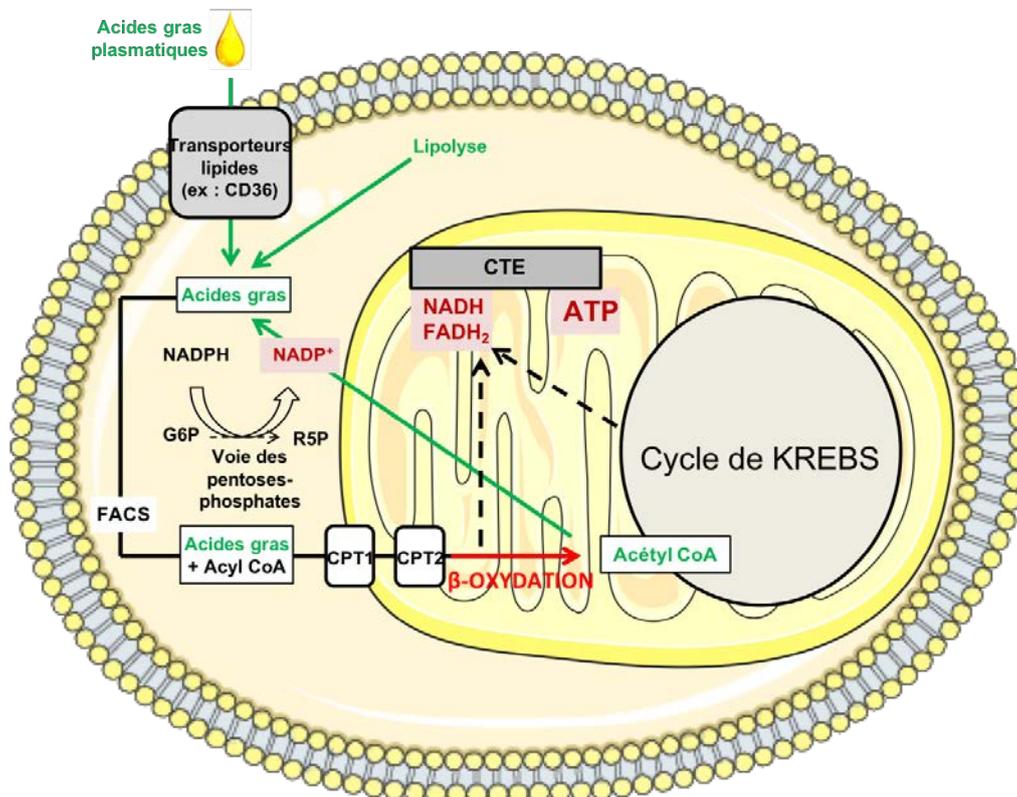


Figure 6 : Voies métaboliques générales de la cellule

(B) Métabolisme des lipides

2.2 Senseurs régulateurs du métabolisme cellulaire

Afin de réguler les voies précédemment décrites, des senseurs entrent en jeu pour permettre de maintenir une homéostasie cellulaire. Parmi ceux-ci, on peut citer l'AMP-activated protein kinase (AMPK), régulateur majeur de l'homéostasie énergétique mais aussi d'autres facteurs. Une revue plus exhaustive des senseurs métaboliques a été proposée (Wang et Lei, 2018).

- L'AMPK

Chez les eucaryotes, l'AMPK est le chef d'orchestre de la régulation de la balance énergétique. L'AMPK répond aux changements intracellulaires des niveaux nucléotidiques de l'adénine. Lorsque l'AMP et l'ADP augmentent par rapport à la quantité d'ATP, il y a une activation de l'AMPK pour promouvoir les voies du catabolisme, inhiber l'anabolisme, et générer ainsi l'ATP venant à s'amenuiser. Chez les mammifères, deux kinases en amont de l'AMPK ont été identifiées pour induire la phosphorylation de la thréonine 172 (T172) activatrice de l'AMPK : la protéine kinase kinase calcium/calmoduline dépendante (CaMKK β) dépendante de la concentration calcique ainsi que la kinase du foie B1 (LKB1) qui dépend de la concentration d'AMP (Carling, 2017).

Parmi les multiples rôles métaboliques de l'AMPK, on peut noter qu'il promeut l'internalisation du glucose par le recrutement du transporteur GLUT4 ainsi que la glycolyse. L'AMPK permet aussi la localisation membranaire du transporteur CD36 pour internaliser les acides gras (Ke et al., 2017). Il augmente l'oxydation des acides gras en phosphorylant l'AcetylCoA Carboxylase (ACC) aboutissant à une diminution de la formation du malonyl CoA (inhibiteur du transport des acides gras dans la mitochondrie) mais aussi en stimulant les facteurs PPAR α et PGC1 α (*cf. Chapitre III*) (Lee et al., 2006). L'AMPK est également responsable de la biogenèse mitochondriale via une phosphorylation directe de PGC1 α , notamment dans le muscle squelettique (*cf. Chapitre II, 3.1*) (Jäger et al., 2007). Étant donné le rôle majeur de l'AMPK dans l'homéostasie énergétique, plusieurs études ont démontré un lien entre sa dérégulation et la physiopathologie. On peut par exemple relever que le médicament le plus prescrit dans le cas du diabète de type II est un activateur de l'AMPK, la Metformine, qui a alors des propriétés hypoglycémiantes (Garcia et Shaw, 2017). Enfin, dans le cas de tumeurs, il a été montré que l'AMPK régule négativement la glycolyse aérobie (effet Warburg) en supprimant la croissance tumorale in vivo chez la souris grâce à l'inhibition du facteur hypoxique HIF1- α (Faubert et al., 2013) (Figure 7).

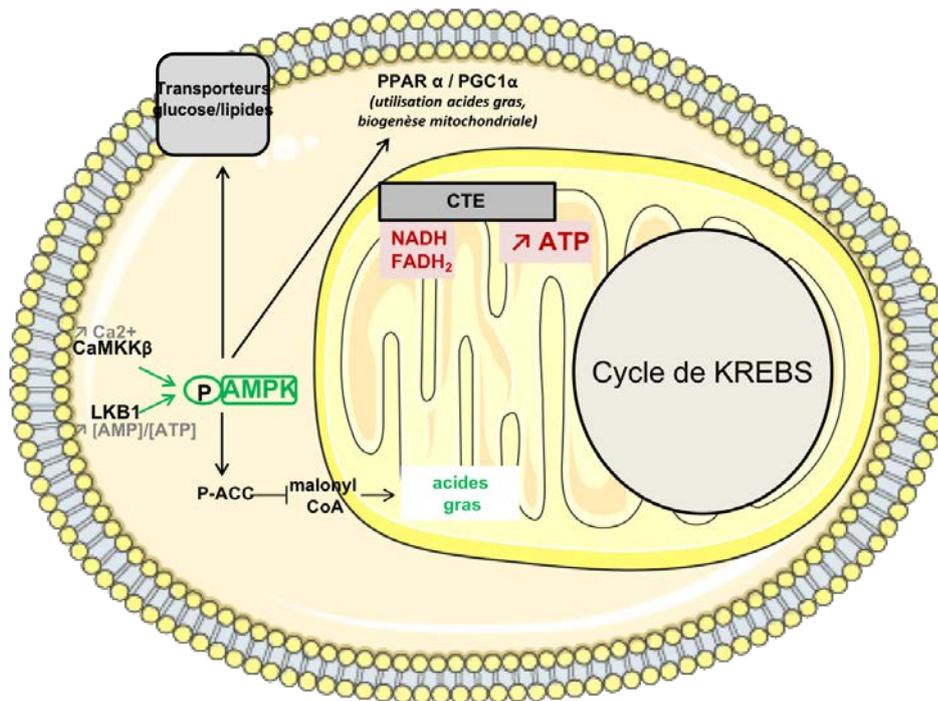


Figure 7 : Implication de l'AMPK dans le métabolisme cellulaire

- **Autres**

Outre l'AMPK, d'autres facteurs clés interviennent dans la régulation du métabolisme énergétique. Par exemple, la voie RAS (*cf. Chapitre 1*) intervient dans la régulation bioénergétique. De plus, il a été montré que la voie PI3K-AKT en aval d'un récepteur tyrosine kinase ou bien que la protéine ERK en aval de RAS pouvaient activer la signalisation dépendante de mTOR, permettant entre autres la synthèse protéique et notamment celle du métabolisme oxydatif mitochondrial. Cette voie induit aussi une augmentation de la glycolyse et la synthèse d'acides gras ((Laplante et Sabatini, 2009) ; (Saxton et Sabatini, 2017)). Les sirtuines ont également été incriminées dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. Elles modulent les réponses métaboliques dans différents tissus suite à différentes stimulations. Elles sont sensibles aux niveaux de NAD⁺ dans la cellule. Par exemple en restriction calorique, la sirtuine 1 est réactive à l'augmentation du NAD⁺ dans la cellule et stimule la biogenèse mitochondriale alors qu'en excès calorique, elle l'inhibe (Houtkooper et al., 2012).

3 Les mitochondries, moteurs énergétiques du vivant

3.1 Introduction : Origine, structure, fonction et renouvellement des mitochondries

- Origine des mitochondries

La mitochondrie est un organite cytoplasmique présent dans l'ensemble des cellules eucaryotes, à l'exception des érythrocytes, dont le rôle est de produire l'énergie cellulaire, notamment à partir d'oxygène. En 1967, la microbiologiste américaine Lynn Margulis publie un article dans lequel elle expose la théorie selon laquelle l'origine des mitochondries, entre autres, semble résider dans l'endosymbiose de procaryotes. Elle émet en effet l'hypothèse que les cellules anaérobiques furent obligées de s'adapter pour survivre à l'atmosphère devenue riche en oxygène il y a 1,2 milliards d'années. Elle suppose alors que les cellules qui vivaient de façon anaérobie ont ingéré un microbe procaryote aérobique. Ainsi en fusionnant, le procaryote permet l'utilisation d'oxygène par la cellule hôte eucaryote : c'est la formation des premières mitochondries, hypothèse validée aujourd'hui par la communauté scientifique, même si peu de mitochondries humaines ont de lien phylogénétique direct avec l'endosymbionte originel. Il est malgré cela intéressant de noter que tout comme sa bactérie ancestrale, la mitochondrie a conservé sa sensibilité aux drogues antibiotiques (Nunnari et Suomalainen, 2012).

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes car elles possèdent leur propre génome, sous forme d'un ADN circulaire, qui code une partie des protéines mitochondriales, les autres étant issues du génome nucléaire de la cellule. De façon intéressante, la transmission du génome mitochondrial est uniquement maternelle. En effet, lors de la reproduction, les mitochondries contenues dans les gamètes mâles ne sont pas transmises lors de la fécondation de l'ovocyte à cause de leur localisation dans la partie non fécondante du spermatozoïde d'une part, mais aussi, par l'existence de gènes nucléaires impliqués dans l'élimination du matériel génétique mitochondrial paternel. Cependant, une étude récente montre dans certains cas chez l'humain que l'ADN mitochondrial peut également être transmis par le père sur plusieurs générations, par un mécanisme moléculaire de transmission qui reste inconnu (Luo et al., 2018).

- Structure et fonction des mitochondries

Ces organites sont composés d'une membrane externe et d'une membrane interne séparées par un espace inter-membranaire englobant une matrice. La membrane externe est une bicouche lipidique pauvre en protéines qui permet une diffusion d'ions et de métabolites de petite taille via la protéine transmembranaire appelée porine. Pour les protéines de plus haute masse moléculaire, des transporteurs actifs (TOM : Translocase of the Outer Membrane) entrent en jeu. A noter que le transport d'acyl CoA dérivé des acides gras est permis à travers la membrane externe par CPT1 (cf. 2.1. *Métabolisme des lipides*). A l'inverse, la membrane interne est riche en protéines par rapport à la proportion de phospholipides et ne permet le passage d'ions et de métabolites que grâce à des protéines de transport spécialisées.

Le long de la membrane interne, les mitochondries affichent une succession de complexes protéiques spécialisés dans leur fonction de conversion d'énergie dérivée du catabolisme de nutriments en production d'énergie utilisable par la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Pour ce faire, la membrane interne mitochondriale adopte une structure particulière en crêtes qui augmente sa surface pour permettre une meilleure production d'énergie. Outre la fonction de production d'énergie, les mitochondries sont également impliquées dans de nombreux autres processus physiologiques tels que l'apoptose, l'autophagie, ou encore, l'homéostasie calcique (Figure 8).

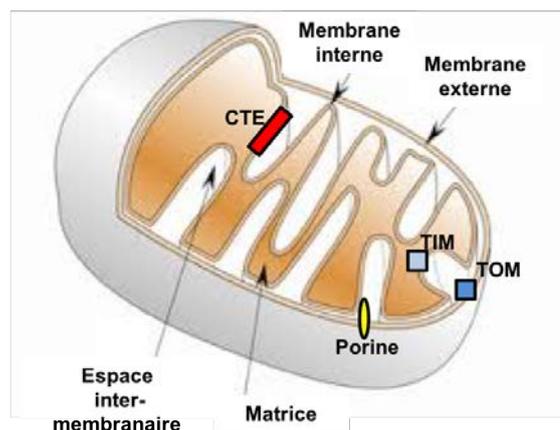


Figure 8 : Structure de la mitochondrie (adapté de « ALBERT » ; *general-biology/cellular-respiration-and-other-metabolic-processes/mitochondrial-structure*)

- **Renouvellement et dynamique des mitochondries**

Le nombre de mitochondries est variable dans une cellule selon l'état métabolique et les besoins de la cellule. On peut ainsi noter qu'il existe une synchronisation des acteurs nucléaires et mitochondriaux afin d'entamer un processus de biogenèse mitochondriale. Par extension, le gène PGC1 α est par exemple très inductible en réponse à un panel de conditions physiologiques induisant l'activation d'une multitude de voies de signalisation intracellulaires et nécessitant l'augmentation de la production d'énergie par la mitochondrie (exposition au froid, exercice du muscle squelettique, jeûne, etc...). La voie β -adrénergique dans le foie et le tissu adipeux brun, la CaMK (protéine kinase Ca²⁺/calmoduline dépendante) et l'AMPK dans le muscle strié, CREB (facteur de transcription liant l'AMPc) dans le foie, et le NO (monoxyde d'azote) dans plusieurs tissus ont d'ailleurs été montrées comme activateurs de l'expression ou de l'activation de PGC1 α . PGC1 α est ensuite à l'origine de l'activation de l'expression des facteurs nucléaires NRF1 et NRF2, qui à leur tour, induisent l'expression du facteur nucléaire TFAM. Ce facteur de transcription transite alors jusqu'à la mitochondrie pour induire la réplication de l'ADN mitochondrial mais aussi, de composants de la chaîne respiratoire mitochondriale formés des différents complexes spécialisés (Figure 9).

Enfin (mais de façon non exhaustive), les mitochondries sont mobiles grâce au cytosquelette de la cellule et s'organisent en réseaux fusionnés ou fissionnés pour pouvoir maintenir une homéostasie correspondant aux modifications de l'environnement interne et externe de la cellule.

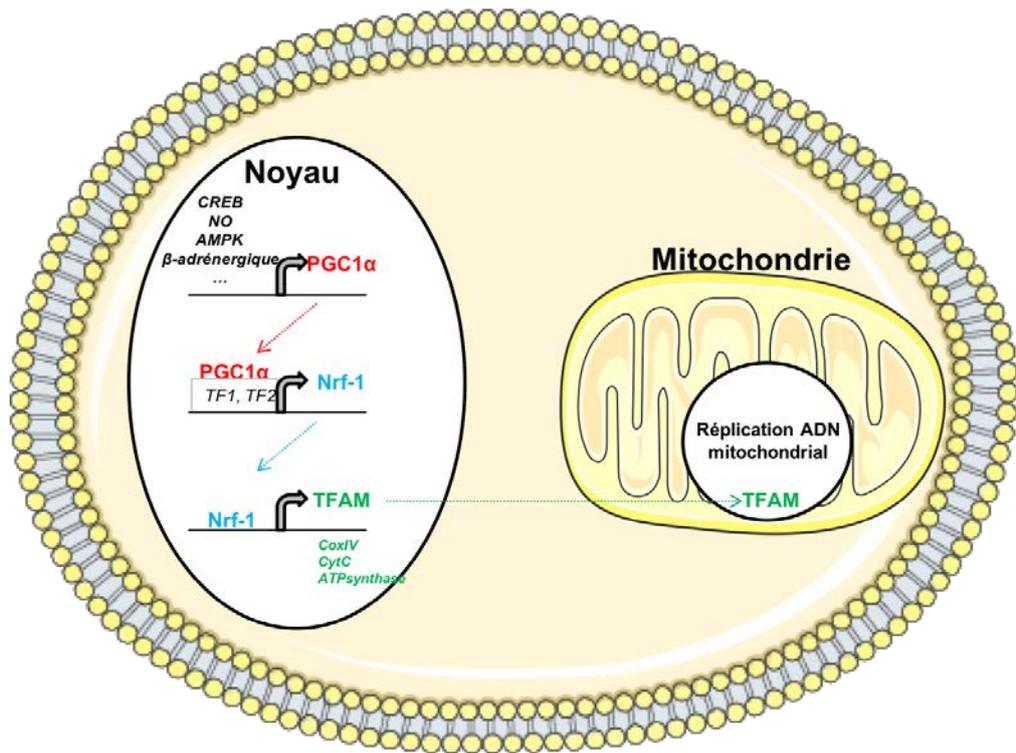


Figure 9 : Programme d'expression génique induisant la biogenèse mitochondriale

3.2 Mécanistique intrinsèque à la mitochondrie

- Introduction

Les mitochondries possèdent sur leur membrane interne une machinerie très organisée afin de produire de l'énergie pour la cellule sous forme d'ATP ; elle résulte en effet d'une succession de protéines transmembranaires appelées « complexes mitochondriaux ». Ces complexes multi-enzymatiques sont au nombre de cinq, dont l'ATP synthase (producteur direct d'ATP), et forment la chaîne de transport des électrons (CTE). A partir des substrats disponibles dans la cellule, de type protéines, glucides ou lipides, les voies métaboliques intracellulaires les transforment en éléments utilisables par les complexes mitochondriaux. Les produits finaux utilisables par les complexes mitochondriaux émanent alors du cycle de KREBS au sein de la matrice mitochondriale, qui sont notamment le NADH et le FADH₂. Le NADH est oxydé en NAD⁺ par les premier et troisième complexes mitochondriaux alors que le FADH₂ subit une réaction d'oxydation en FAD au niveau du deuxième complexe. Par ailleurs, il existe un gradient électrochimique de protons formé de part et d'autre de la membrane

interne mitochondriale qui est un réservoir d'énergie potentielle : les réactions d'oxydoréduction au niveau des complexes mitochondriaux permettent aux protons présents dans la matrice d'être expulsés vers l'espace inter-membranaire mitochondrial. Des transporteurs permettent ainsi de récupérer et de transférer les électrons provenant des réactions enzymatiques d'oxydoréduction des complexes à travers la CTE dans la membrane interne mitochondriale pour permettre la production finale d'ATP, énergie utilisable par la cellule. On assiste finalement à une transformation de l'énergie oxydoréductive en énergie électrochimique : c'est ce que l'on appelle le couplage de l'énergie électrochimique produite par la CTE avec l'ATP synthase qui utilise cette énergie pour former de l'ATP.

Par ailleurs, il est intéressant de noter dans certains cas l'existence de supercomplexes représentant une association de différents complexes de la CTE aboutissant à un respirasome. Leur rôle est aujourd'hui encore mal connu mais certaines études montrent leur implication dans la diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène par exemple (Maranzana et al., 2013).

- **Le couplage : chaîne de transport des électrons, complexes mitochondriaux, production d'ATP et consommation d'oxygène**

Le complexe I mitochondrial est le point d'entrée de la CTE. Ainsi, le NADH formé par le cycle de KREBS interagit avec ce complexe, appelé NADH-CoenzymeQ réductase. Le NADH est pris en charge par ce premier complexe et est oxydé en NAD^+ , réutilisable par les voies métaboliques de la cellule. Deux électrons sont alors arrachés au NADH pour transiter à travers le complexe I et être transmis au Coenzyme Q(CoQ)/Ubiquinone(Uq) (accepteur final des électrons du complexe I) qui a en charge le transport de ces électrons vers le complexe III de la CTE. Il est réduit en CoQH_2 grâce au pompage de deux protons additionnels depuis la matrice mitochondriale. Il est alors mobile pour diffuser le long de la membrane mitochondriale jusqu'au complexe III grâce à sa solubilité permise par sa longue chaîne hydrocarbonée.

Le rôle du complexe III est de transférer les électrons, transportés initialement par le CoQH_2 , jusqu'au cytochrome C entre autres. En étant au contact du complexe III, les deux électrons transportés par le CoQH_2 sont libérés par oxydation en CoQ, induisant la libération de deux protons dans l'espace intermembranaire. Les deux électrons libérés prennent deux

chemins différents. Un seul des deux électrons est alors recueilli par la forme oxydée du cytochrome C, un des accepteurs finaux des électrons du complexe III, situé du côté de l'espace intermembranaire mitochondrial. Ainsi, le cytochrome C est réduit et se détache de la membrane interne pour diffuser dans l'espace intermembranaire et rejoindre le complexe IV afin de transporter cet électron.

Le complexe IV a pour rôle de transférer les électrons de la forme réduite du cytochrome C à la molécule d'oxygène présente au niveau de la matrice mitochondriale. Deux protons sont par conséquent pompés depuis la matrice mitochondriale. Deux autres protons sont recrutés et permettent de libérer deux molécules d'eau à partir d'extrémités OH présentes au niveau de ce complexe.

A la différence des autres complexes mitochondriaux, le complexe II n'est pas une pompe à protons qui contribue au gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce complexe oxyde le FADH_2 , issu de la transformation du succinate en fumarate dans le cycle de KREBS, en FAD. Le FADH_2 a pour particularité de rester attaché au complexe II puisque la succinate déshydrogénase qui catalyse la réaction du succinate en fumarate est la seule enzyme du cycle de KREBS qui est membranaire. Via l'oxydation du FADH_2 en FAD, deux électrons sont libérés. Ces électrons sont transmis à une CoQ qui est réduite en CoQH_2 . A l'égal du complexe I, la CoQH_2 rejoint le complexe III pour transmettre les deux électrons qu'elle transporte.

Le complexe V, aussi appelé ATP synthase, représente la dernière structure de la CTE. L'ATP synthase est composé de deux régions : F_0 , canal protonique, situé au sein de la membrane interne mitochondriale ainsi que F_1 , sous-unité catalytique, située en-dessous de F_0 dans la matrice mitochondriale. C'est en effet via ce complexe que l'énergie de la cellule est générée sous forme d'ATP grâce au gradient protonique électrochimique formé précédemment par les complexes I, III et IV (Lemarie et Grimm, 2011) (Figure 10).

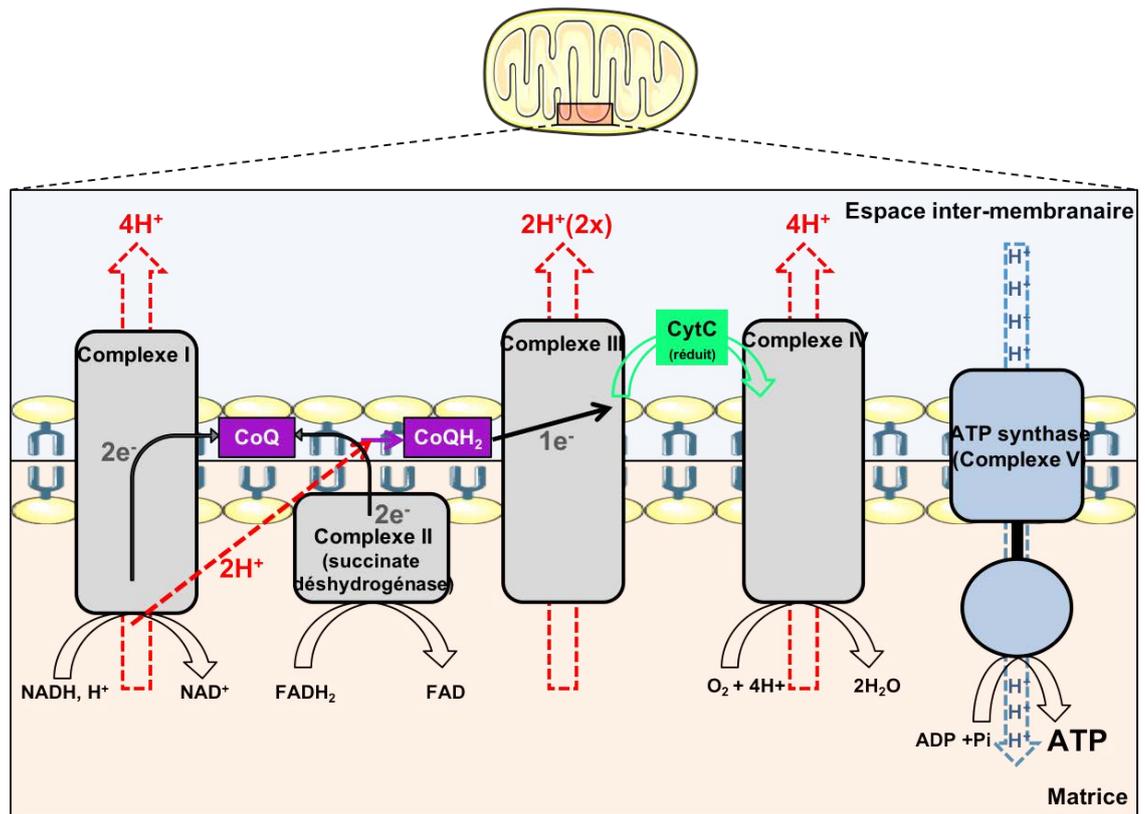


Figure 10 : Chaîne de Transport des Electrons (CTE)

- **Découplage mitochondrial : thermogénèse « non-frissonnante »**

En dehors du couplage de la CTE avec l'ATP synthase, on peut parfois assister à un phénomène de découplage de ce système, qui se manifeste par une thermogénèse. Cette libération d'énergie thermogénétique est alors un autre moyen de production de chaleur que le phénomène de frisson musculaire ou induit par l'alimentation. Ce phénomène a principalement été décrit dans les tissus adipeux brun et beige. Il existe cependant des protéines découplantes localisées ailleurs que dans les tissus adipeux. En effet, une augmentation du contenu en UCP1 (UnCoupling Protein 1) a été montrée dans des fractions mitochondriales issues d'utérus murin après ovulation, ce qui pourrait signer un rôle de régulation des variations de température au cours du cycle sexuel. Par ailleurs, UCP1 a été retrouvé dans des organes contractiles comme dans les couches musculaires lisses du tractus reproductif et gastro-intestinal de souris par exemple, ce qui traduirait un rôle différent de celui de la thermogénèse. La question de l'action d'UCP1 dans le processus de relaxation musculaire a d'ailleurs été soulevée ((Nibbelink et al., 2002) ; (Shabalina et al., 2002)).

Les protéines découplantes de type UCP sont des protéines canaux qui vont permettre ce découplage mitochondrial en perforant la membrane interne mitochondriale qui devient alors perméable. Ainsi, le gradient électrochimique de protons établi de part et d'autre de cette membrane se dissipe : les protons de l'espace inter-membranaire retournent dans la matrice mitochondriale au lieu d'être utilisés par l'ATP synthase. Les complexes de la CTE peuvent alors pomper ces protons vers l'espace inter-membranaire pour fonctionner. Un recyclage protonique est donc formé laissant ainsi place à une activité exacerbée de la CTE jusqu'à l'oxygène, accepteur final des électrons au niveau du complexe IV (Figure 11).

Des travaux montrent que la protéine UCP1 possède le mode de fonctionnement d'un symporteur. En effet, grâce à la forte liaison hydrophobique de la queue carbonnée d'un acide gras à longue chaîne à l'intérieur de la protéine UCP1, la charge positive d'un proton est liée à la charge négative de l'acide gras, permettant ainsi le symport du proton de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale ((Fedorenko et al., 2012) ; (Bertholet et Kirichok, 2017)).

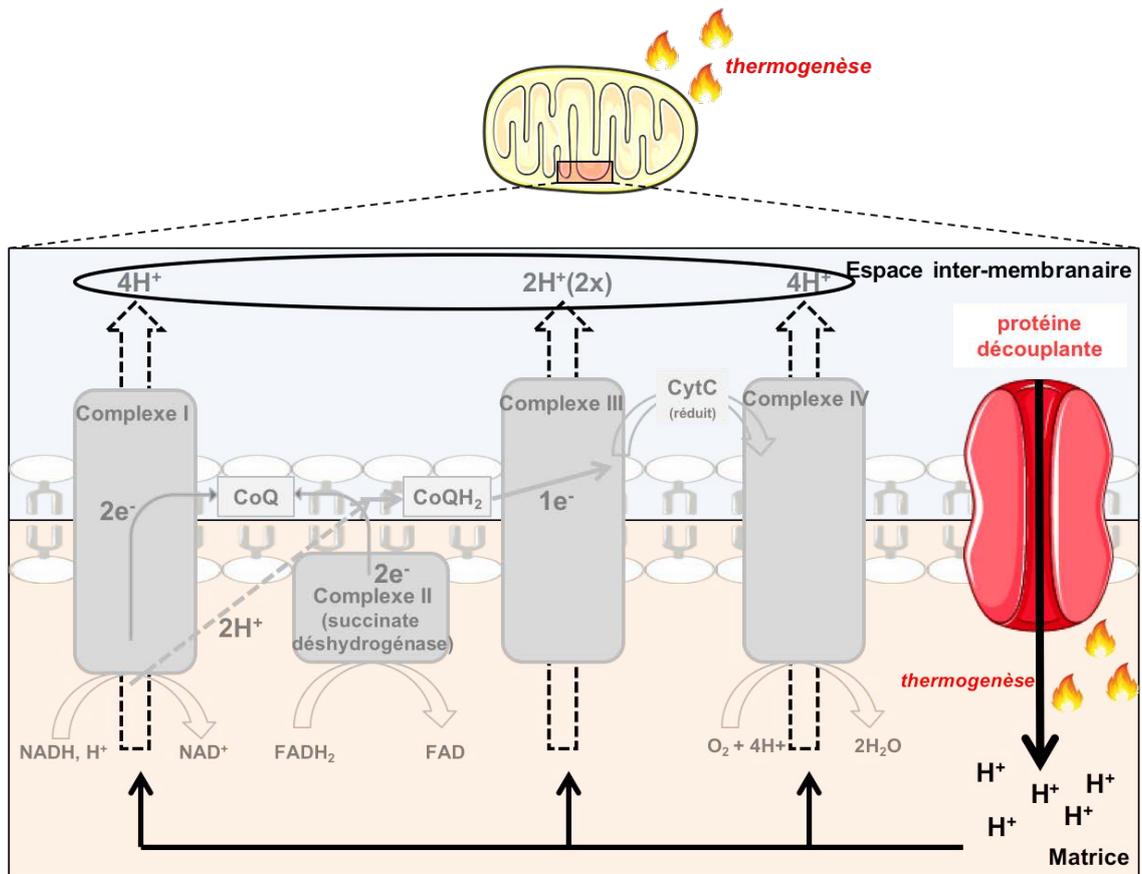


Figure 11 : Découplage de la CTE

3.3 Adaptations mitochondriales

Pour pouvoir s'adapter aux modifications environnementales de la cellule, les mitochondries s'organisent en réseau et répondent avec une dynamique de fission et de fusion, conservée entre les espèces. La balance entre ces deux événements permet à la cellule de réguler le nombre, la taille et la localisation cytoplasmique des mitochondries. Le plus souvent, la fusion mitochondriale est associée à une activité respiratoire mitochondriale élevée alors que la fragmentation du réseau est plutôt liée à une dysfonction telle que du stress oxydatif ou une mort cellulaire (Detmer et Chan, 2007). Il est également intéressant de remarquer que plus récemment, des travaux ont relaté une troisième conformation, toroïdale, que peuvent adopter les mitochondries lors de stress par exemple ((Benard et al., 2013) ; (Long et al., 2015) ; (Ding et al., 2012)).

- **Mécanistique et protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale de fusion/fission**

Différentes protéines spécifiques à activité GTPase entrent alors en jeu pour pouvoir réaliser cette dynamique particulière. Elles sont appelées méchanoenzymes pour leur capacité à permettre le remodelage des membranes mitochondriales (Figure 12).

Chez les mammifères, la fusion est opérée dans un premier temps par les protéines homologues Mitofusines 1 et 2 (Mfn 1 et 2) au niveau de la membrane externe. L'hydrolyse du GTP par les GTPases Mfn 1 et 2 entraîne un changement conformationnel de ces dernières, ce qui permet un rapprochement des membranes mitochondriales externes et leur fusion. Les mitofusines sont régulées par des cycles d'ubiquitylation/dé-ubiquitylation pour être activées ou bien dégradées au niveau du protéasome (Wiedemann et al., 2013). Le processus de fusion des membranes externes mitochondriales est suivi par la fusion des membranes internes, guidée par la GTPase OPA1 impliquant le lipide membranaire Cardiolipine (CL) ((Tilokani et al., 2018) ; (Detmer et Chan, 2007)).

Au contraire, le mécanisme de fission implique d'autres acteurs. La réplication de l'ADN mitochondrial est alors l'élément déclencheur de la fission qui permet de recruter le réticulum endoplasmique de la cellule à des sites spécifiques pour une étape de pré-constriction. Puis, au niveau de ces points de contact, la GTPase DRP1 est recrutée, oligomérisée et réalise son

activité GTPase pour subir un changement morphologique afin d'augmenter la constriction déjà pré-établie par le réticulum endoplasmique. Il est intéressant de remarquer que selon le site de phosphorylation de DRP1, la fission est induite ou au contraire inhibé. En effet, une phosphorylation sur Ser616 ou une déphosphorylation de Ser637 induisent la fission. Enfin, une deuxième GTPase, la Dynamine 2 (Dnm2), est recrutée au niveau du réticulum endoplasmique pour terminer la scission de la mitochondrie ((Tilokani et al., 2018) ; (Detmer et Chan, 2007)).

Des KO de la majorité de ces protéines entraînent des désordres importants. Par exemple, une déficience pour Mfn1 et Mfn2 chez la souris induit une létalité embryonnaire, et les observations in vitro associées montrent des défauts mitochondriaux morphologiques ainsi qu'un potentiel de membrane défectueux (Chen et al., 2003).

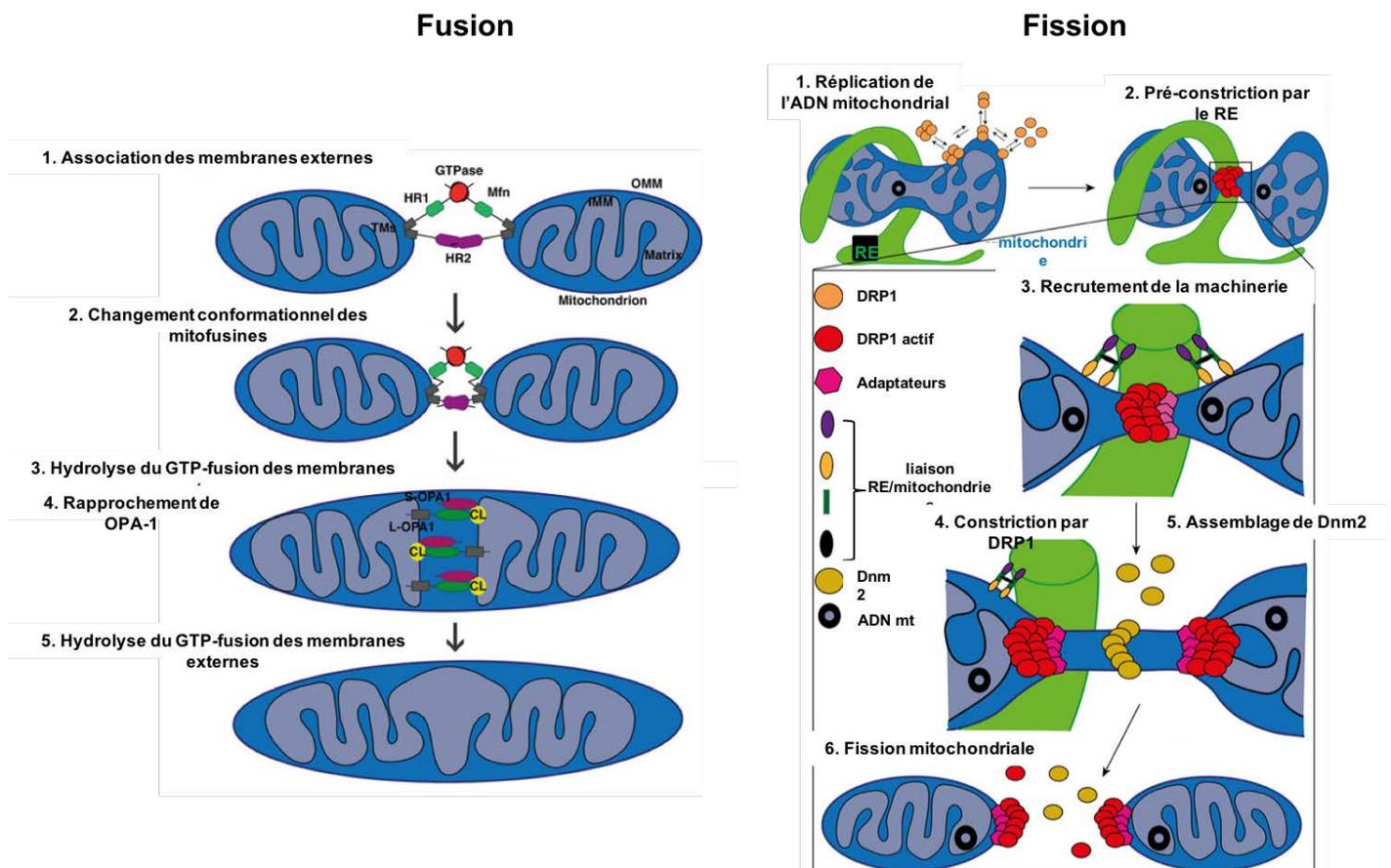


Figure 12 : Dynamique mitochondriale : mécanismes de fusion et de fission (adapté de Tilokani et al., 2018)

- **Implication des protéines de fusion (Mitofusines) et de fission (P-DRP1) dans la régulation du métabolisme mitochondrial et de la survie cellulaire**

Plusieurs études soulèvent qu'une fragmentation mitochondriale est associée à la mort cellulaire apoptotique alors qu'à l'inverse, la fusion du réseau atténue ce phénomène. La Mfn2 est d'ailleurs connue pour établir une connexion avec le réticulum endoplasmique (RE), appelée « MAM » (mitochondria-associated membranes). Les MAM sont aussi enrichis en la protéine DRP1. Cette juxtaposition est requise pour des événements cellulaires clés. Par exemple, le flux de calcium du RE vers la mitochondrie est essentiel à la régulation de la mort cellulaire par apoptose et de la production d'ATP (via la stimulation des déhydrogénases mitochondriales et de l'ATPsynthase ((Denton, 2009) ; (Griffiths et Rutter, 2009)), énergie utilisable par la cellule ; une liaison RE/mitochondrie trop proche ou trop éloignée peut aboutir à la dysfonction mitochondriale. En l'occurrence, un transport excessif du calcium du RE vers la mitochondrie induit l'oligomérisation d'une protéine pro-apoptotique mitochondriale (BAX) et perméabilise la membrane mitochondriale externe. Le cytochrome C est alors relargué dans le cytosol où le signal apoptotique via les caspases est activé conduisant à la mort de la cellule. De plus, lorsque la MAM est abolie, la libération du calcium du RE vers la mitochondrie est supprimée et la production d'ATP ainsi que la survie cellulaire sont réduites. Lors de l'apoptose, il a également été montré que la protéine DRP1 stimulait l'oligomérisation de BAX de façon calcium dépendante pour augmenter l'apoptose.

Au-delà de la régulation calcique dépendante de l'apoptose et de la production d'ATP, les MAM sont également essentiels au transfert de composés lipidiques RE-mitochondrie qui pourrait être bi-directionnel grâce à un transport non vésiculaire et à la formation d'autophagosomes pour le processus d'autophagie (Vance et al., 2014) (Figure 13).

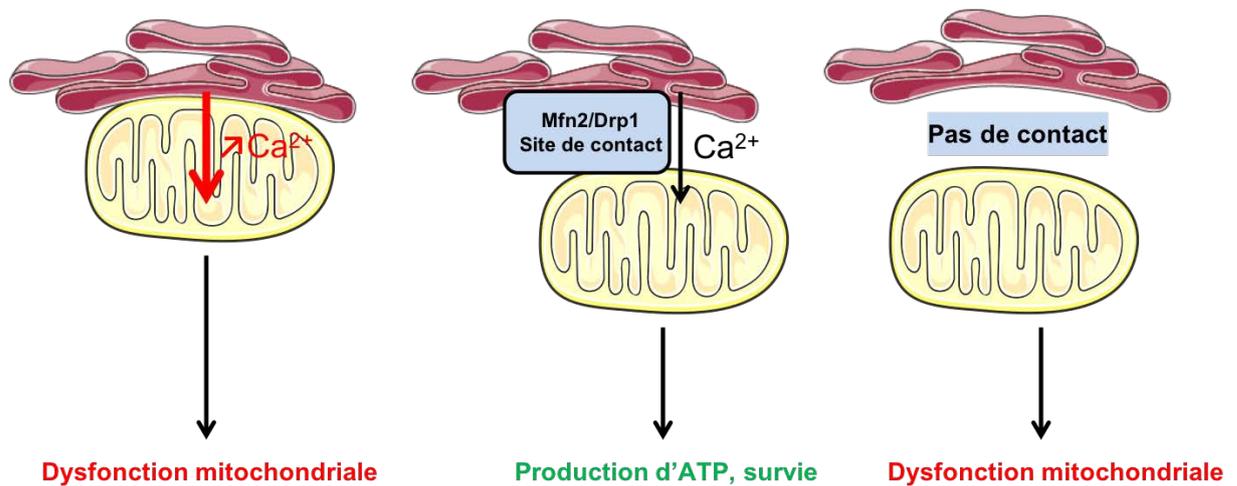


Figure 13 : Les « Mitochondria-Associated-Membranes » (MAM)

- Les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales

Dans une cellule qui fonctionne normalement, lorsque l'oxygène mitochondrial n'est pas complètement oxydé par la chaîne de transport des électrons, cela conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dites primaires. Ces ROS primaires sont majoritairement produites au niveau du complexe I (mais aussi du complexe III) soit lorsque la mitochondrie produit peu d'ATP et par conséquent présente un haut potentiel de membrane associé à une diminution du co-enzyme Q, soit lorsque le ratio NADH/NAD⁺ dans la matrice mitochondriale est élevé. Le transfert des électrons à l'O₂ génère alors les ROS primaires sous forme d'anion superoxide (O₂^{•-}). Au contraire, les mitochondries qui fabriquent activement de l'ATP avec un ratio NADH/NAD⁺ diminué ont aussi une production d'O₂^{•-} réduite.

Néanmoins, la production excessive d'O₂^{•-} due à une dysfonction mitochondriale amène à des interactions avec d'autres composés qui génère des ROS secondaires. L'O₂^{•-} peut alors être converti en peroxide d'hydrogène (H₂O₂) par l'enzyme superoxide dismutase (SOD). L'H₂O₂ peut à son tour être transformé en radical hydroxyl •OH. A eux trois, les radicaux libres O₂^{•-}, H₂O₂ et •OH forment la famille des ROS mitochondriaux. Au-delà de ces composés, la chaîne de transport des électrons génère d'autres ROS comme l'oxyde nitrique (NO) (Murphy, 2009) (Figure 14).

Il a été montré qu'un excès de production de ROS pouvait causer des dommages protéiques, lipidiques ou des acides nucléiques. Il est par exemple établi que des interactions

d' $\cdot\text{OH}$ avec des molécules d'ADN pouvaient endommager les bases constituant l'ADN. La surproduction de ROS est aussi connue pour créer des lésions membranaires, protéiques et pouvant interrompre les fonctions essentielles de la mitochondrie telles que la production d'ATP. Plusieurs pathologies métaboliques ainsi que le vieillissement sont d'ailleurs associés à une diminution de la biogenèse mitochondriale, une diminution des capacités oxydatives mitochondriales et de la production d'ATP ainsi qu'une génération accrue de ROS. Parmi les altérations métaboliques causées par le stress oxydatif, on peut citer l'association étroite entre les ROS et l'insulino-résistance, démontrée à plusieurs reprises (Bhatti et al., 2017).

La production excessive de ROS a aussi été montrée comme régulant la dynamique mitochondriale. Une étude montre in vitro qu'une hyperglycémie augmente la production de ROS mitochondriales et conduit à une fission du réseau mitochondrial (Yu et al., 2008). Au contraire, l'inhibition de cette fission permet d'annuler les effets délétères des ROS induits par l'hyperglycémie comme la perméabilisation de la membrane mitochondriale ou encore, la mort cellulaire (Yu et al., 2006).

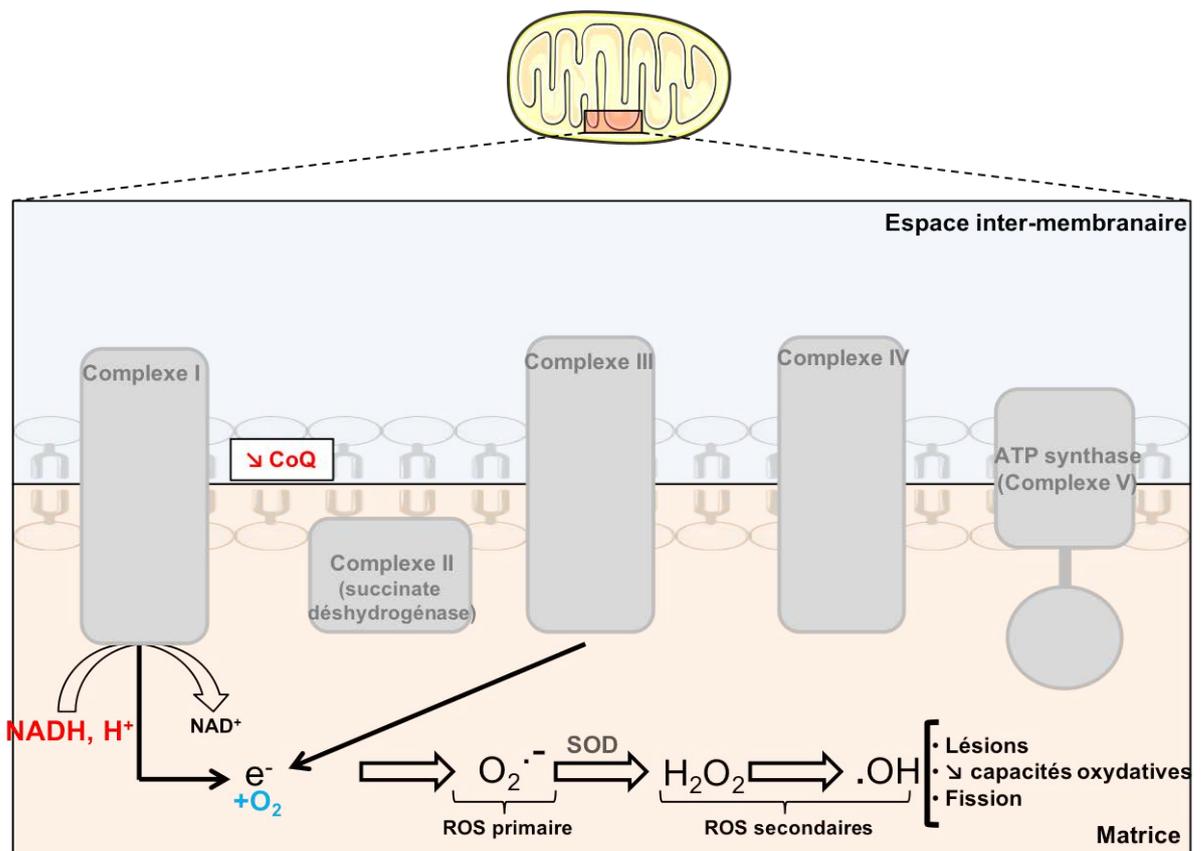


Figure 14 : Production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales

3.4 Physiopathologie associée aux défauts mitochondriaux

- **Dynamique mitochondriale dans la physiopathologie**

Il a été montré que la dynamique de ce réseau était essentielle à la modulation du métabolisme. Plusieurs stimuli, comme l'activité physique ou l'hypoxie, sont d'ailleurs capables d'agir sur les protéines de fusion ou de fission ((Tanaka et al., 2019) ; (Chang et Blackstone, 2007) ; (Cartoni et al., 2005)).

Par ailleurs, des modifications de la dynamique mitochondriale ont été associées à plusieurs pathologies et constituent un déterminant clé dans leur gestion bioénergétique. Il a par exemple été montré chez des patients diabétiques que l'augmentation de l'oxydation des acides gras et de l'insulino-sensibilité par l'exercice physique était due à une diminution des niveaux de phosphorylation de DRP1 sur Ser616 ce qui réduit le phénomène fission mitochondriale dans le muscle squelettique (Fealy et al., 2014).

Dans un contexte d'infarctus du myocarde, la dégradation ubiquitine-dépendante de la protéine AKAP1, une kinase impliquée dans la phosphorylation inhibitrice de DRP1, restaure le phénomène de fission mitochondriale, ce qui peut être sous-jacent à une apoptose ou une sénescence des cardiomyocytes (Kim et al., 2011). Il a également été montré chez la souris que la perte d'AKAP1 induisait une hypertrophie cardiaque, intimement corrélée au mécanisme de fission mitochondrial dirigé par DRP1 (Schiattarella et al., 2018). Au niveau neuronal, la fission par DRP1 semble être induite par le NO et impliquée dans des dommages neuronaux mais les mécanismes exacts sont encore controversés (Barsoum et al., 2006).

On peut aussi relever que la dysfonction de la protéine disulfide isomérase (PDI), impliquée dans le repliement des protéines, contribue à la mauvaise cicatrisation et à des complications vasculaires dans une situation de diabète. Une étude montre alors que la délétion de la PDI(A1) dans des cellules endothéliales induit une sulfénylation de DRP1 ce qui promeut la fragmentation mitochondriale, une élévation des espèces réactives de l'oxygène et une sénescence endothéliale (Kim et al., 2018).

Par ailleurs, il existe une corrélation entre la perte musculaire liée à l'âge de personnes sédentaires et le déclin d'expression de la protéine de fusion des membranes internes OPA1. De façon également importante, des souris *Opa1*^{-/-} montrent une altération de la croissance à 8 jours de vie, une hypoglycémie dans des conditions nourries, un statut pro-inflammatoire ainsi que des dysfonctions fonctionnelles mitochondriales (Tezze et al., 2017).

Pour compléter ces recherches qui rapportent très clairement un lien étroit entre la modulation des protéines participant à la dynamique mitochondriale et la physiopathologie, il est intéressant de faire référence à une étude qui indique que des souris dépourvues de MFN2 spécifiquement dans le foie présentent une intolérance au glucose avec une altération du signal insulinique dans le foie et le muscle squelettique, via un stress du réticulum endoplasmique et la production d'espèces réactives de l'oxygène (Sebastián et al., 2012). On peut alors aussi noter que des biopsies musculaires provenant de patients diabétiques de type 2 ont une réduction significative de 26% de la protéine MFN2 (Hernández-Alvarez et al., 2010).

- Exemples de maladies mitochondriales et conséquences physiopathologiques

Afin d'illustrer l'importance du bon fonctionnement de la mitochondrie dans la physiologie générale de l'individu, il est nécessaire de se pencher sur l'étude de maladies mitochondriales.

On peut alors citer une étude sur le syndrome de Leigh, une maladie neurologique progressive touchant la chaîne respiratoire mitochondriale causée par des mutations perte de fonction. Sur plusieurs centaines d'échantillons de sang et d'urine, une équipe de recherche met en évidence une signature métabolique particulière de ces patients avec notamment des facteurs de risque cardiométaboliques accrus, comme une augmentation de la concentration d'insuline et une diminution de la concentration d'adiponectine (Legault et al., 2015).

Une deuxième maladie, le syndrome de Barth, se traduit par une altération de la composition en cardiolipine, phospholipide mitochondrial, qui induit des problèmes cardiaques, une myopathie, ou un retard de croissance dans la plupart des cas (Schlame et Ren, 2006).

Enfin, il existe des maladies relatives à l'oxydation des acides gras (« Fatty-Acid Oxidation Disorders » : FAODs) mettant en jeu un défaut de transport des acides gras et de la β -oxydation mitochondriale, aboutissant à un déficit de la production énergétique de la cellule. Puisque l'utilisation des acides gras a lieu majoritairement dans le cœur, le foie, les tissus adipeux ou certains muscles pendant les périodes de jeûne ou d'activité physique, il existe une relation étroite avec les cardiomyopathies, la dysfonction hépatique ou encore, l'hypoglycémie généralement développées par les patients ((Rinaldo et al., 2002) ; (Kompore et Rizzo, 2008) ; (Dard et al., 2018)).

De manière remarquable, on peut noter un parallèle entre la similitude des symptômes développés par les patients atteints de FAOD et ceux atteints de Rasopathies, qui pourraient éventuellement tracer une altération de l'utilisation mitochondriale de substrats dans certains cas de Rasopathies.

4 Dépense énergétique et mitochondries : exemple des Rasopathies

Pour faire écho au premier chapitre de cette thèse, il est essentiel de s'intéresser au métabolisme énergétique des Rasopathies (cf. Tableau 1).

Une étude montre par exemple que cinq patients atteints de troubles associés à des mutations de la voie RAS-MAPK (Rasopathies de type SN, SN-LM, Syndrome de Costello (SC), ...) présentent une acidose lactique chronique. Ce diagnostic est supporté par des mesures anormales de composants OXPHOS au niveau de la mitochondrie ; en effet, des analyses biochimiques de biopsies musculaires montrent une production d'ATP réduite par rapport aux valeurs de référence (24 and 38 nmol ATP/h/mU vs contrôle : 42–81 nmol/h/mU/CS). Une déficience de complexes de la chaîne de transport des électrons mitochondriaux a aussi été relatée (Kleefstra et al., 2011).

4.1 Dérégulations énergétiques observées dans les Rasopathies

Par une méthode de calorimétrie indirecte basée sur l'échange de gaz, une étude a montré que des patients SC ont une dépense énergétique normalisée au poids accrue et ainsi, une augmentation de leur métabolisme cellulaire basal (Leoni et al., 2016). Ce profil a été rapproché du retard de croissance développé par ces patients, les flux énergétiques étant dérivés vers le métabolisme basal au détriment de la croissance.

Des dysfonctions métaboliques ont également été relatées dans le CFC. On peut entre autres relever une déficience du coenzyme Q10 musculaire chez des patients CFC, transporteur d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Aeby et al., 2007). De plus, dans le modèle murin associé au CFC (activation constitutive de BRAF), le poids des animaux est réduit par rapport aux animaux standards, quel que soit le sexe (Urosevic et al., 2011). Enfin, une étude sur une cohorte de patients CFC a par ailleurs mis en évidence que ces patients présentaient une acidose lactique chronique ainsi qu'un score MDC

(« Mitochondria Disease Criteria ») élevé, ce qui traduit une altération certaine du métabolisme énergétique associée au CFC (Kleefstra et al., 2011).

Quelques études montrent également une modulation du métabolisme énergétique dans la NF1. Des travaux ont par exemple montré en 2017 que l'absence de neurofibromine dans des fibroblastes embryonnaires de souris induisait une activation de la voie RAS-MAPK, et notamment de Erk, qui lui-même permet la phosphorylation de la protéine mitochondriale chaperonne TRAP1 ; l'activation de TRAP1 conduit alors à une inhibition de la succinate déshydrogénase et ainsi, à l'inhibition fonctionnelle du complexe II de la chaîne de transport des électrons mitochondriale. Il y a alors accumulation du succinate, ce qui aboutit à un changement métabolique au profit d'un métabolisme oncogénique en permettant la stabilisation de HIF1 α (Masgras et al., 2017).

Par ailleurs, dans un muscle de souris privé spécifiquement de Nf1, les auteurs observent une association entre la diminution de la force musculaire de ces animaux et une accumulation intramyocellulaire de lipides ainsi qu'une augmentation significative de l'activité d'enzymes participant au métabolisme oxydatif comme la succinate déshydrogénase, ce qui signerait une altération de l'oxydation des acides gras (Sullivan et al., 2014). Plus récemment, ces collaborateurs appuient leurs premiers travaux en montrant la présence musculaire excessive d'acide gras à longues chaînes lorsque la neurofibromine 1 est absente. La prise d'un régime de huit semaines riche en acides gras à chaînes moyennes et réduit en acides gras à longues chaînes a permis de restaurer entre autres la force musculaire des animaux (Summers et al., 2018).

Enfin, une étude chez la drosophile montre que la perte de la neurofibromine de type 1 induit une réduction de la synthèse d'ATP associée à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène, ce qui réduit la durée de vie des animaux. A l'inverse, sa surexpression permet une meilleure activation du complexe I mitochondrial, une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'une augmentation de la durée de vie des drosophiles (Tong et al., 2007). Il semblerait ainsi que les bénéfices ou que les effets délétères métaboliques associés à la neurofibromine de type 1 soient dépendants de plusieurs facteurs tels que l'espèce testée ou bien la localisation de la protéine par exemple.

4.2 Dérégulations énergétiques liées à SHP2

Dans le contexte des SN et SN-LM, les données les plus récentes montrent que SHP2 pourrait jouer un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique et de la fonction mitochondriale. Ainsi, l'expression systémique d'un mutant SN-LM induit une dépense énergétique accrue ainsi qu'une adiposité réduite (Tajan et al., 2014). De même, l'expression d'un mutant SN dans le cerveau résulte en une dépense énergétique augmentée ainsi qu'une résistance à l'obésité chez des souris femelles (He et al., 2013). Ces données sont à rapprocher du fait que le KO de SHP2 dans des neurones pro-opiomélanomortine (POMC) diminuent la dépense énergétique des animaux et génère un phénotype obèse, en lien avec le rôle de SHP2 dans la réponse à la leptine ((Banno et al., 2010) ; (Zhang et al., 2004)). Cependant, de façon contradictoire, l'inactivation de SHP2 dans le foie de souris (KO) conduit à une augmentation de la dépense énergétique des animaux ainsi qu'une résistance à l'obésité, attestant de processus tissu-spécifiques (Nagata et al., 2012).

Mécanistiquement, dans des cellules surexprimant des mutants de SHP2, des modifications de la respiration mitochondriale ont été documentées ((Lee et al., 2010) ; (Zheng et al., 2013)). Par exemple, dans des lymphoblastes issus de patients SN et dans des fibroblastes murins portant la mutation D61G associée au SN, on retrouve une augmentation de l'activité de la cytochrome C oxydase (Lee et al., 2010). Dans cette même étude, des cellules fibroblastiques embryonnaires de souris portant la mutation D61G révèlent entre autres une diminution des niveaux d'ATP ainsi que du potentiel de membrane mitochondrial, accompagnés d'une augmentation des taux d'espèces réactives de l'oxygène. Ces effets pourraient être à rapprocher du fait que, outre sa localisation cytoplasmique connue, SHP2 a aussi été décrite comme pouvant être transloquée dans la mitochondrie chez les mammifères ((Arachiche et al., 2008) ; (Guo et al., 2017) ; (Salvi et al., 2004)).

Il est aussi intéressant de noter qu'une étude génétique effectuée chez des patients atteints du SN et non porteurs de mutations associées à SHP2 a mis en évidence un lien entre le SN et un haplogroupe comportant des mutations de l'ADN mitochondrial (Rani et al., 2010).

Maladie	CFC	SC	NF1	SN	SN-LM
Prévalence	1/810.000	1/380.000	1/2000-1/5000	1/1000-1/2500	≤ 1/10.000
Anomalies bioénergétiques	<ul style="list-style-type: none"> ↘ CoQ10 Mitochondries géantes ↗ Lactate + Alanine ↘ activité complexes CTE ↘ production ATP ↘ adiposité 	<ul style="list-style-type: none"> ↘ glycémie à jeun ↘ IGF-1 ↗ cholestérol total ↗ dépense énergétique ↗ métabolisme basal 	<ul style="list-style-type: none"> L'activité de ERK1/2 phosphoryle TRAP1 dans la mitochondrie et altère leur respiration (cellules NF1^{-/-}) 	<ul style="list-style-type: none"> ↗ mutations de l'ADN mitochondrial ↘ potentiel de membrane mitochondrial ↘ ATP, ↗ ROS Déphosphorylation de protéines mitochondriales (complexe IV, ANT1,...) 	<ul style="list-style-type: none"> ↘ adiposité ↘ IMC ↗ Lactate sanguin ↘ activité complexe I

Tableau 1 : Altérations bioénergétiques dans les Rasopathies (adapté de Dard et al., 2018)

Conclusion (chapitre II) :

Pour conclure ce deuxième chapitre, on relève que les mitochondries sont des organites au carrefour de plusieurs voies et senseurs métaboliques. Elles permettent la gestion des différents substrats en régulant l'homéostasie de la cellule afin de permettre sa survie. Ainsi, grâce à son organisation très spécifique en différents complexes de la chaîne respiratoire, la mitochondrie est la centrale majoritaire de production de l'ATP, énergie utilisable par la cellule. La forme, la dynamique et le nombre de mitochondries s'adaptent ainsi en fonction de l'environnement auquel elles sont soumises. En cas de dysfonction mitochondriale due à une mutation génique ou bien à un stress, les conséquences physiopathologiques sont souvent graves et drastiques telles que des dommages à l'ADN ou à plus large échelle, des dysfonctions des organes métaboliquement actifs (cœur, tissu adipeux, muscle, ...).

CHAPITRE III. Les tissus adipeux : implication dans le métabolisme énergétique

En faisant un rapprochement entre l'altération générale du métabolisme énergétique et notamment des mitochondries dans les Rasopathies telles que le SN (décrites dans la première partie) et la réduction de l'IMC et de l'adiposité dans ces pathologies, il est alors finalement important de comprendre l'implication du tissu adipeux dans le métabolisme énergétique.

1 Le tissu adipeux blanc

1.1 Localisation anatomique, composition et différenciation

- Localisation

Conservé à travers les espèces eucaryotes pluricellulaires, les dépôts de tissu adipeux blanc sont localisés à plusieurs endroits de l'organisme. Chez le mammifère, il existe un tissu adipeux de soutien qui est essentiellement un tissu conjonctif, réparti sur tout l'organisme (orbites, paumes des mains et plante des pieds, articulations médullaire, etc...). On retrouve également du tissu adipeux blanc en position sous-cutanée (inguinal par exemple), c'est-à-dire qu'il se positionne entre la peau et les muscles, mais aussi en viscéral (péri-gonadique, péri-rénal, péri-cardiaque, mésentérique, etc...), qui entoure les viscères (Figure 15).

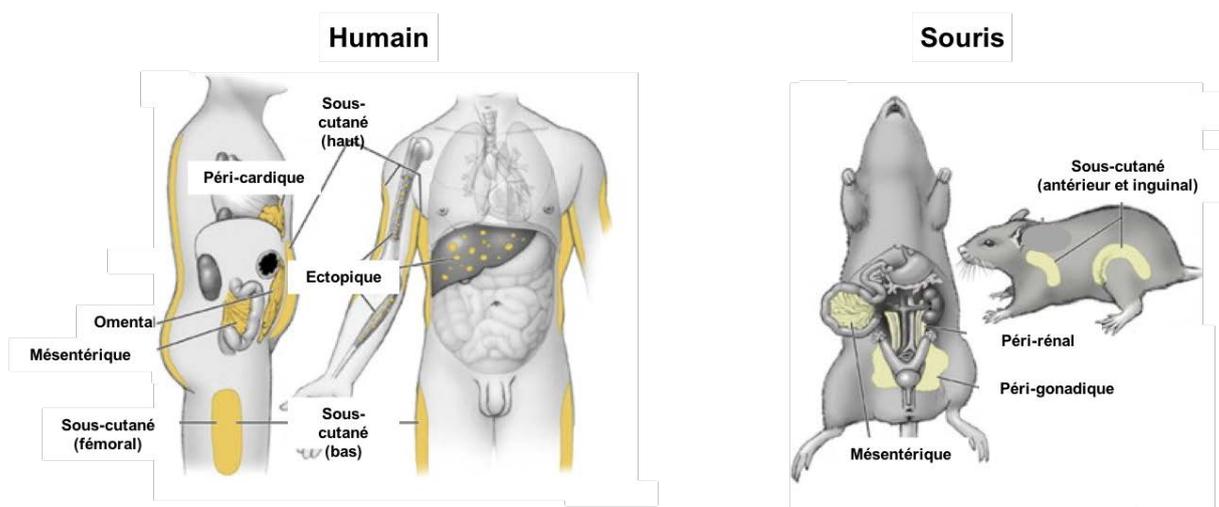


Figure 15 : Dépôts adipeux blancs chez l'Homme et chez la souris (adapté de Bartness et al., 2014)

- Composition

Le tissu adipeux blanc est un tissu métaboliquement actif, composé d'une multitude de types cellulaires. On distingue alors la fraction adipocytaire composée d'adipocytes, cellules « graisseuses » stockant les lipides, et la fraction stromale vasculaire (Figure 16).

L'adipocyte blanc est le type cellulaire majoritairement retrouvé au sein de dépôts adipeux blancs. Son volume est occupé à 95% par une vacuole lipidique, qui permet le stockage des lipides sous forme de triglycérides. Selon le besoin énergétique de la cellule variant avec le contexte environnemental, la taille de la cellule peut varier de 20 à 200 μm de diamètre, notamment grâce à la présence de protéines de type périlipines, situées sur la membrane de la vacuole lipidique ((Fujimoto et Parton, 2011) ; (Kimmel et Staryld, 2014) ; (Lee et al., 2013)).

La fraction stroma-vasculaire représente la totalité des cellules autres que des adipocytes au sein d'un dépôt adipeux. Elle est composée alors d'érythrocytes et de cellules vasculaires, de cellules immunitaires et de progéniteurs adipocytaires définies comme étant des cellules mésenchymales souches multipotentes.

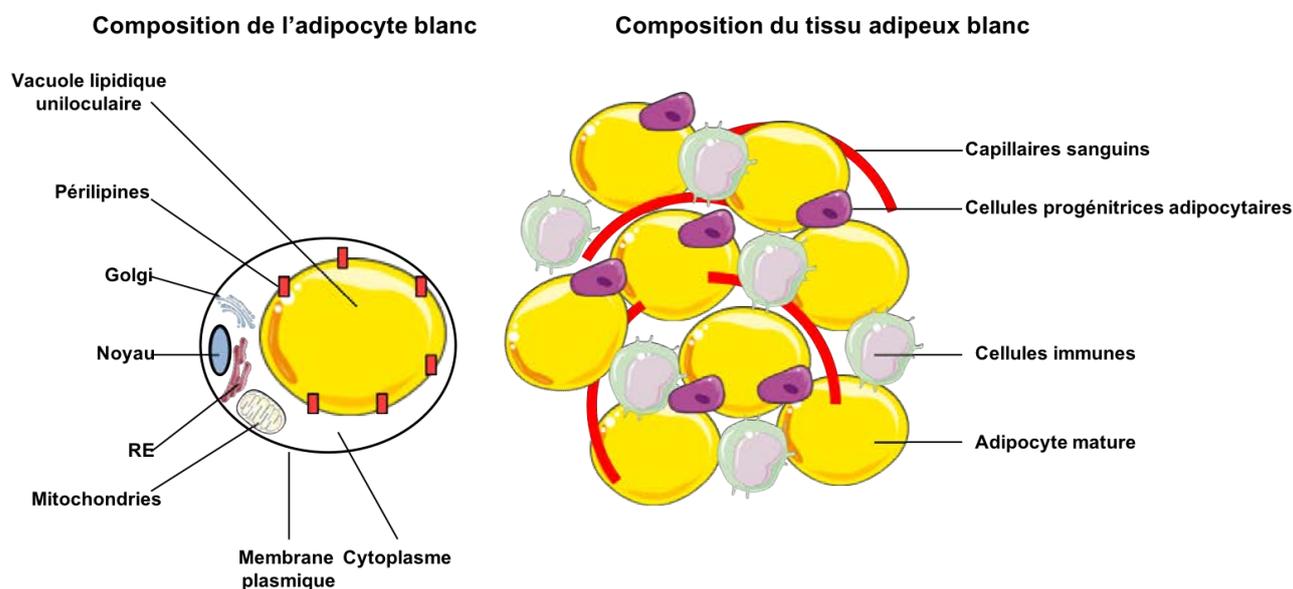
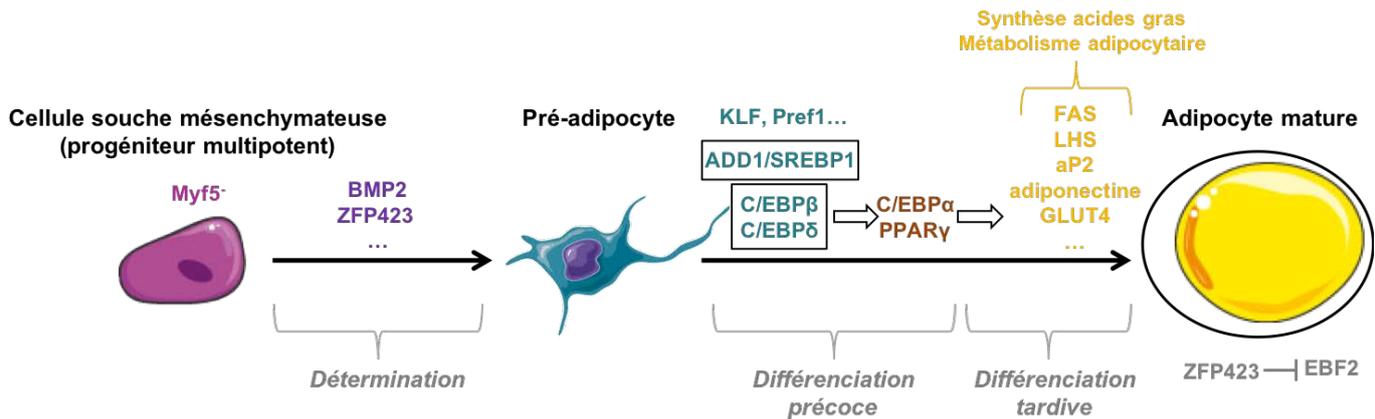


Figure 16 : L'adipocyte blanc et la Fraction Stromale Vasculaire (FSV)

- Différenciation

Afin de devenir un adipocyte, les progéniteurs adipocytaires subissent un processus d'adipogenèse selon une première étape irréversible de détermination du devenir cellulaire suivi d'une seconde phase de différenciation adipocytaire (Figure 17). L'adipogenèse est régulée par une activation séquentielle de plusieurs acteurs moléculaires ayant chacun un rôle temporel clef dans ce processus. Ainsi, la première étape de détermination est caractérisée par une prolifération cellulaire intense. Elle peut notamment s'effectuer grâce à des protéines appartenant aux familles des Bone Morphogenetic Proteins (BMP2) (Hata et al., 2002) ou des Zinc Finger Proteins (ZFP423) (Gupta et al., 2012). Après cette étape de détermination, les progéniteurs ont considérablement réduit leurs potentialités et sont devenus des pré-adipocytes avec un programme d'expression génique spécifique aux adipocytes. La deuxième étape de l'adipogenèse consiste alors à ce que les fibroblastes pré-adipocytaires se développent en adipocytes matures. Ce processus implique une cascade d'activation de facteurs de transcription afin d'effectuer une phase de différenciation durant laquelle l'adipocyte accumule des lipides pour former une gouttelette lipidique unique en fin d'évolution. Pour ce faire, la phase précoce de différenciation est permise par l'expression de facteurs de transcription de la famille C/EBP (C/EBP β et C/EBP δ), des Kruppel like factors (KLF), de ADD1/SREBP1 et du marqueur Pref1 (pré-adipocyte factor1). En aval de l'induction de ces facteurs, la phase tardive de la différenciation adipocytaire a lieu grâce aux régulateurs majeurs de cette dernière étape que sont C/EBP α et PPAR γ . On retrouve ainsi une augmentation de l'expression de protéines nécessaires à la synthèse d'acides gras (lipogenèse) et du métabolisme adipocytaire comme la FAS, la LHS, aP2 ou GLUT4 par exemple (*cf. Chapitre III, 1.2.*). Cette phase tardive de différenciation est caractérisée *in vitro* par une inhibition de contact ce qui cause un arrêt de la prolifération cellulaire ((Rosen et al., 2000) ; (Rosen et MacDougald, 2006) ; (Lefterova et Lazar, 2009)).



Très récemment, quelques travaux de séquençage d'ARN en « single-cell » ont précisément permis d'identifier des populations cellulaires distinctes présentes dans les dépôts adipeux, aux potentialités différentes chez la souris et chez l'humain. Ces travaux participent alors à l'identification de mécanismes contrôlant l'activité des précurseurs adipocytaires. En l'occurrence, on peut par exemple citer une étude dans laquelle les auteurs montrent que le marqueur DPP4 (dipeptyl peptidase-4-expressing) est exprimé par des cellules multipotentes prolifératives et résistantes à la différenciation adipocytaire. Cette population donne alors lieu à deux populations pré-adipocytaires partageant des similitudes (ICAM1+ et CD142+/Clec11a+). De façon intéressante, une suppression de cellules DPP4+ au sein d'un dépôt viscéral est associée à une obésité et une insulino-résistance (Merrick et al., 2019). Une autre étude montre l'existence d'une nouvelle population (« Aregs » ↔ CD142+/ABCG1+) capable d'inhiber de façon paracrine la différenciation adipocytaire in vivo et in vitro (Schwalie et al., 2018).

Figure 17 : Cascade de différenciation adipocytaire blanche

1.2 Fonctions métaboliques

- Stockage des acides gras

Outre son rôle d'isolant physique et thermique, le tissu adipeux blanc est la source majeure de stockage énergétique de l'organisme. Cette énergie est une réserve de lipides qui est gérée par un équilibre entre deux routes métaboliques que sont l'apport lipidique et la lipolyse. Par exemple, après un repas, le tissu adipeux blanc a pour rôle de tamponner l'excès

lipidique (Frayn, 2002). Pour répondre à cela, l'adipocyte exprime des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme de stockage et d'utilisation des acides gras, en particulier la famille des PPARs, co-activées par des co-facteurs transcriptionnels de type PGC1 (Poulsen et al., 2012) ; (Tiraby et Langin, 2005).

Dans l'adipocyte, les lipides sont stockés sous forme de triacylglycérol (TAG) empaqueté dans des gouttelettes lipidiques. Ce TAG est composé de trois molécules d'acides gras et d'une molécule de glycérol. Chez le mammifère et essentiellement chez l'Homme, les réserves de lipides dans l'adipocyte proviennent de la circulation sanguine. Ces lipides peuvent aussi provenir de la recaptation d'acides gras libres non estérifiés, liés à l'albumine pour leur transport, provenant du tissu adipeux lui-même (\Leftrightarrow cycle futile de Lipolyse/Re-captation d'acides gras). Cependant, ils sont majoritairement issus du TAG contenu dans des lipoprotéines sanguines (chylomicrons ou VLDL) fabriquées à partir de l'intestin et du foie. Etant données que les lipoprotéines transportant le TAG sont trop volumineuses pour pénétrer à travers les capillaires sanguins bordant le tissu adipeux, une lipoprotéine lipase (LPL) est synthétisée et sécrétée par l'adipocyte pour hydrolyser ces lipoprotéines au niveau de la lumière des capillaires sanguins. Les acides gras non estérifiés issus de cette réaction enzymatique peuvent alors entrer dans l'adipocyte grâce à des transporteurs spécifiques. Ces acides gras seront alors entre autres convertis en acyl CoA par l'acyl CoA synthétase pour être dirigé vers des voies métaboliques telles que la β -oxydation mitochondriale ou notamment participer à la synthèse du stock de TAG de l'adipocyte ((Schaffer, 2002) ; (Lafontan et Langin, 2009)) (Figure 18).

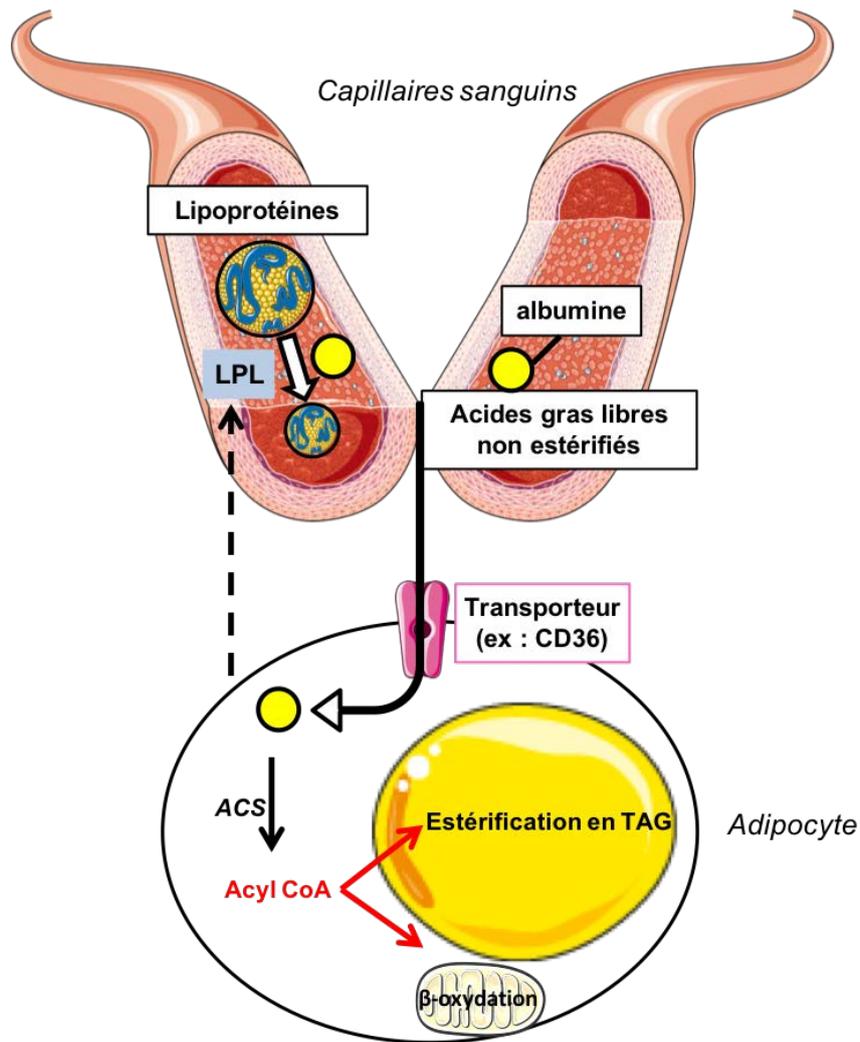


Figure 18 : Entrée des acides gras dans l'adipocyte

Chez les eucaryotes pluricellulaires, le TAG est synthétisé à partir de l'acyl CoA grâce à deux voies : la voie du glycérol phosphate, utilisée par la majorité des types cellulaires, et la voie du monoacylglycérol, plutôt au niveau intestinal. Ainsi, en ce qui concerne la voie du glycérol phosphate dans l'adipocyte, la première étape consiste à ce que l'acyl CoA adipocytaire dérivé des lipoprotéines circulantes subisse une transformation en TAG grâce à plusieurs intermédiaires et enzymes pour être stockés dans les gouttelettes lipidiques (Takeuchi et Reue, 2009) (Figure 19).

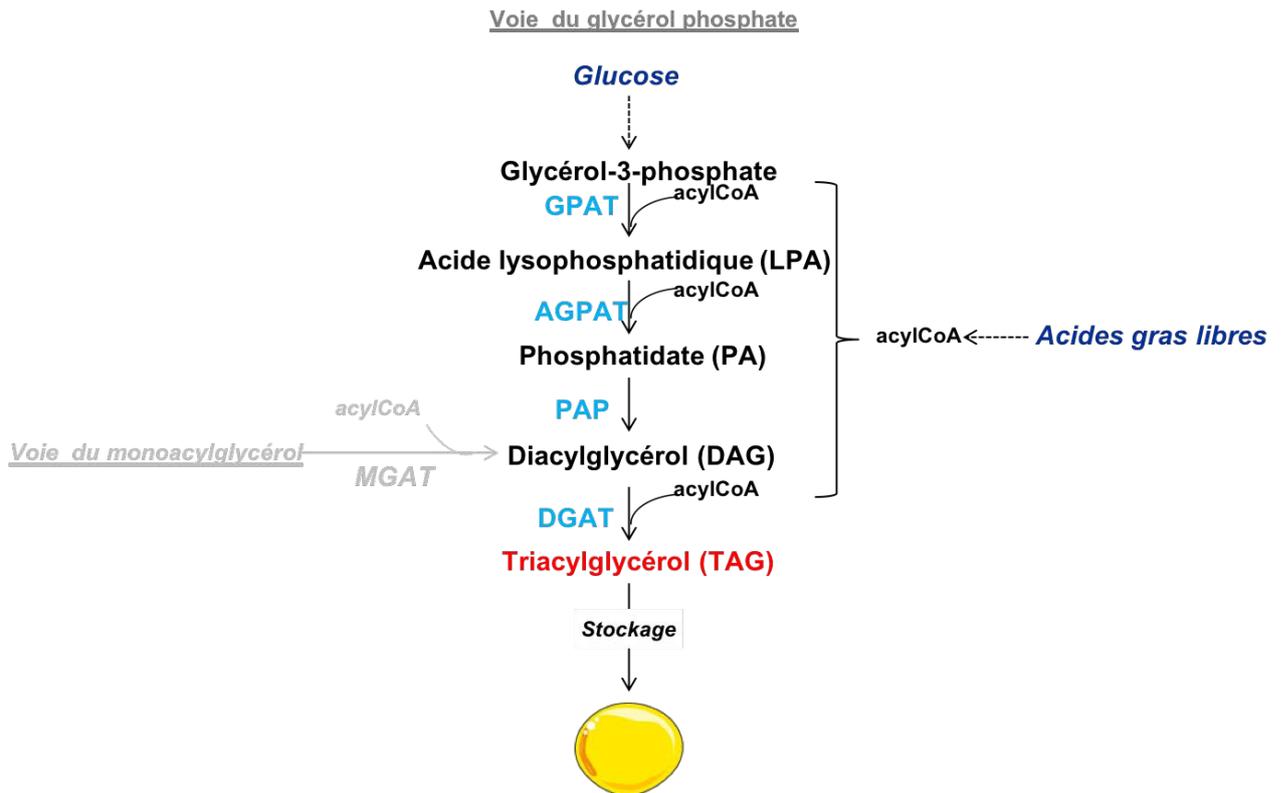


Figure 19 : Production du TAG avec estérification des acides gras

Chez le rongeur, une synthèse lipidique intrinsèque à l'adipocyte (et à l'hépatocyte), appelée lipogenèse *de novo*, peut également avoir lieu à partir de précurseurs non lipidiques issus du glucose. Néanmoins, chez l'Homme, elle est négligeable dans l'adipocyte (Diraison et al., 2003). Puisque ces travaux de thèse ont essentiellement été effectués sur modèle murin, il apparaît essentiel de mentionner cette voie (Figure 20). Par conséquent, lorsque le glucose entre dans l'adipocyte par son transporteur constitutif (GLUT1) ou recruté à la membrane de la cellule par un signal insulinique (GLUT4), il est pris en charge par la glycolyse pour être transformé en pyruvate. Puis, en entrant dans la mitochondrie, le pyruvate est pris en charge par le cycle de KREBS. Le citrate du cycle de KREBS peut sortir de la mitochondrie par un système de navette et est ensuite transformé en palmitate par plusieurs enzymes. Après une série de réactions, le palmitate est converti en acides gras qui pourront être estérifiés en TAG (Ameer et al., 2014).

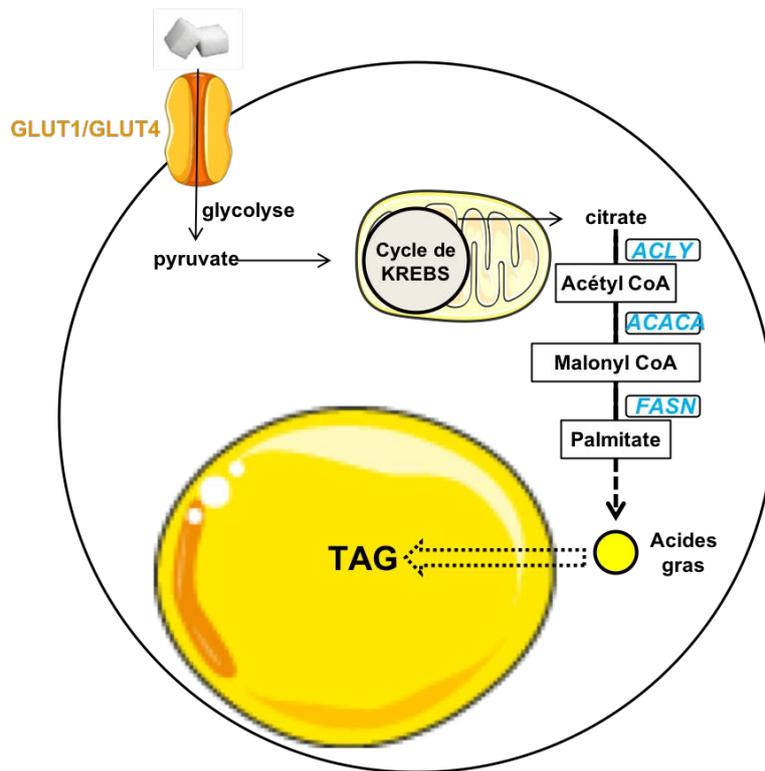


Figure 20 : Lipogenèse *de novo*

- **Production des acides gras : lipolyse**

En cas de besoin énergétique comme une période de jeûne ou un exercice physique, les lipides du tissu adipeux peuvent être mobilisés grâce au processus de lipolyse en réponse à de multiples stimuli connus incluant principalement une stimulation du système nerveux sympathique via les catécholamines (adrénaline, noradrénaline) ou par des peptides natriurétiques (ANP, BNP). Cependant, plusieurs autres effecteurs lipolytiques existent (Figure 21).

De façon générale, bien que des variations inter-espèces sont à prendre en considération, l'action d'agonistes aux récepteurs couplés aux protéines Gs (exemple : catécholamines sur des récepteurs β -adrénergiques) active l'adénylate cyclase (AC) qui induit une augmentation des taux intracellulaires d'AMPC dans l'adipocyte. La protéine kinase A (PKA) prend ensuite le relais pour participer à la phosphorylation de protéines cibles incluant des protéines associées aux gouttelettes lipidiques ou bien des enzymes lipolytiques. A l'inverse, en activant un récepteur couplé à une protéine Gi, les agonistes α 2-adrénergiques, certaines prostaglandines (PGF2 α , PGE2) ou encore le neuropeptide Y possèdent une action

anti-lipolytique ; l'insuline est également connue pour inhiber l'action de la LHS, enzyme clef de la lipolyse.

De façon similaire aux récepteurs couplés à la protéine Gs, les peptides natriurétiques qui agissent sur des récepteurs spécifiques provoquent une hausse de l'activité de la guanylate cyclase (GC), de la GMPc et de la PKG permettant également la phosphorylation d'acteurs enzymatiques de la lipolyse ((Duncan et al., 2007) ; (Pagnon et al., 2012)).

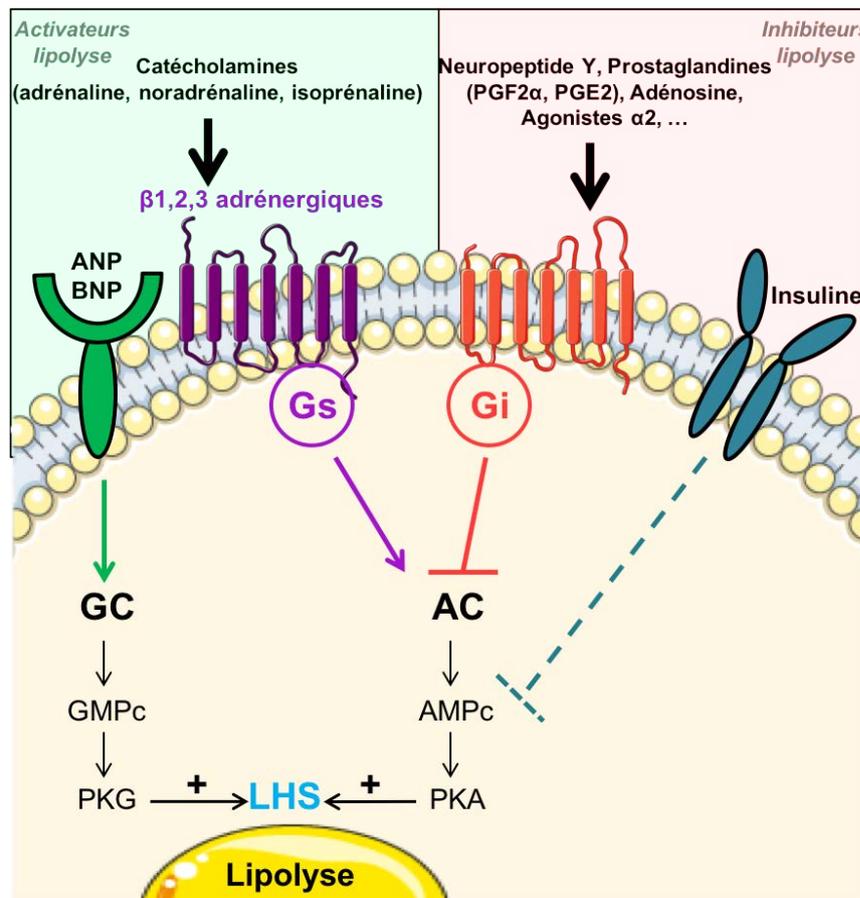


Figure 21 : Inducteurs de lipolyse

Durant la lipolyse, une molécule de TAG contenue dans les gouttelettes de l'adipocyte est hydrolysée en trois molécules d'acides gras libres et en une molécule de glycérol. Cela est notamment permis grâce à l'action de trois enzymes lipases qui ont une action coordonnée et séquentielle (ATGL, LHS, MGL) (Figure 22). Ces métabolites seront ensuite transportés par la circulation sanguine et fournis aux autres tissus. Certains acides gras libres pourront aussi être recyclés en TAG par le tissu adipeux lui-même ((Lafontan et Langin, 2009) ; (Zechner et al., 2009)).

De façon intéressante, selon la localisation du dépôt adipeux, des différences de régulation de la lipolyse ont été démontrés. Une cohorte de femmes de poids normal montre par exemple que les adipocytes viscéraux ont une plus grande capacité de réponse aux stimuli lipolytiques que des adipocytes sous-cutanés (Tchernof et al., 2006).

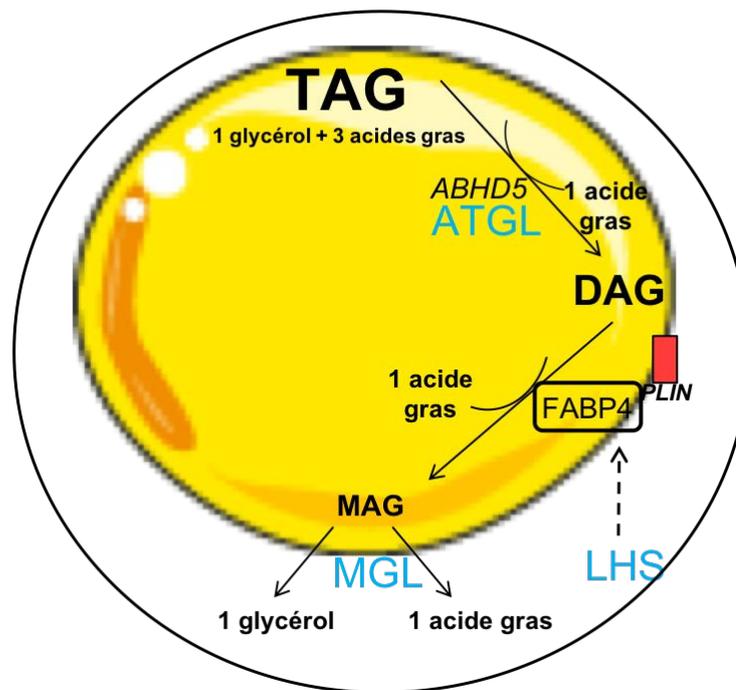


Figure 22 : Détails moléculaires de la lipolyse

1.3 Autres fonctions (soutien, isolation, endocrine)

En plus de son rôle métabolique, une fonction importante du tissu adipeux blanc est celle d'une isolation thermique et physique de l'environnement extérieur. Néanmoins, au cours de ces dernières années, des équipes de recherche ont mis en évidence un rôle bien plus complexe que celui d'isolant du tissu adipeux blanc. Ce tissu, considéré aujourd'hui comme un organe endocrine à part entière, sécrète en effet plusieurs types d'hormones appelées adipokines telles que la leptine ou encore l'adiponectine, essentielles au bon fonctionnement d'autres organes (cf. Chapitre III, 4.2.).

1.4 Plasticité

Chez les mammifères, le tissu adipeux se forme in utéro puis tout au long de la vie. La masse adipeuse comprend à la fois la taille et le nombre d'adipocytes. Lors de l'enfance et l'adolescence, le nombre d'adipocytes généré augmente (hyperplasie) pour atteindre un nombre fixe à l'âge adulte (Berry et al., 2013). Par conséquent, un gain ou une perte de poids génère une modification du volume adipocytaire (hypertrophie). Le tissu adipeux est également confronté à un renouvellement d'un certain pourcentage d'adipocytes à partir de cellules progénitrices. Chez l'humain, il a été montré qu'il existait un renouvellement des adipocytes de 8,4% par an. (Spalding et al., 2008). Cependant, chez la souris jeune adulte, le renouvellement des adipocytes est plus rapide et est estimé à environ 1-5% par jour (Rigamonti et al., 2011).

1.5 Territorialité et dysmorphisme sexuel

De façon tout à fait remarquable, les dépôts sous-cutanés et viscéraux ont une morphologie et une fonctionnalité différente. Il existe des différences liées au genre avec une prépondérance du tissu adipeux viscéral chez l'homme alors que la femme possède plus de tissu adipeux sous-cutané. Par ailleurs, des coupes histologiques de tissu adipeux sous-cutané révèlent une taille adipocytaire plus petite. Il a aussi un renouvellement adipocytaire plus élevé que le tissu adipeux viscéral. Les dépôts sous-cutanés et viscéraux répondent différemment à des stimuli extérieurs (Berry et al., 2013). Par exemple, il existe une réponse plus élevée aux catécholamines du tissu adipeux viscéral induisant une forte mobilisation des acides gras. L'activité des récepteurs adrénergiques en réponse aux catécholamines est en effet différente entre ces deux dépôts. Les récepteurs β -adrénergiques sont plus actifs dans les adipocytes viscéraux que sous-cutanés alors que les récepteurs α 2-adrénergiques qui freinent la mobilisation des acides gras sont moins sensibles dans les cellules adipeuses viscérales (Wahrenberg et al., 1989). Si le processus de déstockage des acides gras du tissu adipeux est trop intense dans des cas d'accumulation excessive de tissu adipeux viscéral comme chez l'obèse, il y a une augmentation du risque de complications cardiovasculaires puisqu'une trop forte libération des acides gras dans la circulation sanguine au niveau de la

veine porte peut provoquer une hypertension, une hyperlipidémie et une intolérance au glucose ((Shi et Clegg, 2009) ; (White et Tchoukalova, 2014)). De plus, l'expression de cytokines pro-inflammatoires pouvant participer au processus d'inflammation systémique et de résistance à l'insuline associée est augmentée dans le tissu adipeux viscéral (Lee et al., 2013). L'activité d'une protéine (LPL) permettant le transport d'acides gras de la circulation sanguine vers l'adipocyte a aussi été montrée comme étant augmentée dans le tissu adipeux viscéral, favorisant une accumulation de graisse (Boivin et al., 2007).

2 Le tissu adipeux brun

2.1 Localisation anatomique, composition et différenciation

- Localisation

Le tissu adipeux brun est un tissu présent chez les mammifères et les nouveau-nés, bien qu'il ait été montré plus récemment comme persistant chez l'adulte. Il se localise à différents endroits selon l'espèce et l'âge (Figure 23). On le retrouve par exemple en position interscapulaire, péri-rénale et au niveau de la nuque chez le nouveau-né alors que les dépôts majoritaires chez l'Homme adulte se retrouvent en supra-claviculaire. Chez les rongeurs, les zones de tissu adipeux brun sont plus étendues puisqu'ils exposent des dépôts interscapulaires, péri-rénaux, cervicaux et axillaires (Harms et Seale, 2013).

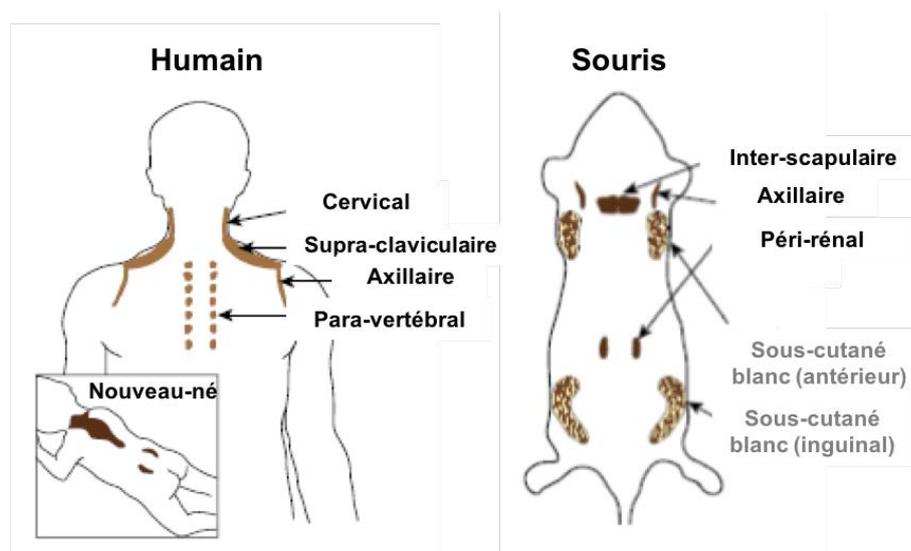


Figure 23 : Localisations du tissu adipeux brun chez l'Homme et chez la souris (adapté d'Ikeda et al., 2018)

- Composition

A l'image du tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun est composé d'adipocytes bruns et d'une fraction stomale-vasculaire. Les adipocytes bruns sont des cellules dites multiloculaires de par la présence de leurs nombreuses gouttelettes lipidiques et sont caractérisés par un noyau localisé en position centrale de la cellule (Figure 24). La fonction la mieux décrite des adipocytes bruns est d'être responsables du phénomène de thermogénèse mitochondriale (cf. Chapitre II, 3.2).

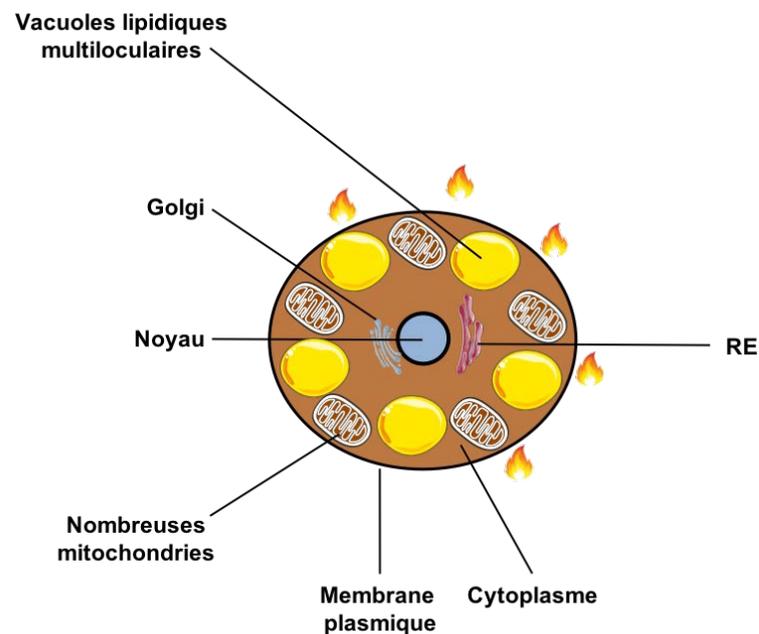


Figure 24 : Composition de l'adipocyte brun

- Différenciation

Les adipocytes bruns sont dérivés d'une population de progéniteurs mésodermiques embryonnaires étant également à l'origine des cellules musculaires squelettiques. Ces progéniteurs sont caractérisés par l'expression transitoire des marqueurs Myf5 et Pax7. Puis, lorsque le précurseur adipogénique brun émerge de la détermination, EBF2 et PPAR γ coopèrent pour induire l'expression de Prdm16 et ainsi conduire à un devenir adipocytaire brun (Harms et Seale, 2013). A l'issue de ce programme de différenciation adipogénique brune, les adipocytes bruns expriment un panel de gènes similaires aux adipocytes blancs matures (α P2, adiponectine ou PPAR γ) mais aussi, des gènes permettant de supporter le découplage mitochondrial ainsi que les hauts niveaux d'oxydation des substrats glucidiques

et lipidiques. Des études transcriptomiques montrent effectivement une signature spécifique des adipocytes bruns qui est notamment constituée d'une protéine découplante capitale (UCP1), d'un régulateur majeur du métabolisme des acides gras (PPAR α), d'un agent remodelant des gouttelettes lipidiques (Cidea), d'une hormone du métabolisme de la thyroïde (Dio2), d'une élongase des acides gras (Elovl3), d'un inducteur de la biogenèse mitochondriale (PGC1 α), d'un acteur du transport des acides gras (Cpt1b) ainsi que des gènes codant des éléments de la chaîne respiratoire mitochondriale (Shapira et Seale, 2019) (Figure 25).

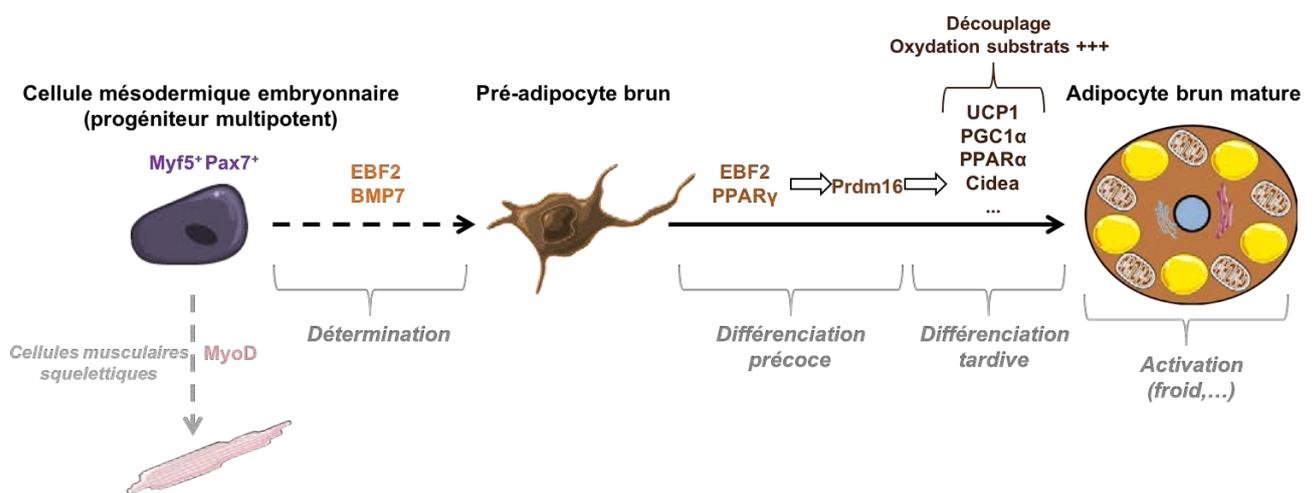


Figure 25 : Cascade de différenciation adipocytaire brune

2.2 Fonction thermogénique

Contrairement au tissu adipeux blanc qui a un rôle majeur de stockage énergétique, le tissu adipeux brun utilise principalement sa source lipidique pour effectuer un processus de thermogénèse. Il est décrit comme étant un avantage lié à l'évolution des espèces, notamment pour permettre la survie et l'activité durant les périodes nocturnes ou froides ainsi qu'au changement thermique subit lors de la naissance (Cannon et Nedergaard, 2004).

Pour ce faire, les adipocytes bruns possèdent un grand nombre de mitochondries qui sont à l'origine de la production de chaleur, notamment grâce à la protéine découplante *UCP1* (cf. *Chapitre II, 3.2*), et qui affichent une forte concentration en cytochromes, responsables de la couleur brune du tissu.

2.3 Activation du tissu adipeux brun

En 1976, Ricquier et Kader observent une augmentation réversible de la masse mitochondriale provenant d'adipocytes bruns de rats exposés au froid, corrélée à une biosynthèse protéique, notamment au niveau de la membrane interne mitochondriale (Ricquier et Kader, 1976).

Dans les adipocytes bruns, la thermogénèse est stimulée entre autres par le système nerveux sympathique et en particulier, par la noradrénaline. Une fois que la noradrénaline est libérée par les afférences sympathiques, elle interagit avec différents types de récepteurs adrénergiques. On peut noter que l'activation du récepteur β_3 -adrénergique est la plus significative. S'en suit alors l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire en aval du récepteur β_3 -adrénergique couplé à la protéine Gs avec activation de l'adénylate cyclase et augmentation des concentrations d'AMPc. L'AMPc peut ensuite activer la libération d'acides gras par la lipolyse, notamment utilisés par UCP1, mais l'AMPc active également la PKA, elle-même responsable de la phosphorylation de la P38-MAPK, aboutissant à la transcription nucléaire de facteurs impliqués *in fine* dans la synthèse de protéines thermogéniques telles qu'UCP1 ((Cannon et Nedergaad, 2004) ; (Cao et al., 2004) ; (Harms et Seale, 2013)) (Figure 26). Cependant, il a été montré qu'une délétion spécifique de l'enzyme lipolytique ATGL dans le tissu adipeux brun altérait la lipolyse sans compromettre l'activation de la thermogénèse non frissonnante en réponse au froid ou à une stimulation β_3 -adrénergique. Ceci suggère une utilisation d'acides gras provenant de voies alternatives (acides gras circulants issus de l'alimentation ou de l'activité lipolytique du tissu adipeux blanc par exemple) (Schreiber et al., 2017).

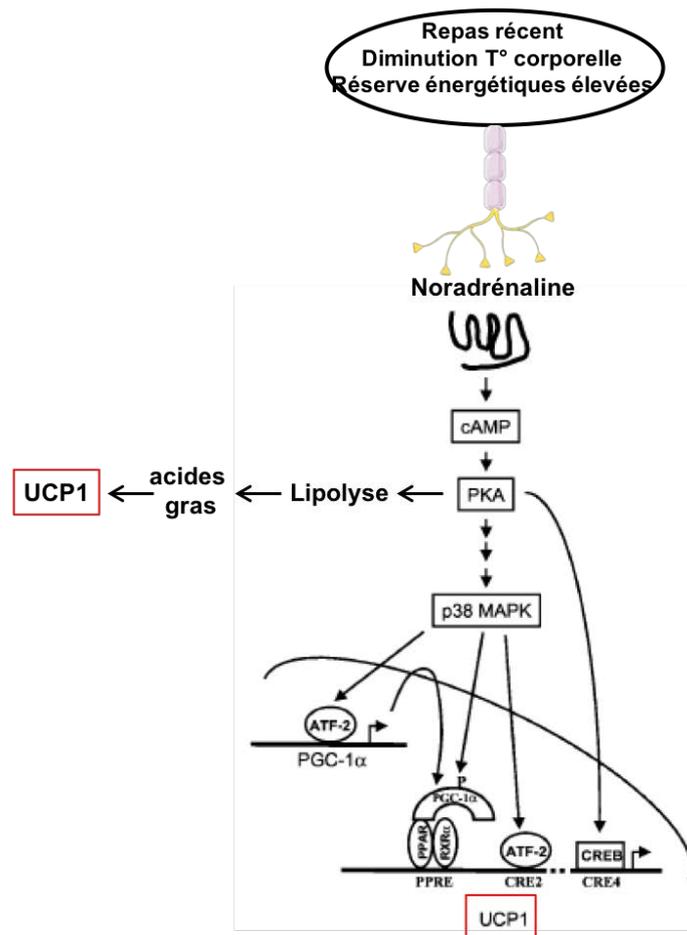


Figure 26 : Régulation adrénérge du tissu adipeux brun (adapté de Cao et al., 2004)

La régulation de la protéine thermogénique UCP1 consiste en une interaction compétitive entre les acides gras et les purines (ATP, ADP, GTP, GDP). Cette interaction suffit à empêcher le passage des protons à travers UCP1. De façon intéressante, la concentration totale en purines est moindre dans les adipocytes bruns que dans les adipocytes blancs. Néanmoins, lorsque les acides gras à longue chaîne sont élevés dans le milieu, la compétition avec les purines est abolie et UCP1 est alors régulée positivement. Il a d'ailleurs été montré que sous stimulation adrénérge, les taux de purines présents dans les adipocytes thermogéniques diminuaient et que cette modulation favorisait l'activité d'UCP1 ((Fromme et al., 2018) ; (Chouchani et Kajimura, 2019)). Par ailleurs et au niveau du tissu adipeux brun, les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales modifient le résidu cystéine 253 sur UCP1, ce qui change alors sa structure en défaveur de l'action inhibitrice des purines et favorisant ainsi l'activité thermogénique d'UCP1 (Chouchani et al., 2016). De plus, l'accumulation d'un intermédiaire du cycle de KREBS, le succinate, induit une production accrue de ROS via son

oxydation au niveau de la succinate déshydrogénase. Cette augmentation de succinate est alors responsable d'une thermogénèse dépendante d'UCP1 (Mills et al., 2018).

3 Le tissu adipeux beige

3.1 Localisation anatomique, composition et apparition

- Localisation

Au cours des années 1980, plusieurs équipes de recherche relatent dans certaines conditions environnementales ou physiologiques la présence de cellules inhabituellement observées au sein du tissu adipeux blanc. Par exemple, une étude montre la présence d'un dépôt adipeux brun dans un tissu adipeux blanc de souris soumise au froid. (Young et al., 1984). A mi-chemin entre le tissu adipeux blanc et brun, ce tissu a ainsi été appelé tissu adipeux beige.

On peut aussi noter que les dépôts adipeux sous-cutanés de rongeurs ont une plus forte tendance à exprimer des marqueurs bruns/beiges comme UCP1 par rapport au tissu adipeux viscéral (Cousin et al., 1993). Dernièrement, le même groupe de recherche a observé une régionalisation structurelle et fonctionnelle de ce phénomène de beigisation au sein du dépôt adipeux inguinal murin, restreint à la zone centrale du tissu (Barreau et al., 2016) (Figure 27).

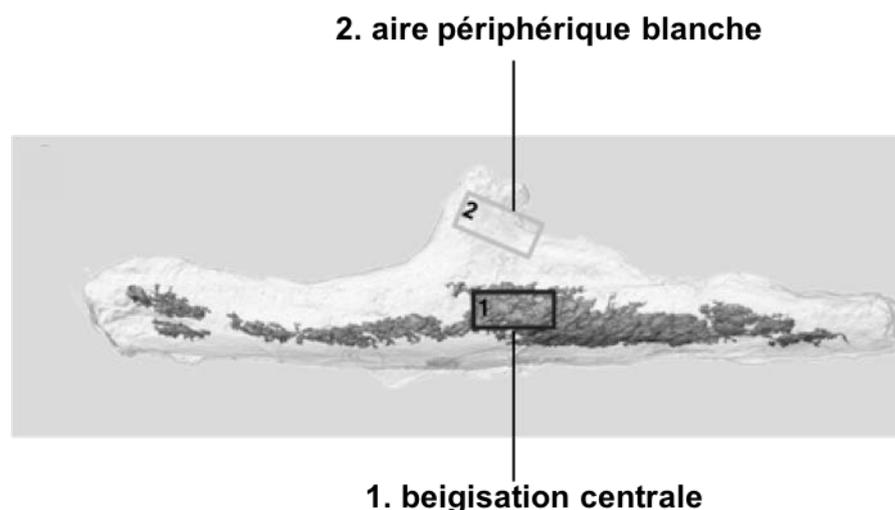


Figure 27 : Régionalisation de la beigisation au sein du dépôt adipeux sous-cutané inguinal (adapté de Barreau et al., 2016)

- Composition

Les adipocytes beiges ont pour particularité d'être plus foncés que les adipocytes blancs. Ils ont en effet un contenu très dense en mitochondries associé à des gouttelettes lipidiques multiloculaires, contrairement aux adipocytes blancs, mais surtout, ces cellules expriment des gènes impliqués dans la thermogenèse non-frissonnante, qui sont en partie les mêmes que ceux exprimés par les adipocytes bruns. Étant donnée leur localisation intrinsèque aux dépôts adipeux blancs, les adipocytes beiges sont entourés de la même fraction stromale-vasculaire que les adipocytes blancs (Figure 28).

Phénotypiquement, des travaux montrent que l'activation du tissu adipeux brun par la noradréline induit une morphologie mitochondriale fissionnée des adipocytes bruns, dépendante de la protéine DRP1, essentielle au découplage mitochondrial (Wikstrom et al., 2014). D'autre part, dans une lignée de cellules souches multipotentes dérivées de tissu adipeux humain (lignée hMADS) trans-différenciée en adipocytes beiges (cf. « apparition : différenciation vs trans-différenciation »), une étude montre que leurs mitochondries présentent une morphologie fissionnée avec une augmentation de l'activité de la protéine de fission DRP1. Il est important de noter que dans ce modèle d'adipocytes beiges humains, la protéine DRP1 est requise pour une bonne efficacité de découplage par UCP1 (Pisani et al., 2018).

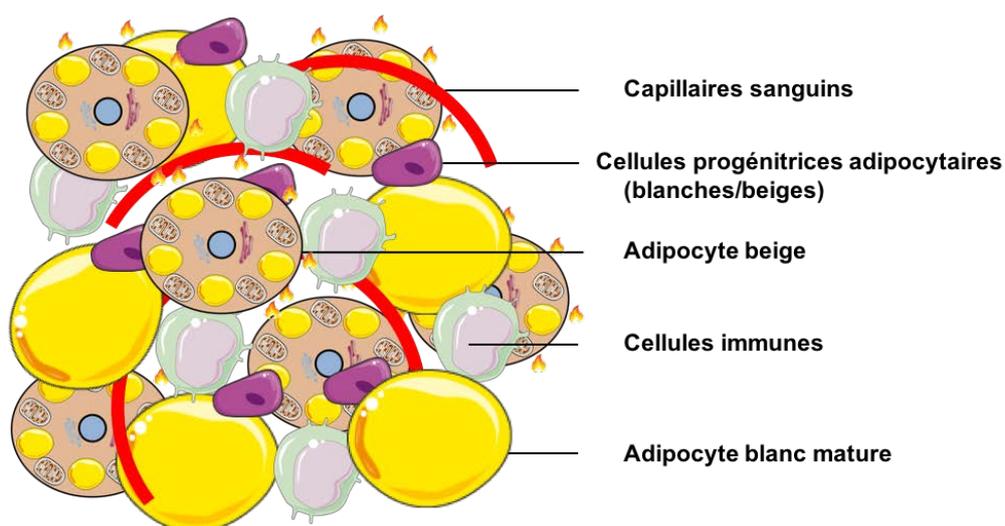


Figure 28 : Constitution du tissu adipeux beige

- Apparition : Différenciation vs Trans-différenciation

Par ailleurs, quelques études montrent que les adipocytes beiges pourraient émerger de deux mécanismes distincts (Figure 29).

Le premier est celui selon lequel l'adipocyte beige apparaît *de novo* à partir d'un précurseur pré-adipocytaire qui se différencie en adipocyte beige si les signaux qu'il reçoit ont pour rôle d'exprimer des gènes thermogéniques. Des travaux chez le rat utilisant le 5-bromodeoxyuridine pour identifier les cellules ayant subi une mitose durant un traitement inducteur de beigisation montrent que la plupart des cellules multiloculaires marquées avec ce marqueur mitotique dérivent des cellules déjà présentes dans le tissu adipeux blanc (Himms-Hagen et al., 2000). Une autre étude plus récente appuie ces observations puisqu'un système de marquage LacZ inductible et permanent des adipocytes matures chez la souris a permis de mettre en évidence que lors d'une activation de la beigisation par un facteur spécifique, la majorité des cellules beiges ayant acquis l'expression d'UCP1 dans le dépôt adipeux sous-cutané ne possèdent pas de marquage LacZ. Par conséquent, cela signifie que les adipocytes beiges dérivent d'une population de précurseurs beiges préexistants dans ce dépôt adipeux (Wang et al., 2013). Durant cette différenciation beige, on note l'intervention des co-activateurs de transcription Prdm16 ou PGC1 α , permettant notamment l'expression de PPAR γ qui rend possible l'expression d'acteurs impliqués dans la thermogénèse et le phénotype brun/beige. Des études de traçage d'adipocytes beiges montrent alors que ces adipocytes dérivent de précurseurs exprimant les facteurs Sma, Myh11, Pdgfra ou Pdgrf β (Ikeda et al., 2018). Enfin, une étude récente chez la souris de séquençage en « single-cell » a montré entre autres qu'un traitement avec un agoniste β 3-adrénergique induisait une augmentation de cellules souches adipeuses en prolifération dans un dépôt viscéral, qui se différencieront ensuite en adipocyte bruns/beiges (Burl et al., 2018).

La deuxième possibilité d'apparition d'adipocytes beiges est le mécanisme de trans-différenciation des adipocytes blancs matures sous l'effet environnemental (froid, catécholamines, etc...). Parmi d'autres travaux, une observation montre la capacité des adipocytes blancs uniloculaires à se convertir en adipocytes beiges en réponse à ces inducteurs de beigisation. L'étude en question chez la souris explique que le nombre d'adipocytes beiges est significativement augmenté d'environ la même quantité que celle perdue en adipocytes blancs (Cinti, 2009). Il a aussi été montré qu'en réponse à une

stimulation au froid, le tissu adipeux blanc inguinal murin subissait une conversion de ses adipocytes en phénotype beige, réversible au bout de cinq semaines à température ambiante (Rosenwald et al., 2013). Une autre étude montre, par une stratégie de traçage d'adipocytes matures et après exposition au froid, que les nouveaux adipocytes beiges apparaissant dans le tissu adipeux blanc inguinal murin sont dérivés d'adipocytes blancs uniloculaires (Lee et al., 2014). De façon intéressante, il existe in vitro la possibilité de trans-différencier une lignée de cellules souches multipotentes dérivées de tissu adipeux humain (hMADS) en adipocytes beiges grâce à la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ (Barquissau et al., 2016).

Quel que soit le mode de formation de l'adipocyte beige différencié, il possède très majoritairement les caractéristiques des adipocytes bruns, avec très peu de différences d'un point de vue génique. Comme chez les adipocytes blancs et bruns matures, les adipocytes beiges présentent des niveaux similaires d'expression de gènes adipogéniques blancs tels que aP2, adiponectine ou PPAR γ . Par contre, sous stimulation à la forskoline activant l'AMPc, les cellules beiges répondent par induction de l'expression génique d'UCP1 atteignant des niveaux comparables à ceux observés dans le tissu adipeux brun (Wu et al., 2012). Par ailleurs, mise à part la fonction de thermogénèse liée au découplage mitochondrial, l'adipocyte beige a sa propre signature génique, différente de celle des adipocytes bruns, avec notamment une expression génique accrue de Khl13, Tmem26, CD137, Ear2 ou encore Tbx1. Aussi, les niveaux d'expression de gènes comme Cidea (favorise l'oxydation des acides gras libres) ou PGC1 α (biogénèse mitochondriale, transcription d'UCP1) sont également induits dans les adipocytes beiges (Wu et al., 2012). De plus, Elovl3, permet de repeupler la perte d'acides gras induite par le métabolisme accru de l'adipocyte thermogénique en catalysant la formation d'acides gras à très longue chaîne. De façon intéressante, l'étude de Wu et ses collaborateurs montre que la signature génique retrouvée dans les adipocytes beiges murins était très similaire à celle retrouvée dans les adipocytes bruns humains.

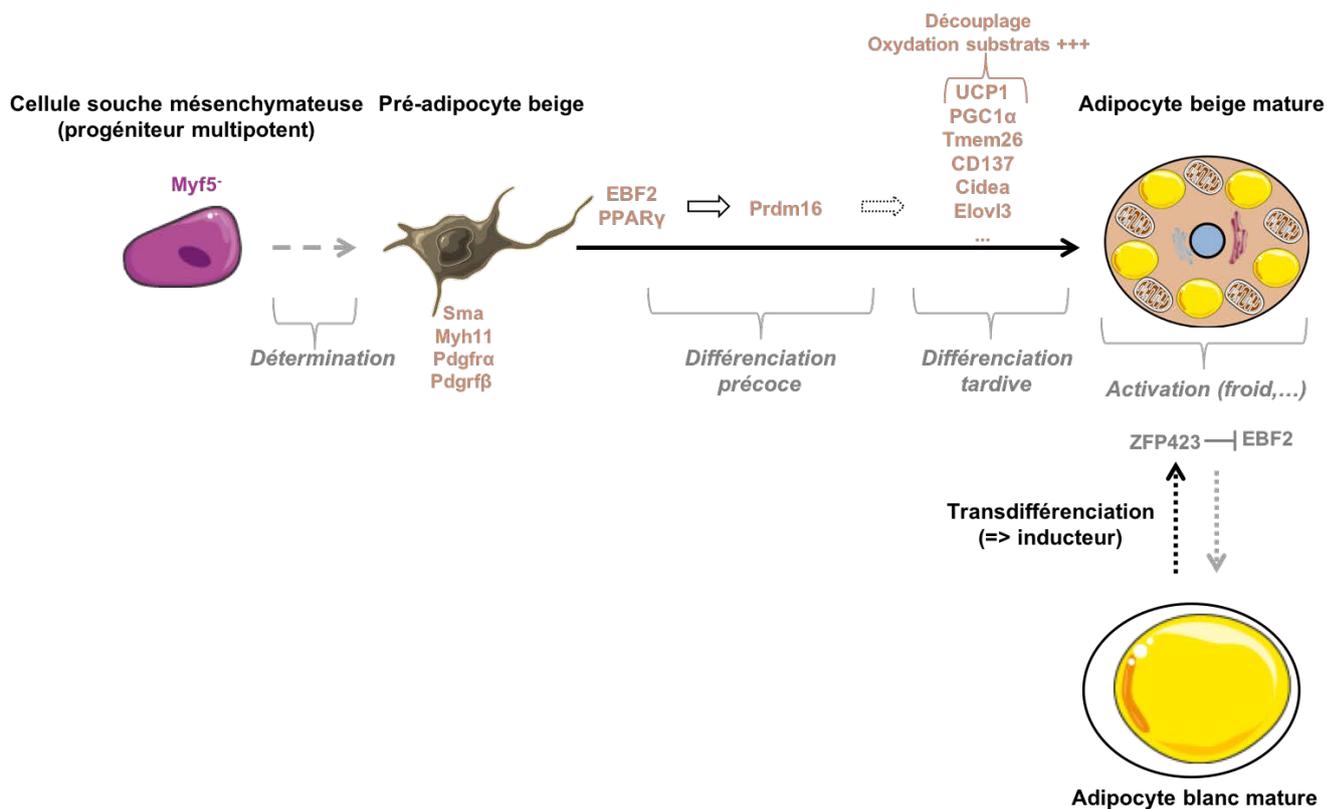


Figure 29 : Origines, étapes et marqueurs de différenciation beige

3.2 Fonction thermogénique (UCP1 dépendante et indépendante)

Comme pour le tissu adipeux brun, le rôle principal des adipocytes beiges est leur fonction thermogénique grâce au découplage mitochondrial, et notamment via UCP1. Il est important de noter que la quantité protéique d'UCP1 dans le tissu adipeux blanc lors d'une adaptation au froid par exemple reste faible (10% de la quantité retrouvée dans le tissu adipeux brun), même si l'induction des transcrits est conséquente. Néanmoins, l'induction de l'ARNm d'UCP1 est maximale quelques heures après la stimulation au froid et revient ensuite à un taux basal alors que la protéine UCP1 n'est induite que bien après. Il apparaît alors que la capacité thermogénique de ce tissu réside dans la quantité protéique d'UCP1 et non pas dans l'induction transitoire des transcrits (Nedergaard et Cannon, 2013). De manière surprenante, les protéines découplantes ne sont pas les seules responsables de la thermogénèse mitochondriale dans le tissu adipeux. Il a effectivement été démontré qu'il existait une biogénèse mitochondriale associée à la beigisation chez des souris dépourvues de la protéine UCP1. De plus, par des expériences de patch clamp sur mitochondries isolées à partir de tissu adipeux brun ou blanc (inguinal et épidydaire), deux types de thermogénèse

mitochondriale ont été mises en évidence ; dans le tissu adipeux brun et inguinal, la fuite des protons a lieu de façon dépendante d'UCP1 alors que dans le tissu adipeux épidydymaire, elle a lieu en majorité indépendamment d'UCP1. Les adipocytes beiges n'étant pas dépendants de la protéine UCP1 pour la thermogénèse ont néanmoins la même morphologie que les autres adipocytes beiges (Bertholet et al., 2017).

Mécanistiquement, il existe un cycle futile de la créatine au niveau de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie qui permet d'hydrolyser un excès d'ATP résultant d'un surplus de consommation d'oxygène au niveau de la chaîne de transport des électrons. Dans le tissu adipeux beige, des analyses protéomiques ont identifié une signature spécifique selon laquelle la créatine augmente la respiration mitochondriale de ce tissu (Kazak et al., 2015). Par ailleurs, il a été montré que l'élévation du cycle du calcium au niveau du réticulum endoplasmique, via l'activation de récepteurs $\alpha 1$ et $\beta 3$ adrénergiques ou du système SERCA2b-RyR2, stimulait la thermogénèse indépendante d'UCP1 dans des adipocytes beiges ((Ikeda et al., 2017) ; (Chouchani et Kajimura, 2019)).

3.3 Inducteurs de la thermogénèse adipocytaire beige

L'apparition des adipocytes beiges peut être induite de diverses façons. Chez l'humain, quelques études révèlent l'existence du processus de beigisation, notamment au sein du tissu adipeux sous-cutané lors d'une situation post-traumatique de brûlure induisant un stress chronique adrénergique (Sidossis et al., 2015). Une autre étude met en évidence que douze semaines d'exercice physique à raison de trois jours par semaine chez des personnes non diabétiques permet d'induire une signature génique beige dans leur tissu adipeux blanc abdominal sous-cutané (Otero-Díaz et al., 2018). En opposition, des travaux aussi récents soulèvent une disparité de localisation du processus de beigisation entre l'humain et la souris. En effet, l'expression génique propre aux adipocytes beiges est plutôt prépondérante au niveau des dépôts adipeux viscéraux chez l'humain, contrairement à la souris dans laquelle ces gènes sont induits dans les dépôts adipeux sous-cutanés (Zuriaga et al., 2017). Il est cependant important de noter que le tissu adipeux péri-épididymaire utilisé dans cette étude, dit viscéral, est plutôt un tissu adipeux intra-abdominal que viscéral.

- **Le froid, le tonus adrénergique et les peptides natriurétiques**

Le froid est un régulateur majeur de la thermogénèse adipocytaire. Il stimule notamment les thermorécepteurs de la peau qui transmettent alors un signal de « défense » par le système nerveux sympathique afin de préserver une température constante au sein de l'organisme. Ainsi, les terminaisons nerveuses sympathiques libèrent des catécholamines pour activer les récepteurs β -adrénergiques localisés sur les adipocytes bruns ou blancs (qui deviendront beiges). L'utilisation d'agonistes des récepteurs β -adrénergiques peut également induire ce phénomène (Harms et Seale, 2013). Le froid ou encore la restriction calorique sont aussi connus pour induire une libération de catécholamines par les macrophages de type anti-inflammatoires ((Nguyen et al., 2011) ; (Fabbiano et al., 2016)). Cependant, ce mécanisme d'induction de la beigisation via les macrophages reste très controversé puisqu'une étude de 2017 contredit ce mode de fonctionnement (Fischer et al., 2017). Plusieurs types de signaux en aval de la PKA peuvent alors entrer en jeu tels que la phosphorylation de la protéine CREB ou de la protéine P38 par exemple pour induire un programme génique d'expression d'acteurs de la thermogénèse mitochondriale incluant UCP1. P38 phosphoryle/active Atf2 et PGC1 α pouvant alors se lier à l'ADN en interagissant avec des co-activateurs de transcription ou des récepteurs nucléaires pour induire l'expression d'UCP1 ou de PGC1 α lui-même (Harms et Seale, 2013). Les signaux intracellulaires en aval des récepteurs β -adrénergiques sont cependant multiples et il apparaît par exemple que l'activation de mTORC1 est essentielle à la stimulation de la beigisation du tissu adipeux (Liu et al., 2016).

Les peptides natriurétiques provenant du cœur (type ANP et BNP), libérés en cas de déficience cardiaque ou d'hypertension, sont également impliqués dans le processus de beigisation du tissu adipeux blanc. Ainsi, à travers un mécanisme similaire à la réponse aux catécholamines via la cascade « AC-AMPC-PKA », les peptides natriurétiques activent la guanylate cyclase (GC) ce qui permet d'accroître les taux de GMPc intracellulaires ainsi que la PKG. Cela permet alors l'expression de gènes thermogéniques de manière dépendante de la phosphorylation de P38 dans les adipocytes murins et humains (Bordicchia et al., 2012).

- **Autres signaux inducteurs**

Plus récemment, plusieurs études mettent en évidence une multitude d'autres signaux capables d'induire ce phénomène de beigisation du tissu adipeux blanc au sein duquel des adipocytes beiges font surface (Figure 30). Par exemple, le facteur de croissance FGF21 produit par le foie (Fisher et al., 2012), les hormones thyroïdiennes T4/T3 (Martínez-Sánchez et al., 2016), l'hormone circulante irisine (cible de PGC1 α) produite par le muscle squelettique lors d'un exercice physique (Boström et al., 2012), certaines protéines de la famille des Bone Morphogenetic Proteins (type BMP8b) (Whittle et al., 2012) ou encore les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales (Chouchani et al., 2016) peuvent induire de la thermogénèse par les adipocytes.

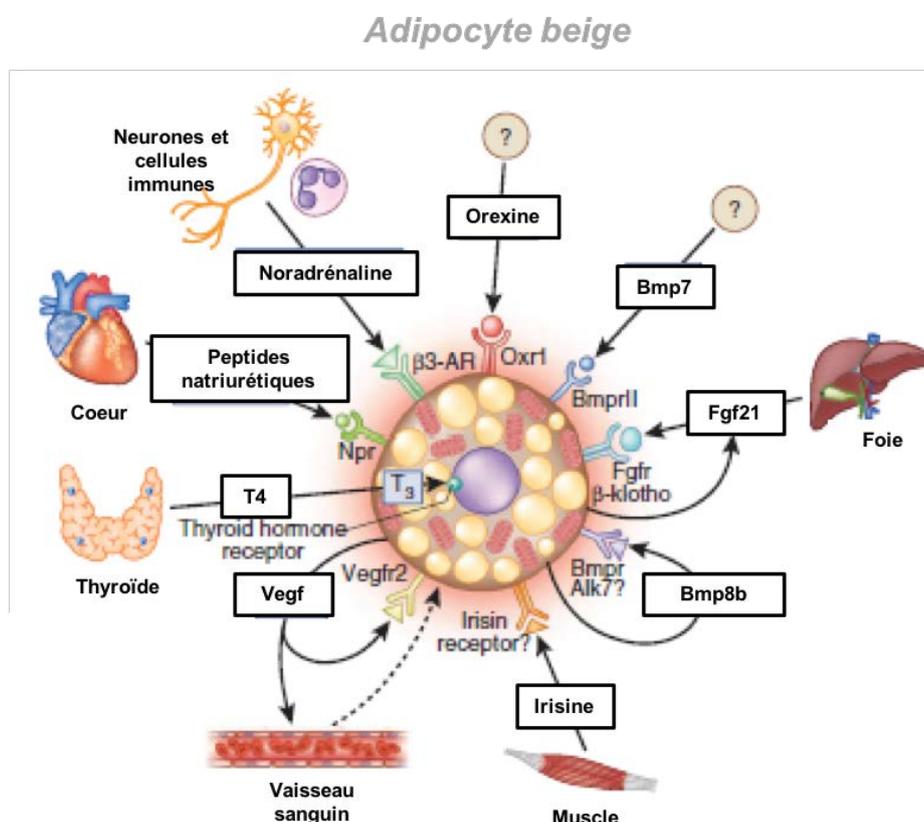


Figure 30 : Inducteurs de beigisation (adapté de Harms et Seale, 2013)

Outre l'induction de ce phénomène par des conditions environnementales ou physiologiques multiples afin de préserver une homéostasie thermique de l'organisme, la connaissance sur l'origine des adipocytes beiges reste encore incomplète.

4 Rôle des tissus adipeux dans la régulation du métabolisme énergétique

De façon générale, un des rôles majeurs du tissu adipeux est de fournir des lipides en situation de besoin énergétique. Outre cette capacité et notamment à travers ses sécrétions ou sa capacité thermogénique (pour les tissus adipeux beige et brun), il participe aussi activement à la régulation du métabolisme énergétique.

4.1 Rôles du tissu adipeux dans l'obésité, l'insulino-résistance, les lipodystrophies et le cancer

Pour la plupart d'entre elles, les adipokines sécrétées par le tissu adipeux sont bénéfiques à la sensibilité à l'insuline ou l'inflammation. Par exemple, chez des souris obèses et insulino-résistantes, l'apeline restore leur tolérance au glucose et stimule l'utilisation du glucose (Dray et al., 2008). Par ailleurs, la baisse de l'adiponectine associée à une lipoatrophie ou à l'obésité génère une insulino-résistance et à l'inverse, sa présence reverse cette insulino-résistance en diminuant le contenu en triglycérides dans le muscle et le foie de souris obèses ou lipoatrophiques (Yamauchi et al., 2001).

D'autre part, il existe une famille de syndromes lipodystrophiques, caractérisés par une déficience de la masse adipeuse, résultant d'un stockage ectopique de lipides dans le foie, les muscles ou dans d'autres organes et créant une insulino-résistance. Cela conduit alors à une hypertriglycémie ou encore au diabète. On note aussi des complications majeures associées aux lipodystrophies telles qu'une hyperphagie, des dysfonctions rénales ou encore des anomalies cardiaques telles que de l'hypertension ou des arythmies (Brown et al., 2016).

Par ailleurs, il est également important de noter que les adipocytes peuvent constituer un réservoir énergétique pour la progression tumorale. Il a en effet été montré en 2016 que les adipocytes entourant la prostate communiquaient par l'intermédiaire de la chimiokine CCL7) et supportaient directement la migration de cellules cancéreuses prostatiques, et ce, de façon très promue par l'obésité (Laurent et al., 2016).

4.2 Cas de la leptine

Dans le cadre de cette thèse, il est capital de détailler les fonctions de l'une d'entre elles impliquée étroitement dans la régulation de l'homéostasie énergétique : la leptine.

La leptine est une hormone majoritairement sécrétée par le tissu adipeux blanc. Ses rôles les plus connus sont d'une part de réguler la prise alimentaire en ayant une action centrale satiétogène, et d'autre part, d'augmenter la dépense énergétique globale (Farooqi et al., 2014). Pour ce faire, la leptine agit sur ses récepteurs sur les neurones hypothalamiques ce qui induit une signalisation intracellulaire. Les récepteurs à la leptine sont une famille d'isoformes classés en formes courtes (OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd, OB-Rf), longue (OB-Rb) ou sécrétée (OB-Re). La fonction des formes courtes est moins bien comprise que celle d'OB-Rb. Mécanistiquement, les voies JAK-STAT ou RAS-MAPK (par une phosphorylation d'ERK1/2) sont activées en aval de ce récepteur. De façon notoire, JAK-STAT n'est activée qu'en aval de la forme longue du récepteur à la leptine (OB-Rb). En revanche, la voie RAS-MAPK est préférentiellement activée en aval des formes courtes du récepteur, bien qu'elle puisse aussi l'être en aval d'OB-Rb. En réponse à la leptine, JAK2 phosphoryle le récepteur sur trois motifs tyrosines (985, 1077 et 1138) pour recruter des effecteurs. De façon intéressante, le motif 985 fournit un site de liaison à la protéine phosphatase SHP2, nécessaire à l'activation de la voie RAS-MAPK. SHP2 a aussi été incriminée dans l'inhibition de la signalisation JAK2/STAT3 en déphosphorylant un motif tyrosine du récepteur à la leptine ((Frübeck, 2006) ; (Zhou et Rui, 2013) ; (Gaspar et al., 2019)). Une déficience en leptine chez la souris et chez l'humain aboutit généralement à une obésité sévère associée à une augmentation de l'appétit et de la prise alimentaire. In vitro, la leptine a été montrée comme induisant une augmentation de l'oxydation lipidique en activant l'AMPK induisant l'inhibition de l'acetyl coenzymeA carboxylase (ACC) (Minokoshi et al., 2002). D'autre part, l'induction de thermogenèse par la leptine est encore controversée. En effet, une étude montre que le signal central en réponse à la leptine aboutit à un message efférent vers un autre tissu, le tissu adipeux brun, pour induire l'expression de la protéine découplante thermogénique UCP1 (Gaspar et al., 2019). Par ailleurs, d'autres travaux montrent que le traitement à la leptine de souris déficientes en leptine (Ob/Ob) n'induit pas de thermogenèse par le tissu adipeux brun mais crée une vasoconstriction au niveau de la queue des animaux afin d'éviter la déperdition d'énergie (Fischer et al., 2016) (Figure 31).

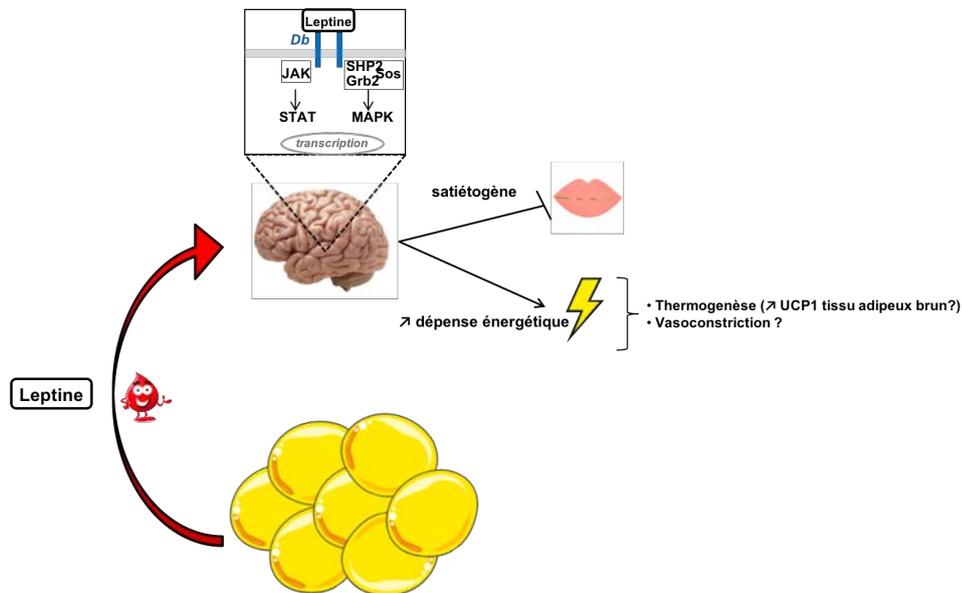


Figure 31 : Actions de la leptine

4.3 Améliorations et altérations métaboliques liées à la thermogenèse du tissu adipeux

- Améliorations métaboliques

La thermogenèse du tissu adipeux est généralement liée à une amélioration générale de l'état métabolique.

En effet, la résistance à l'obésité a été directement associée à l'activation de la beigeisation dans divers modèles murins. Par exemple, une étude montre chez des souris dans lesquelles UCP1 est exprimé spécifiquement dans le tissu adipeux (aP2-UCP1) que ces animaux sont génétiquement résistants à l'obésité, en réduisant la capacité de stockage des graisses (Kopecky et al., 1995). De plus, l'expression transgénique du marqueur Prdm16 dans le tissu adipeux induit le développement d'adipocytes beiges uniquement dans les dépôts sous-cutanés des souris qui présentent alors en réponse à un régime riche en graisses, une augmentation de leur dépense énergétique, une prise de poids limitée ainsi qu'une amélioration à la tolérance au glucose (Seale et al., 2011). Aussi, un groupe de recherche a montré l'existence de macrophages associés au système nerveux sympathique (SAMs) au sein

du tissu adipeux blanc. Ces SAMs sont impliqués dans la clairance de la noradrénaline via l'expression du transporteur SLC6A2 et l'enzyme de dégradation monoamine oxydase A (MAOA). L'activation de cette captation de noradrénaline induit un phénotype pro-inflammatoire des SAMs. De façon intéressante, une augmentation de la proportion de SAMs a été observée dans deux modèles murins d'obésité et la délétion de SLC6A2 dans les SAMs augmente la beigeisation et la thermogénèse du tissu adipeux mais aussi, la perte de poids de souris obèses (Pirzgalska et al., 2017).

D'autre part, une équipe a soulevé que la thermogénèse par UCP1 du tissu adipeux beige permettait d'alléger les effets de la pression oxydo-réductive provoquée par un métabolite, en l'occurrence l'entrée du lactate dans la cellule dans cette étude. La transformation du lactate en pyruvate génère ainsi du NADH,H⁺ nourrissant la chaîne de respiration mitochondriale. Par conséquent, le découplage occasionné par UCP1 permet aux protons de retourner dans la matrice mitochondriale et de contrecarrer ainsi la réaction d'oxydation de NADH,H⁺ en NAD⁺ au niveau des complexes mitochondriaux (Carrière et al., 2014).

On peut aussi noter que le cycle de la créatine, impliqué dans la thermogénèse des adipocytes beiges, est responsable d'une augmentation de la dépense énergétique chez la souris et chez l'humain (Kazak et al., 2015). Il a très récemment été montré que l'ablation du transport de la créatine dans des adipocytes était responsable d'une altération de la thermogénèse, de la réponse β 3-adrénergique et d'une obésité induite par la nourriture. Enfin, l'expression du transporteur de la créatine dans des adipocytes sous-cutanés purifiés humains est associé à une réduction de l'IMC ainsi qu'à une augmentation de l'insulino-sensibilité (Kazak et al., 2019).

- **Altérations métaboliques : cas du cancer**

Néanmoins, au-delà des améliorations métaboliques liées à l'obésité et au diabète, des marqueurs bruns et beiges ont également été montrés comme étant contributifs à la progression tumorale. Des xénogreffes chez la souris à partir de lignées de cellules cancéreuses du sein montrent une élévation de marqueurs de beigeisation. La déplétion de ces cellules (UCP1⁺ en l'occurrence) réduit significativement le développement de la tumeur (Singh et al., 2016). De façon générale, la beigeisation peut être considérée comme une aberration de l'homéostasie du tissu adipeux, ce qui contribue très largement à une

diminution à la fois de la masse adipeuse par l'augmentation de l'activité lipolytique ainsi qu'à une réduction de la masse musculaire liée à une synthèse protéique dérégulée. Par un dialogue inter-organes « tissu adipeux-muscle squelettique », la modification de la sécrétion d'adipokines, d'acides gras libres, d'autres métabolites ainsi qu'une réduction de la production de l'Insulin Growth Factor 1 (IGF1) est impliquée dans l'atrophie du muscle squelettique. Dans le cas du cancer, ce processus de cachexie induit une balance énergétique négative, qui est un facteur de pronostic de survie négatif et ainsi la cause d'au moins 20% des décès associés ((Kir et Spiegelman, 2016) ; (Vaitkus et Celi, 2017)).

4.4 Stratégies à visée thérapeutique

- **Traitement de l'obésité et des désordres associés**

La capacité thermogénique des tissus adipeux brun et beige à dépenser l'énergie contenue dans les substrats suscite un intérêt certain dans le traitement de pathologies telles que l'obésité. Étant donnée la quantité importante de masse adipeuse chez les personnes obèses, plusieurs travaux s'intéressent à la façon d'induire un phénomène de beigisation au sein de leur tissu adipeux blanc dans l'espoir de restaurer une balance énergétique équilibrée et ainsi minimiser les désordres pondéraux et métaboliques associés à l'obésité.

Une étude de 2012 rapporte que l'activation du tissu adipeux brun par le froid chez l'Homme adulte est associé à une augmentation de son métabolisme oxydatif et une augmentation de la dépense énergétique globale des individus testés (Ouellet et al., 2012). Une première approche d'induction de découplage mitochondrial fut un échec. En effet, l'agent découplant 2,4-dinitrophenol (DNP) fut utilisé massivement en tant que médicament pour traiter l'obésité dans les années 1930s. Néanmoins, à de fortes doses, le découplage non régulé de toutes les cellules de l'organisme occasionne des effets secondaires très sérieux comme de l'hyperthermie. Plusieurs overdoses provoquèrent des décès ce qui entraîna la radiation de ce médicament en 1938 par la « Food and Drug Administration (FDA) » des Etats-Unis (Harper et al., 2001).

Une étude récente réalisée chez la souris rendue obèse par un régime riche en graisse démontre qu'un traitement de ces souris par un polyphénol, le resvératrol, empêche l'accumulation de graisses en induisant notamment un phénomène de beigisation du tissu adipeux blanc des animaux via un remodelage de leur microbiote (Liao et al., 2018). Un autre

modèle murin, KO spécifiquement dans les dépôts adipeux pour un répresseur de l'AMPK (souris Adipoq-FLCN), a aussi révélé que l'activation chronique de l'AMPK induisait une beigisation du tissu adipeux à travers l'axe PGC1 α /ERR α et que ce phénomène était suffisant à accroître la dépense énergétique globale des animaux, quel que soit le régime, permettant une résistance à l'obésité (Yan et al., 2016).

Par ailleurs, alors que l'effet de l'exercice physique sur la beigisation du tissu adipeux blanc et de l'amélioration métabolique associée est claire chez le rongeur, peu de travaux ont actuellement été conduits chez l'Homme. Néanmoins, des hommes et des femmes sédentaires, tous IMC confondus, ont été soumis à un programme d'entraînement trois fois par semaine durant douze semaines. A l'issue de cet entraînement, les individus présentent notamment une amélioration de l'insulinosensibilité, surtout dans le groupe de personnes en surpoids. Il a aussi été relevé une augmentation de marqueurs de beigisation au sein d'une biopsie de tissu adipeux sous-cutané abdominal, qui n'est toutefois pas contributif à l'amélioration du métabolisme glucidique constaté. Les auteurs suggèrent alors qu'un processus de beigisation plus fort serait certainement requis pour jouer sur l'amélioration des paramètres métaboliques (Otero-Díaz et al., 2018).

- **Traitement d'autres pathologies**

Au-delà de l'obésité, il a également été montré dans un modèle de souris avec une stéatose hépatique non alcoolique avérée, qu'un traitement avec un agoniste β 3-adrénergique est capable de restaurer la fonction du tissu adipeux brun et a pour conséquence de diminuer le poids corporel des animaux, d'améliorer leur tolérance au glucose et d'induire une réduction des lipides du foie. Cependant, même si une telle activation du tissu adipeux brun permet d'alléger la stéatose hépatique non alcoolique chez la souris, elle ne la reverse pas. Les effets bénéfiques du traitement à l'agoniste β 3-adrénergique sont par contre exacerbés s'il est couplé à une restriction calorique (Poekes et al., 2019). A l'inverse, une autre étude montre que la dénervation du système sympathique au niveau du tissu adipeux brun chez un modèle de rat ayant la maladie de Parkinson permet d'atténuer entre autres la perte de poids des animaux (Wang et al., 2017).

- **Nouvelles stratégies thermogéniques**

A ce jour, aucun traitement pharmacologique n'a pourtant été efficace et contrôlé pour induire un phénomène de beigisation chez l'humain. De plus, au niveau du tissu adipeux brun humain, il existe une hétérogénéité interindividuelle qui contribue potentiellement à des capacités thermogéniques différentes. Des travaux d'analyses clonales et génétiques ont alors par exemple identifié des biomarqueurs de potentiel thermogénique que sont PREX1 et EDNRB, régulateurs positifs d'UCP1, dans des pré-adipocytes bruns et blancs humains (Xue et al., 2015).

Aussi, une étude récente propose un mécanisme alternatif inducteur de la beigisation. Un jeûne intermittent sur des cycles de « 24h nourri/24h jeûne » chez des souris a montré une amélioration du syndrome métabolique chez des souris obèses. Il permet aussi mais surtout d'induire une beigisation spécifiquement dans le dépôt inguinal de la souris et ce, en modifiant la composition du microbiote avec une élévation de la fermentation (production d'acétate et de lactate), doublée d'une surexpression du transporteur à ces produits de fermentation spécifiquement sur les cellules beiges du tissu adipeux. La transplantation de ce microbiote modifié chez des souris dépourvues de microbiote induit d'ailleurs une beigisation et une amélioration de l'homéostasie métabolique des animaux (Li et al., 2017). D'autres travaux montrent par contre chez l'homme et la femme obèse qu'une restriction calorique ou qu'un régime induisant la perte de poids n'induisent pas la beigisation de leur tissu adipeux sous-cutané ; au contraire, la restriction calorique induit une réduction de l'expression génique brune et beige dans la graisse abdominale sous-cutanée de ces patients obèses (Barquissau et al., 2018). En revanche, une diminution du ratio alimentaire oméga6/oméga3 durant douze semaines chez la souris améliore la réponse thermogénique des tissus adipeux bruns et blancs et augmente la perte de poids en réponse à une stimulation β 3-adrénergique (Ghandour et al., 2018). En effet, la complémentation en oméga 3 compense l'inhibition de la fonction thermogénique des adipocytes par les dérivés des oméga 6, autrement dit, les prostaglandines PGF2 α issues de la métabolisation des oméga 6 qui induisent une diminution de l'expression d'UCP1 via une voie calcique (Pisani et al., 2014).

De façon intéressante, des méthodes de thérapie cellulaire commencent également à émerger. Un groupe de recherche a dernièrement mis au point une méthode pour générer des adipocytes beiges matures humains découplants, capables de sécréter des facteurs

améliorant la sensibilité à l'insuline. Ces cellules (iPSC) sont générées à partir de mésoderme FOXF1⁺ de patients diabétiques et ont pour but d'être transplantées chez ces patients afin d'améliorer leur état métabolique (Su et al., 2018).

Conclusion (chapitre III) :

Pour résumer cette troisième et dernière partie introductive aux résultats expérimentaux qui suivent, on a pu se rendre compte que le tissu adipeux est un organe à part entière qui se divise en trois types distincts ayant différents rôles : le tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun et le tissu adipeux beige. Les dépôts adipeux sont métaboliquement actifs et sont capables de stocker ou d'utiliser de l'énergie, notamment en gérant la balance acides gras libres/triglycérides. Ils sont également à l'origine de la libération d'hormones impliquées dans la régulation métabolique via la dépense énergétique, la prise alimentaire, la sensibilité au glucose ou encore, la sensibilité à l'insuline. De façon intéressante, les tissus adipeux bruns et beiges ont la particularité de brûler de l'énergie sous forme de chaleur, processus étant généralement associé à une amélioration des paramètres métaboliques énergétiques de l'organisme. Dans le cadre d'un syndrome métabolique associé à l'obésité par exemple, des stratégies d'induction de la beigisation du tissu adipeux blanc ont été réalisées à plusieurs reprises sans résultat efficace aboutissant à la disponibilité de traitement à ce jour, et mimer ce phénomène de façon contrôlée reste encore un défi.

Résultats expérimentaux

Introduction

De nombreuses études ont déjà bien caractérisé les altérations développementales retrouvées dans la famille de maladies génétiques appelées Rasopathies. En effet, les Rasopathies sont causées par des mutations d'acteurs ou de régulateurs de la voie RAS-MAPK, une voie de signalisation ubiquiste qui joue des rôles clés au cours du développement en régulant des processus fondamentaux (prolifération, différenciation, survie cellulaire, migration). Ainsi, il est maintenant bien établi que la plupart des traits cliniques majeurs associés à ces maladies sont causés par une hyperactivation de la voie RAS-MAPK. Par ailleurs, la littérature atteste de fonctions majeures de différents composants de la voie RAS-MAPK, notamment SHP2, dans le contrôle du métabolisme énergétique : par exemple, l'inactivation de SHP2 dans divers tissus a des conséquences importantes, et parfois contradictoires, sur le métabolisme énergétique (Tajan et al., 2015). Cependant, bien que quelques études récentes démontrent un phénotype énergétique dans plusieurs Rasopathies (Dard et al., 2018), les origines, les mécanismes mis en jeu, et les conséquences physiopathologiques ne sont pas connus, notamment dans le syndrome de Noonan (SN), la Rasopathie la plus fréquente.

Nous avons exploré les conséquences d'une mutation de SHP2, fréquemment retrouvée chez les patients atteints de ce syndrome, sur le métabolisme énergétique. Dans une première partie de ce travail, nous avons tiré parti d'un modèle murin bien établi, récapitulant les traits de la maladie et portant à l'état hétérozygote cette mutation (KI *Ptpn11*^{D61G/+}), dans lequel nous avons exploré le métabolisme énergétique. Parallèlement, nous avons cherché à évaluer l'impact d'une mutation de SHP2 associée au SN à l'échelle cellulaire, notamment sur la fonction mitochondriale. Les données obtenues révèlent que le SN est associé à des anomalies métaboliques complexes, combinant des perturbations de la dépense énergétique, des anomalies du tissu adipeux et de l'activité mitochondriale.

I- Étude du métabolisme énergétique dans un modèle murin du SN

1. Les souris SN ont une augmentation de leur dépense énergétique

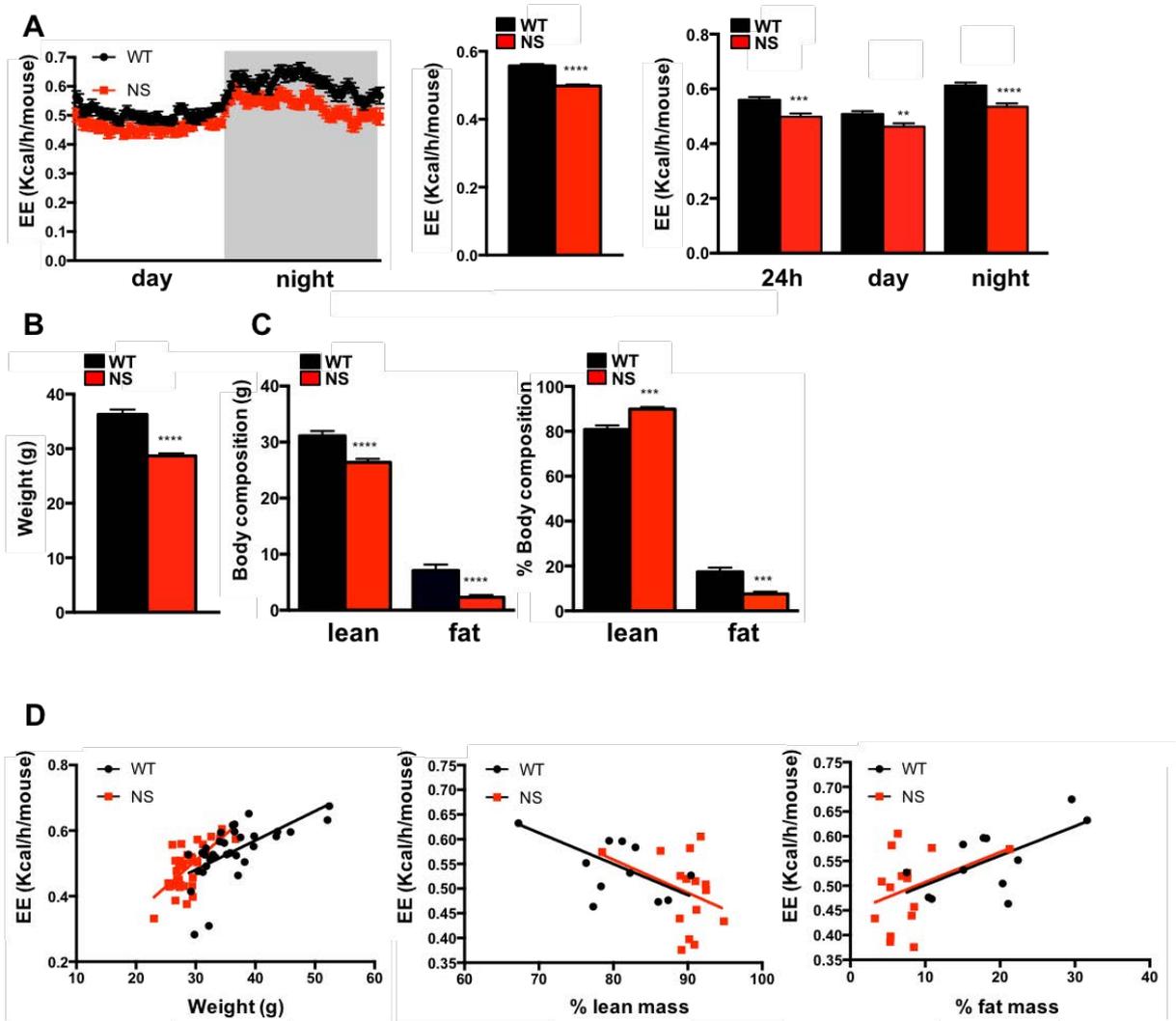
Afin d'évaluer l'impact des mutations de SHP2 sur le métabolisme énergétique, nous avons mesuré la dépense énergétique de souris SN mâles, âgées de 20 semaines, et leurs contrôles WT, par une approche de calorimétrie indirecte.

Après une période d'acclimatation de 24h, nous avons placé les animaux individualisés dans des cages métaboliques pendant une durée minimale de 48h respectant les conditions d'hébergement de ces souris (cycle jour/nuit, température, hygrométrie, nourriture et boisson *ad libitum*), et avons mesuré l'échange de gaz O₂ consommé/CO₂ produit afin de calculer la dépense énergétique des animaux. Cette analyse montre que les souris SN présentent une dépense énergétique plus faible que les souris WT (Figure 1A). Cette moindre dépense énergétique est retrouvée aussi bien pendant le jour, période de repos des animaux, que pendant la nuit, période d'activité et d'alimentation des animaux. Cependant, les souris SN, de façon similaire aux patients, présentent un important retard de croissance ((Araki et al., 2004) ; (Serra-Nédélec et al., 2012) ; (Cessans et al., 2016)), qui se traduit par une réduction significative du poids corporel des animaux (Figure 1B). L'analyse de la composition corporelle des souris par résonance magnétique (EchoMRI) montre que cette réduction est proportionnée, touchant à la fois les tissus maigres et adipeux (Figure 1C). De façon intéressante, la proportion de masse grasse des animaux SN est significativement diminuée, résultant en une augmentation de la proportion de masse maigre, de façon cohérente avec les données cliniques récemment obtenues sur une cohorte de patients SN (annexe 2).

Il est bien établi que ces paramètres sont fortement contributifs au calcul de la dépense énergétique. Nous avons alors choisi d'analyser nos données selon un test statistique ANCOVA, permettant de prendre en compte ces co-variables (Figure supplémentaire 1). Ces analyses confirment une très forte corrélation entre la composition corporelle, le poids et la dépense énergétique des animaux (Figure 1E) et révèlent également qu'à poids égal, la dépense énergétique des souris SN tend à être plus élevée (0,525+/-0,011 Kcal.h vs 0,496+/-0,012 Kcal/h pour un poids de 32,3g, p=0,126) que celle des souris WT. Afin de s'affranchir du

retard staturo-pondéral des animaux SN, nous avons donc ré-analysé nos données de calorimétrie en normalisant ces mesures par rapport au poids métabolique des animaux. Le poids métabolique est défini par un taux énergétique de l'animal proportionnel au poids corporel élevé à la puissance 0,75. En effet, suite à des études incluant la dépense énergétique, le poids, la surface corporelle ainsi que le type d'espèce, le facteur 0,75 a été adopté. Comme le montre la figure 1F, la dépense énergétique normalisée des animaux SN est significativement plus élevée que celle de leurs contrôles WT (Figure 1F). Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs montrant que des souris exprimant des mutants de SHP2 associés au SN ou au SN-ML ((He et al., 2012) ; (Tajan et al., 2014)) mais aussi des patients atteints du syndrome de Costello (SC), présentent une dépense énergétique normalisée augmentée (Leoni et al., 2016). Par ailleurs, le quotient respiratoire des souris SN est, légèrement, mais significativement augmenté par rapport aux WT, ce qui signe une préférence générale de l'utilisation des substrats glucidiques (Figure 1G). De plus, la prise alimentaire, lorsque normalisée au poids des animaux, est significativement augmentée chez les souris SN, tandis que leur activité locomotrice spontanée est sensiblement diminuée (Figures 1H, I). L'analyse de ces mêmes paramètres sur des animaux plus jeunes (10-15 semaines) révèle une différence moins marquée, bien que toujours significative, de la dépense énergétique des souris SN par rapport aux WT, de leur prise alimentaire ou encore, de leur quotient respiratoire, ce qui pourrait alors signifier qu'il existe une évolution métabolique au cours du temps de vie chez les souris SN (Figure supplémentaire 2).

De façon intéressante, l'implantation de sondes télémétriques, permettant la mesure de la température interne des souris en temps réel, révèle une élévation de la température interne des animaux SN, phénotype pouvant potentiellement être en accord avec l'augmentation de la dépense énergétique et traduisant de profondes modifications métaboliques internes (Figure 1J).



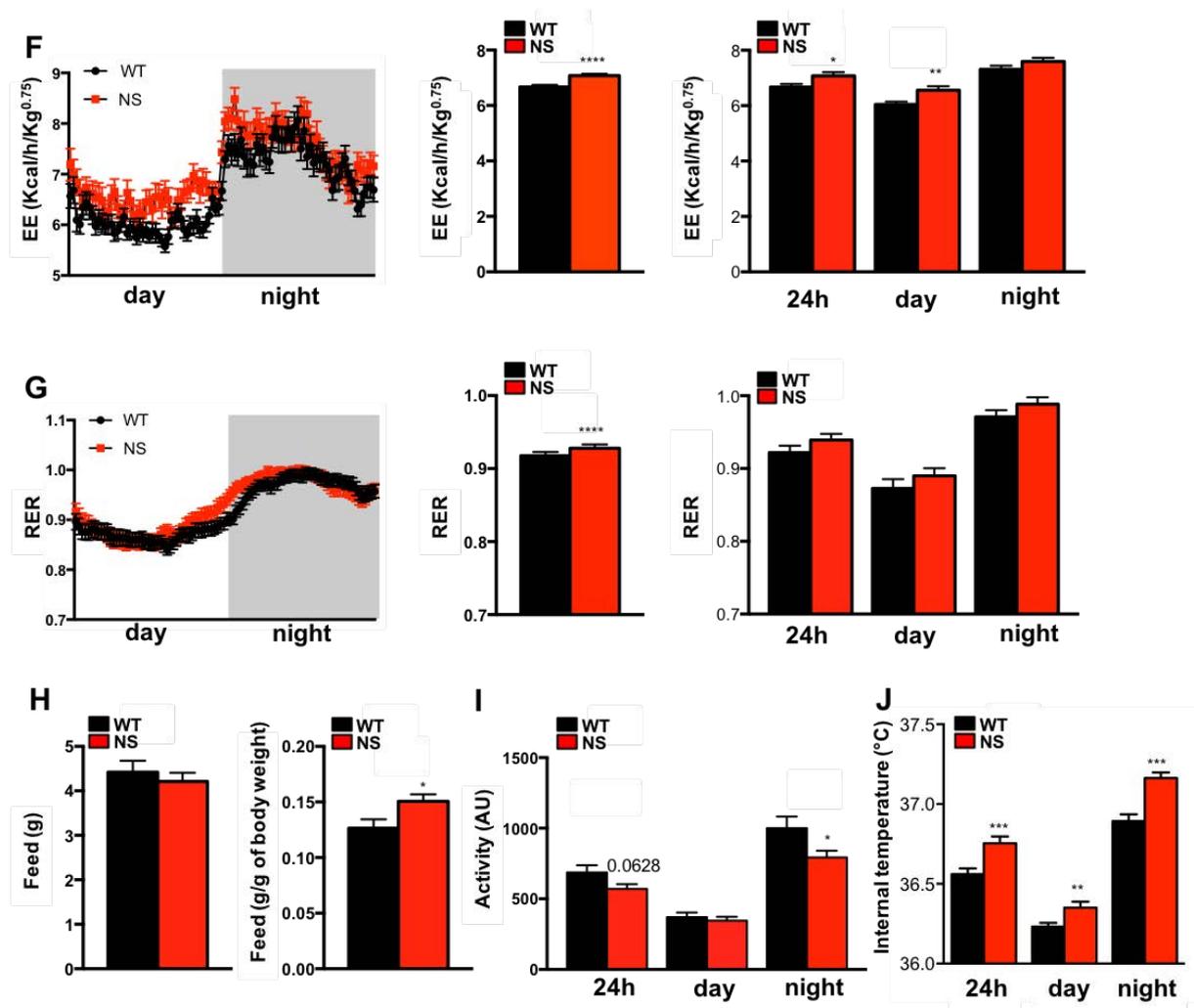


Figure 1 : Les souris SN ont une augmentation de leur dépense énergétique normalisée

(A) Des souris WT et SN âgées de 20 à 24 semaines ($28 < n < 32$) ont été maintenues en régime standard et la dépense énergétique a été analysée par calorimétrie indirecte durant 24h (PhenoMaster). (B) Poids des souris WT et SN. (C) Composition corporelle (masses grasse et maigre) déterminée à l'aide d'un EchoMRI (valeurs brutes et normalisées au poids). (D) Corrélation entre la dépense énergétique et le poids, la proportion de masse maigre ou la proportion de masse grasse. (E) Les données de dépense énergétique ont été ré-analysées avec une normalisation par rapport au poids des souris. (F, G, H) Le quotient respiratoire, la prise alimentaire et l'activité locomotrice spontanée des souris ont aussi été calculés pendant l'expérience de calorimétrie indirecte. (J) Des sondes de températures ont été implantées dans le péritoine des souris et leur température interne a été mesurée par télémétrie (n=9). Tests statistiques : test de Student en série appariées pour les analyses de calorimétrie et de télémétrie, test de Student pour les analyses de poids, de composition corporelle et de prise alimentaire, t : * p < 0.05; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001 ; **** p < 0.0001.

2. Augmentation de la densité, de la biogenèse et de la respiration mitochondriale dans le tissu adipeux inguinal des souris SN.

Afin de comprendre l'augmentation de la dépense énergétique des souris SN, nous avons ensuite réalisé une analyse de l'activité métabolique de différents tissus de ces mêmes souris. En accord avec leur faible poids et leur adiposité réduite, les souris SN présentent une réduction de leurs dépôts adipeux par rapport aux WT (SC inguinal (SC), péri-gonadique (PG) et brun (TAB)). Le poids du foie et du muscle gastrocnémien normalisé au poids du corps est comparable entre les 2 génotypes, (Figure 2A). Dans ces différents tissus, nous avons évalué le fonctionnement de la mitochondrie, carrefour énergétique de la cellule, par une mesure oxygraphique, reposant sur la consommation d'oxygène par le tissu. Ces analyses montrent que la respiration basale et l'activité des différents complexes mitochondriaux sont normales dans le muscle. Dans le foie, on remarque une diminution significative de la respiration basale. Le TAB présente une activité normale, avec une augmentation significative de l'activité du complexe II. De façon remarquable, ces mesures faites sur les tissus adipeux blancs montrent que la chaîne de transport des électrons mitochondriale de ces tissus, en particulier du tissu adipeux SC, a un fonctionnement accru chez les souris SN par rapport aux souris WT. L'activation successive des différents complexes révèle une augmentation globale de la respiration mitochondriale de ce tissu (Figure 2B).

Au vu de ces résultats, nous avons ensuite estimé la densité mitochondriale en quantifiant le nombre de copies d'un gène spécifiquement mitochondrial (*cytochromeB*) et d'un gène spécifiquement exprimé au niveau du noyau (*36B4*). Cette estimation montre une élévation de la densité mitochondriale dans le tissu adipeux SC (Figure 2C).

Nous avons également évalué le processus de biogenèse mitochondriale en quantifiant le niveau d'expression génique de différents marqueurs de la mitochondriogenèse, à savoir *Pgc1 α* , *Pgc1 β* , *Tfam* et *Nrf1*. Comme le montre la figure 2D, l'expression génique de *Pgc1 α* , *Pgc1 β* et *Tfam* est significativement augmentée dans le tissu adipeux SC SN (Figure 2D). Il existe finalement une augmentation significative de la densité, de la biogenèse et de la respiration mitochondriale exclusivement dans le tissu adipeux SC inguinal des souris SN.

Bien que surprenants, ces résultats appuient alors l'hypothèse d'une contribution du tissu adipeux SC SN à l'élévation de la dépense énergétique des souris.

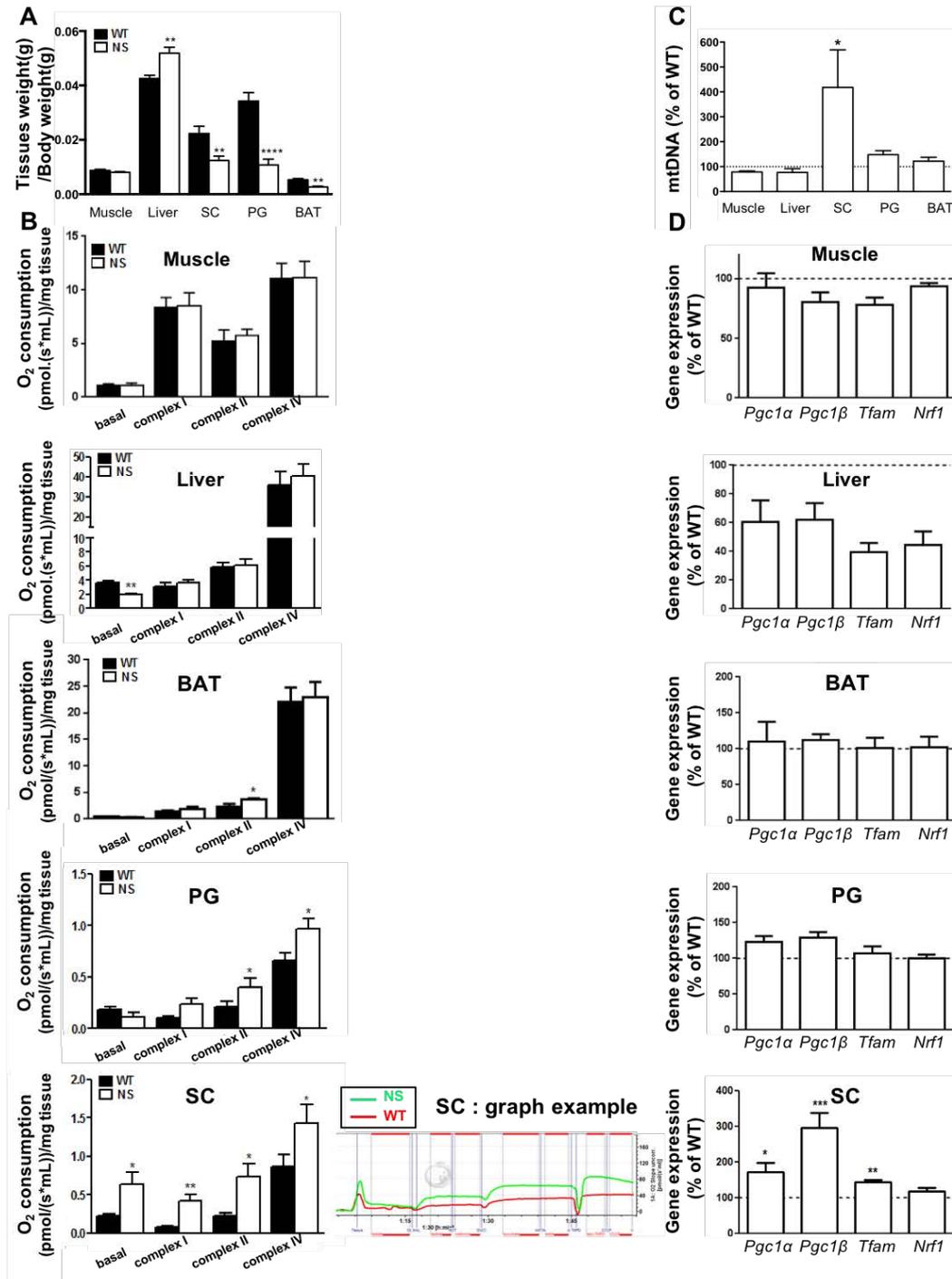


Figure 2 : Augmentation de la densité, de la biogenèse et de la respiration mitochondriale dans le tissu adipeux inguinal des souris SN

A l'âge de 20-30 semaines, des souris WT et SN ont été euthanasiées, puis leurs tissus ont été prélevés, pesés et utilisés pour différentes analyses. (A) Les poids des tissus ont été normalisés par rapport au poids corporel des souris WT et SN (sous-cutané (SC), péri-gonadique (PG) et brun (BAT)); 25 semaines ; $5 \leq n \leq 12$). (B) La consommation d'O₂ des différents tissus a été mesurée grâce à un oxygraphe (Oroboros). Les résultats ont été normalisés par rapport au poids du morceau de tissu placé dans l'oxygraphe. (C) Une extraction d'ADN et une qPCR avec une amorce nucléaire (36B4) et une amorce mitochondriale (Cytochrome B) ont été réalisées sur différents tissus (WT=7 ; SN =6) de souris âgées d'environ 20 semaines pour estimer la quantité d'ADN mitochondrial. (D) Sur ces mêmes animaux, une extraction d'ARN et une qPCR ont été réalisées pour évaluer l'expression des gènes indiqués. Test statistique : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

3. UCP1 est spécifiquement surexprimé dans ce tissu et les souris SN présentent un phénotype de résistance au froid.

L'identification d'une augmentation de la densité, de la biogenèse et de la respiration mitochondriale spécifiquement dans le tissu adipeux SC des souris SN nous a conduits à procéder à une analyse plus poussée autour de ce tissu. Un marquage hémalun-éosine d'une section longitudinale de dépôts adipeux SC révèle une densité accrue d'adipocytes de petite taille au centre du panicule. De plus, par immunohistologie, nous montrons une augmentation du marquage anti-UCP1 dans le tissu adipeux SC SN (Figure 3A), mettant ainsi en évidence un phénomène de beigisation dans ce tissu. Ce marqueur brun/beige thermogénique découplant est localisé en position centrale du tissu, ce qui appuie le phénotype beige du tissu, comme démontré dans des études antérieures (Barreau et al., 2016). L'analyse de l'expression génique de plusieurs marqueurs exprimés entre autres lors du processus de beigisation (*Elovl3*, *PPAR α* , *AR β 3*) montre aussi une augmentation de l'expression de ces marqueurs (Figure 3B). Enfin, l'utilisation de l'agent découplant CCCP (chélateur de protons) lors d'une mesure de la consommation d'oxygène du tissu démontre que le découplage induit par le CCCP est moindre dans le tissu adipeux SC des souris SN par rapport aux animaux WT (Figure 3C), suggérant alors une capacité de découplage déjà presque maximale chez le SN avant l'utilisation du CCCP, probablement due à la présence accrue d'UCP1 dans le tissu. Nous devons maintenant confirmer l'expression protéique d'UCP1 par Western blot. De façon intéressante, la surexpression des marqueurs beiges, de même que l'activité mitochondriale accrue, ne sont pas retrouvées de façon significative dans le tissu adipeux SC d'animaux plus jeunes, présentant une moindre élévation de leur dépense énergétique, appuyant l'hypothèse d'une contribution du tissu adipeux SC beige à l'augmentation de la dépense énergétique (résultats non montrés).

Par ailleurs, afin de comprendre si le phénotype beige pouvait impacter le métabolisme général des souris SN, nous avons testé leur capacité de résistance au froid. Nous avons ainsi placé les souris durant 4h à une température de 4°C dans des cages individuelles pour éviter les regroupements d'animaux pouvant induire un réchauffement de l'organisme. La température interne des animaux a été prise grâce à une sonde rectale à différents temps. On observe alors que la chute de température des souris SN est moindre que celle des WT (Figure 3D). Des expériences complémentaires, sur une cohorte d'animaux plus importante

et/ou durant des temps d'exposition plus importants, seront toutefois nécessaires pour confirmer cette observation. Par extrapolation, nous pourrions émettre l'hypothèse selon laquelle la résistance des souris SN au froid serait liée à la thermogenèse générée par le tissu adipeux inguinal beige. L'analyse des tissus juste après l'exposition au froid permettra de documenter ce processus.

De façon intéressante, une expérience préliminaire de mise à température dite de thermoneutralité (30°C) des animaux permettant d'équilibrer les échanges thermiques avec l'environnement montre que la dépense énergétique des souris SN diminue (Figure 3E). Il serait aussi intéressant voir si la beigisation chez les SN disparaît à thermoneutralité, auquel cas ce phénotype serait dû à un manque d'isolation thermique, probablement à cause de la réduction des dépôts adipeux.

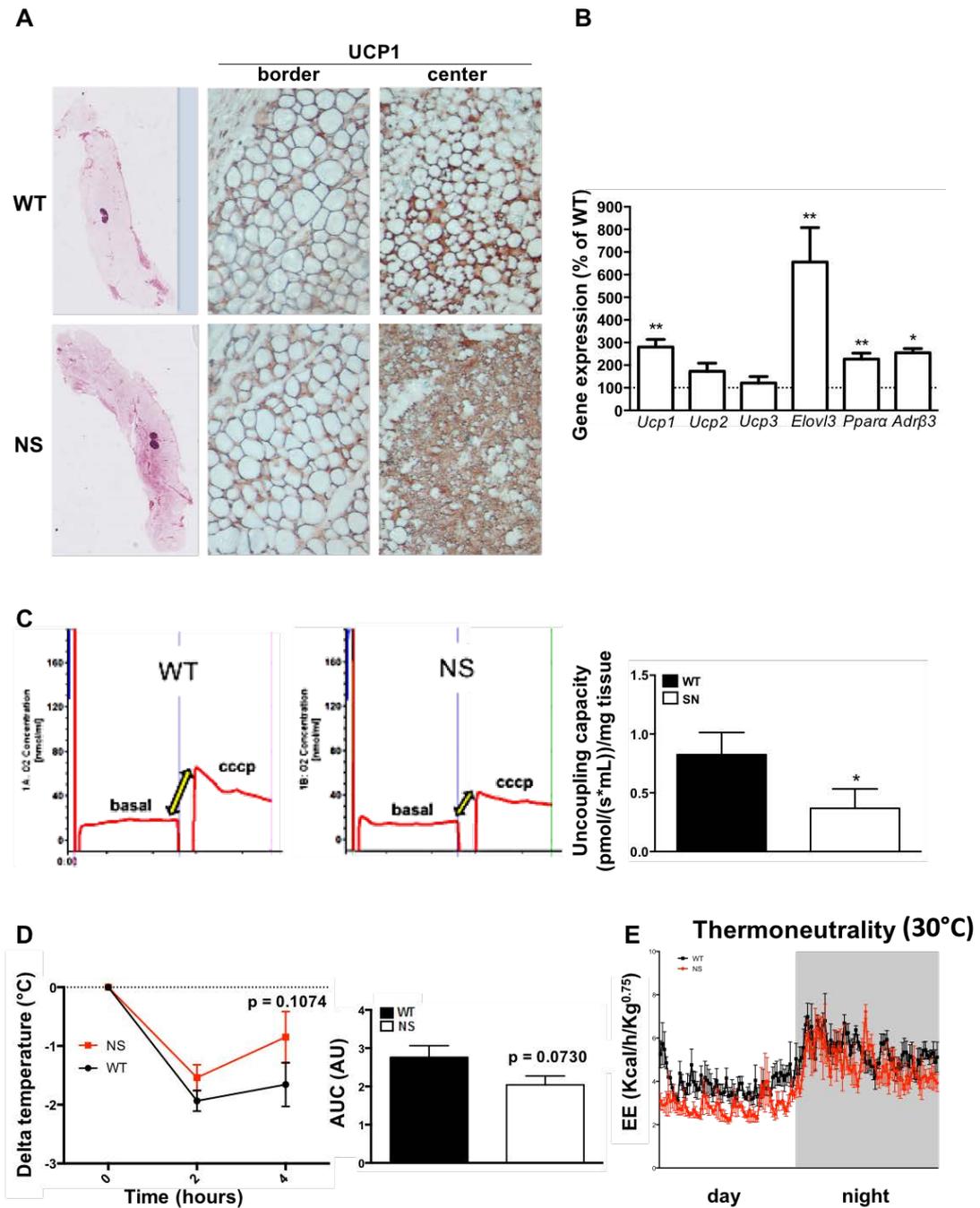


Figure 3 : UCP1 est spécifiquement surexprimé dans le tissu adipeux inguinal et les souris SN semblent présenter un phénotype de résistance au froid

(A) Photographies de sections histologiques de tissu adipeux SC de souris WT et SN marquées avec de l'hématoxyline-éosine (Nanozoomer, Hamamatsu, section longitudinale entière) et immunohistochimie d'UCP1 (Nikon Eclipse TE2000-U, x10). (B) Une extraction d'ARN et une qPCR ont été réalisées sur du tissu adipeux SC de souris WT et SN âgées de 20 semaines pour évaluer l'expression des gènes indiqués. (C) La consommation d'O₂ a été mesurée sur du tissu adipeux SC de souris WT et SN grâce à un oxygraphe (Oroboros) ; l'agent découplant CCCP (25ng/mL) a été ajouté pour déterminer la respiration maximale du tissu. (D) Des souris âgées de 30 semaines (WT (n=9) ; NS (n=10)) ont été placées dans une chambre froide (4°C) pendant 4h et la température rectale a été mesurée à différents temps (0h, 2h, 4h). (E) La dépense énergétique de souris WT et SN âgées de 15 semaines et placées à thermoneutralité (30°C) a été mesurée (n=4). Tests statistiques : test de Student : * p < 0.05 ; ** p < 0.01, Two-way ANOVA avec post test de Bonferroni, comparaisons multiples, pour la variation de température au cours du temps.

4. Le phénotype beige induit par l'expression de mutants de SHP2 associés au SN semble être un mécanisme cellule-autonome

Nous avons ensuite cherché à comprendre l'origine de la « beigisation » du tissu adipeux blanc observé chez les souris SN. Selon la littérature, ce processus peut être induit par plusieurs facteurs extérieurs au tissu adipeux, comme le froid, les agonistes β 3-adrénergiques (catécholamines) ou le FGF21. Il peut aussi avoir une origine intrinsèque au tissu adipeux, en lien notamment avec des modifications des capacités de différenciation des cellules adipocytaires. Le dosage des catécholamines plasmatiques ou du FGF21 selon une méthode de test ELISA ne met pas en évidence de différence de concentration en adrénaline, noradrénaline et FGF21 entre les souris WT et SN (Figure 4A). Il existe cependant une augmentation de l'expression génique du récepteur β 3-adrénergique dans le tissu adipeux SC des souris SN (Figure 3B), qui pourrait rendre compte d'une plus grande sensibilité de ce tissu aux catécholamines. Dans ce sens, la mesure de la lipolyse sur adipocytes isolés à partir de tissu adipeux péri-gonadique en réponse à un agoniste β 3-adrénergique (isoprénaline) montre une tendance à une sensibilité accrue des adipocytes SN à l'isoprénaline (Figure 4B). De plus, l'analyse de différents profils de calorimétrie indirecte révèle qu'au cours du processus d'acclimatation, lorsque les animaux sont stressés par l'installation dans l'appareil, le quotient respiratoire s'effondre, signant une activité lipolytique potentialisée chez les animaux SN (résultats non montrés).

Parallèlement, SHP2 étant connue pour jouer un rôle majeur dans le processus de différenciation adipocytaire ((He et al., 2013) ; (Tao et al., 2016)), nous avons voulu explorer si la mutation SN de SHP2 pouvait modifier les propriétés de différenciation des pré-adipocytes de façon intrinsèque. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps isolé la fraction stroma vasculaire (FSV) de tissu adipeux SC et analysé son profil d'expression génique au regard de marqueurs pré-adipocytaires (*Pref1*, *Prdm16*). Nous observons que l'expression génique du marqueur précoce beige *Prdm16* tend à augmenter dans la FSV du tissu adipeux SC SN. En revanche, celle du marqueur *Pref1*, permettant de maintenir un état cellulaire non différencié, a tendance à baisser (Figure 4C). Nous avons ensuite soumis les cellules de la FSV de tissu adipeux SC à un protocole de différenciation adipocytaire. A l'issue de la différenciation, nous notons une moindre accumulation de gouttelettes lipidiques dans les

adipocytes dérivés de tissu adipeux SC de souris SN par rapport à leurs contrôles WT (Figure 4D), révélant un retard/défaut de la différenciation des cellules provenant des dépôts de souris SN. Au niveau génique, l'expression de plusieurs marqueurs d'adipocytes blancs (*Adiponectine*, *aP2*, *Lhs*, *Ppar γ*) tend à être diminuée, sans toutefois atteindre des différences statistiques. Les conditions de cette expérience n'ont par contre pas permis d'observer d'induction de marqueurs de la différenciation beige (*UCP1*, *Elovl3*, *Tmem26*), et donc d'évaluer une éventuelle prédisposition des précurseurs adipocytaires SN à la différenciation beige. Des expériences d'induction de la différenciation beige par traitement de cellules de la FSV avec de la rosiglitazone, un agoniste de *PPAR γ* , visant à déterminer s'il existe une signature génique beige exprimée dès le début de la différenciation dans les cellules SN, sont en cours.

Aussi, pour compléter ces résultats, nous avons tiré parti d'un modèle cellulaire, des cellules adipeuses souches multipotentes humaines (hMADS), permettant de mesurer la trans-différenciation d'adipocytes blancs en adipocytes beiges, en collaboration avec l'équipe du Pr D.Langin. Selon un protocole antérieurement décrit (Barquissau et al., 2016), ces cellules ont été différenciées durant treize jours afin d'atteindre un stade adipocytaire mature. Au dixième jour de différenciation, les cellules ont été transduites avec des adénovecteurs permettant l'expression de la GFP seule ou en combinaison avec la forme WT de SHP2 en guise de contrôles, ou bien le mutant SN D61del de SHP2. A partir du quatorzième jour après le début de la différenciation, les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (0.1 μ M) afin d'induire une trans-différenciation des adipocytes matures blancs en adipocytes beiges. Comme le montre la figure 4E, le niveau de transduction est similaire entre les différentes conditions. L'analyse du profil d'expression génique au cours de la trans-différenciation beige montre une augmentation de l'expression d'*Ucp1*, *Elovl3* et *Tmem26* dans les cellules contrôle. De façon intéressante, ces marqueurs sont significativement plus exprimés lorsque les cellules expriment le mutant SN de SHP2 (Figure 4E). Nous pouvons donc affirmer que la mutation D61del de SHP2 est suffisante pour augmenter le phénotype génique beige, ce de façon cellule-autonome.

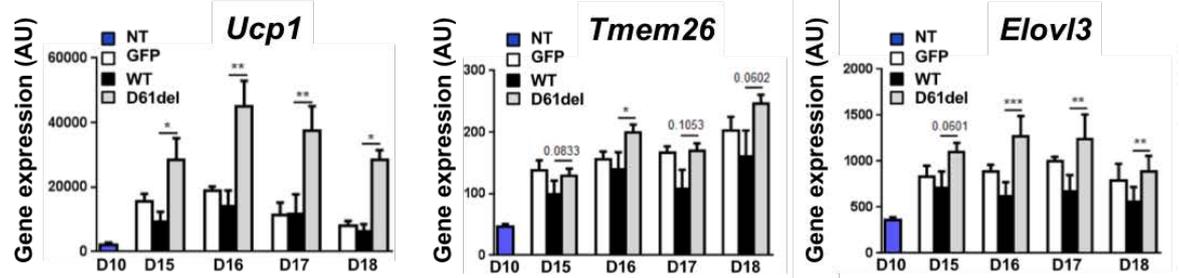
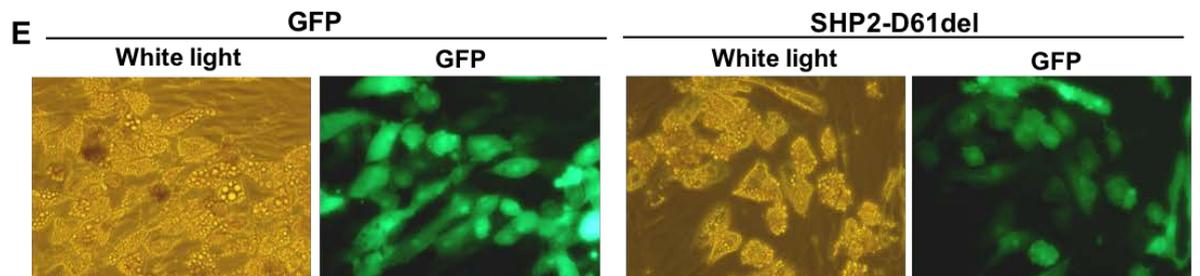
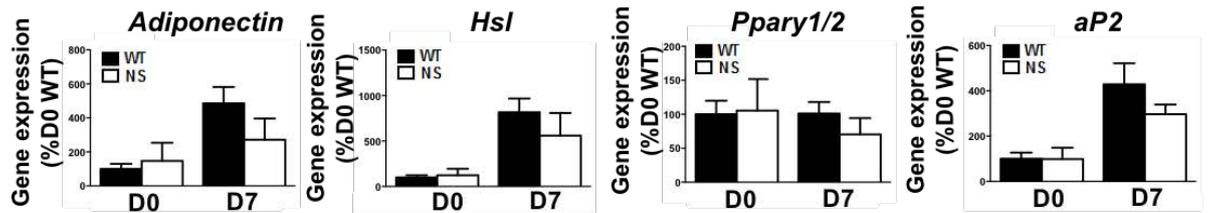
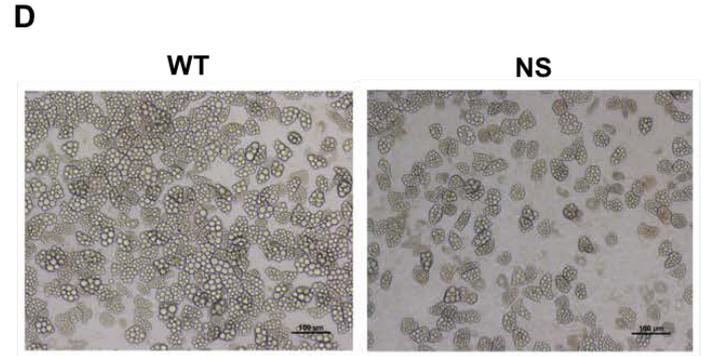
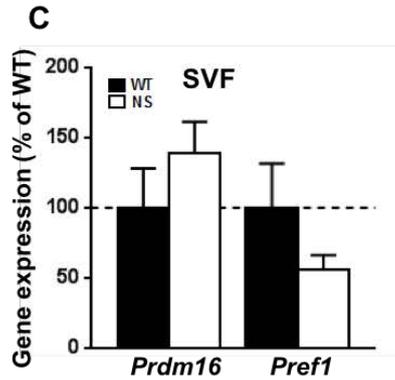
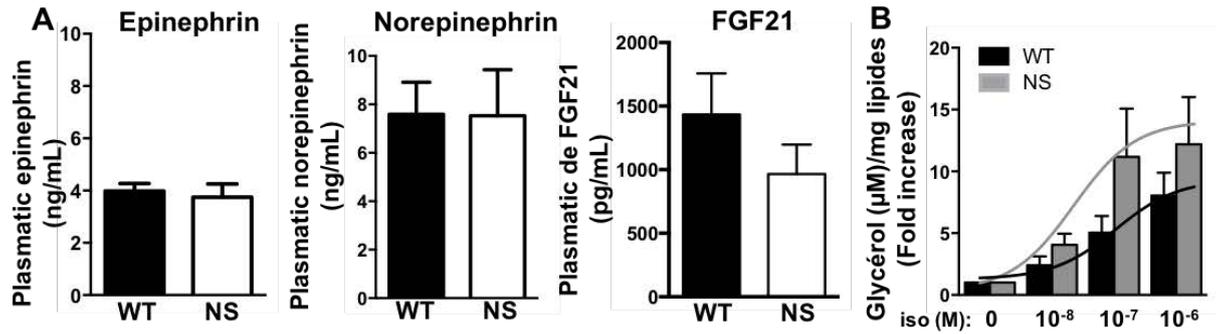


Figure 4 : Le phénotype beige induit par l'expression de mutants de SHP2 associés au SN semble être un mécanisme cellule-autonome

(A) Sur des souris WT ($10 \leq n \leq 11$) et SN ($6 \leq n \leq 8$) âgées de 20-25 semaines, un dosage de catécholamines plasmatiques (adrénaline et noradrénaline) ou de FGF21 a été réalisée à l'aide de kits ELISA (WT = 16 et SN =13). (B) Une stimulation lipolytique sur adipocytes (PG) isolés de souris WT et SN âgées de 15-20 semaines ($6 \leq n \leq 8$) stimulés à différentes concentrations d'isoprénaline a été réalisée, les valeurs de glycérol ont été lues à 540nm grâce à un spectrophotomètre et normalisées par un dosage lipidique selon la méthode de Dole. (C) Une extraction d'ARN suivie d'une qPCR a été réalisée sur FSV entière de souris WT et SN (20 semaines ; WT=7 et SN=8) pour évaluer l'expression des gènes indiqués. (D) Le tissu adipeux SC de souris âgées de 15 semaines WT ($2 \leq n \leq 5$) et SN ($4 \leq n \leq 5$) a été récupéré pour une digestion à la collagénase. La FSV purifiée a été mise en culture et soumise à un protocole de différenciation adipocytaire. Enfin, ces cellules ont été photographiées à J7 de différenciation adipocytaire avec un microscope Nikon Eclipse Ti (x20). De plus, les ARN des cellules récupérées à J0 et J7 ont été extraits dans le but de réaliser une qPCR pour évaluer l'expression des gènes indiqués. (E) La lignée pré-adipocytaire humaine hMADS a été transduite avec des adénovecteurs GFP, SHP2-WT ou SHP2-D61del au jour 10 de différenciation et ces cellules ont été ensuite traitées à la rosiglitazone (0,1 μ M) au jour 14 pour induire une trans-différenciation beige. Puis, une extraction d'ARN et une qPCR ont été réalisées à différents jours de différenciation (15, 16, 17, 18) pour évaluer l'expression des gènes indiqués. Test statistique : test de Student : * p <0.05 ; ** p <0.01 ; *** p <0.001.

5. Le phénomène de beigisation du tissu adipeux SC SN semble dépendant de la voie Ras-MAPK.

Enfin, puisque l'hyperactivation de la voie RAS-MAPK est causale de la plupart des traits cliniques du SN, nous avons voulu savoir si cette voie était impliquée dans la beigisation du tissu adipeux des souris SN. Les animaux ont ainsi été soumis à une injection quotidienne intra-péritonéale d'un inhibiteur de MEK1 durant quatre semaines (inhibiteur PD0325901 vs contrôle HPMC). L'analyse des tissus révèle une normalisation de l'expression génique des marqueurs de biogenèse mitochondriale (*PGC1 α* , *PGC1 β* , *TFAM*, *Nrf1*) ainsi que du marqueur brun/beige UCP1 dans le tissu adipeux SC SN (Figure 5A). On note aussi une tendance à la diminution de la densité mitochondriale dans le tissu adipeux SC SN des animaux traités avec l'inhibiteur (Figure 5B). Une analyse histologique semble également montrer une diminution de l'expression d'UCP1 dans ce tissu, bien que ces résultats doivent être confirmés (*résultats non montrés*). Le phénotype beige présent dans le tissu adipeux SC des souris SN semble donc dépendant de l'hyperactivation de la voie Ras-MAPK. En revanche, le traitement ne normalise pas la dépense énergétique et la prise alimentaire des animaux (Figure 5C, D). Cela pourrait éventuellement s'expliquer par une tendance à l'augmentation de l'activité locomotrice spontanée et du poids des souris WT soumises à l'inhibiteur (Figures 5E, F).

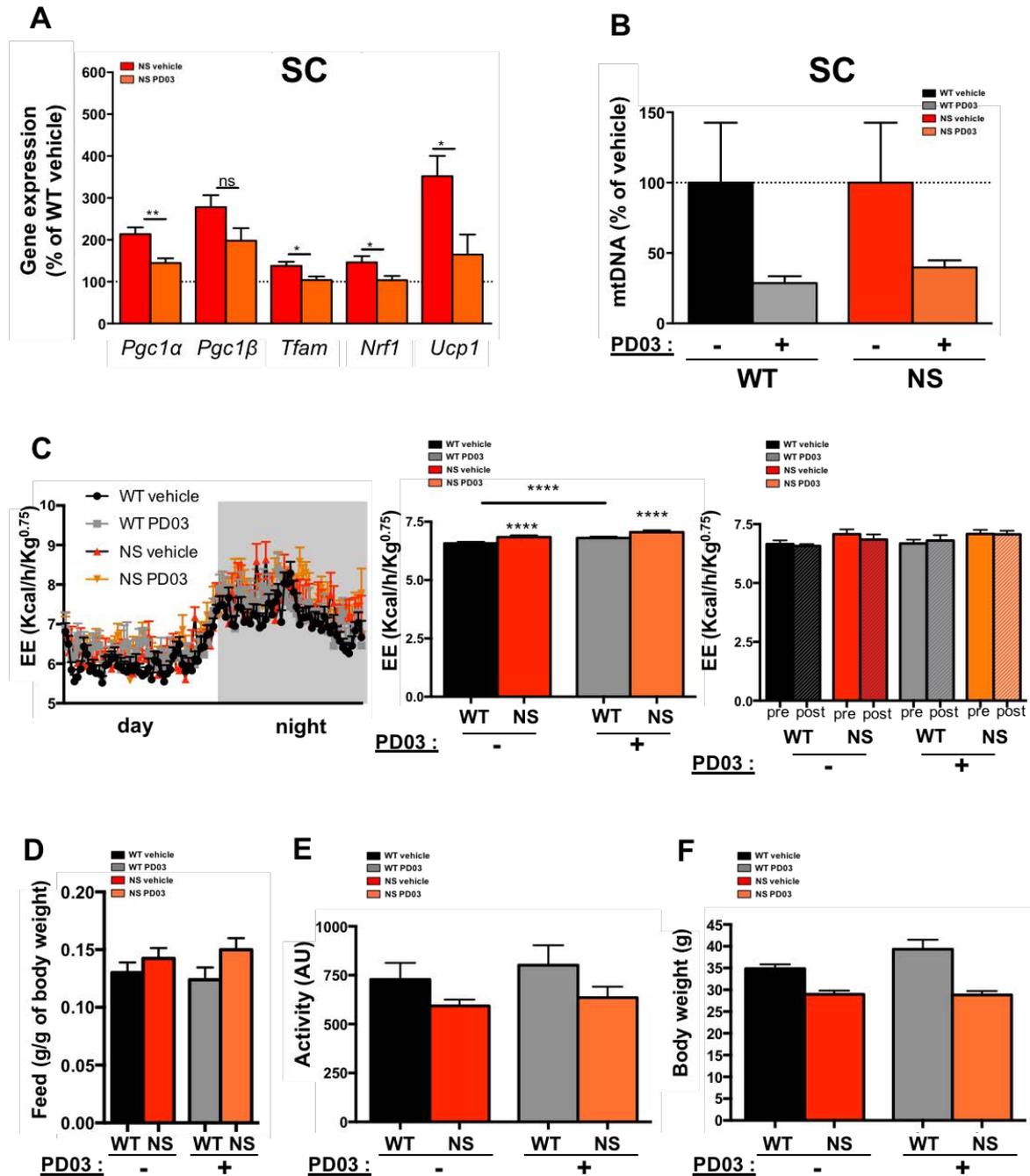


Figure 5 : Le phénomène de beigisation du tissu adipeux SC SN semble dépendant de la voie Ras-MAPK

Des souris WT et SN âgées de 15-25 semaines ($9 \leq n \leq 11$) ont reçu un traitement quotidien de 4 semaines de PD0325901 (inhibiteur de MEK1, 1mg/Kg/jour) ou de véhicule en contrôle par injection intrapéritonéale. (A) Une extraction d'ARN et une qPCR ont été réalisées sur leur tissu adipeux SC pour évaluer l'expression des gènes indiqués. (B) Une extraction d'ADN et une qPCR ont été réalisées sur tissu adipeux SC pour estimer la densité mitochondriale ($n=5$). (C) Grâce à une technique de calorimétrie indirecte, la dépense énergétique des animaux a été mesurée et normalisée par rapport au poids des animaux. (D) La prise alimentaire et (E) l'activité locomotrice spontanée ont aussi été calculées. (F) Poids corporel (en grammes) des souris WT et SN. Test statistique : test de Student et test de student en série appariées pour les données de calorimétrie : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

II- Étude de l'impact d'une mutation de SHP2 associée au SN sur la mitochondrie

1- L'expression d'une mutation SN de SHP2 dans des cellules fibroblastiques altère la fonction mitochondriale

Pour tenter de comprendre la mécanistique sous-jacente aux modifications de la fonction mitochondriale observées in vivo, nous avons tiré parti d'une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) dans lesquels nous avons exprimé un mutant SN de SHP2 (SHP2^{D61del}) après adénofection (ou GFP en contrôles). La quantification de l'ADN mitochondrial révèle une tendance à la diminution du nombre de copies d'ADN mitochondrial dans les cellules exprimant le mutant SN de SHP2 (figure 6A). De plus, plusieurs marqueurs de la biogenèse mitochondriale voient leur expression significativement diminuée (Figure 6B). Enfin, l'analyse de la respiration mitochondriale par Seahorse révèle une diminution quasi-significative de la respiration basale et de la respiration maximale, associée à une diminution de la production d'ATP (Figure 6C). Bien que ces résultats apparaissent en contradiction avec les données obtenues dans les tissus adipeux blancs, ils ne sont pas sans rappeler le profil observé, à l'état de tendance, dans le muscle squelettique ou le foie des souris SN, et sont par ailleurs en accord avec une étude antérieure montrant une altération de la fonction mitochondriale in vitro associée à la même mutation (Lee et al., 2010). Ces différences pourraient donc refléter une spécificité selon la nature des cellules/tissus, possiblement en lien avec leur capacité à métaboliser certains substrats énergétiques.

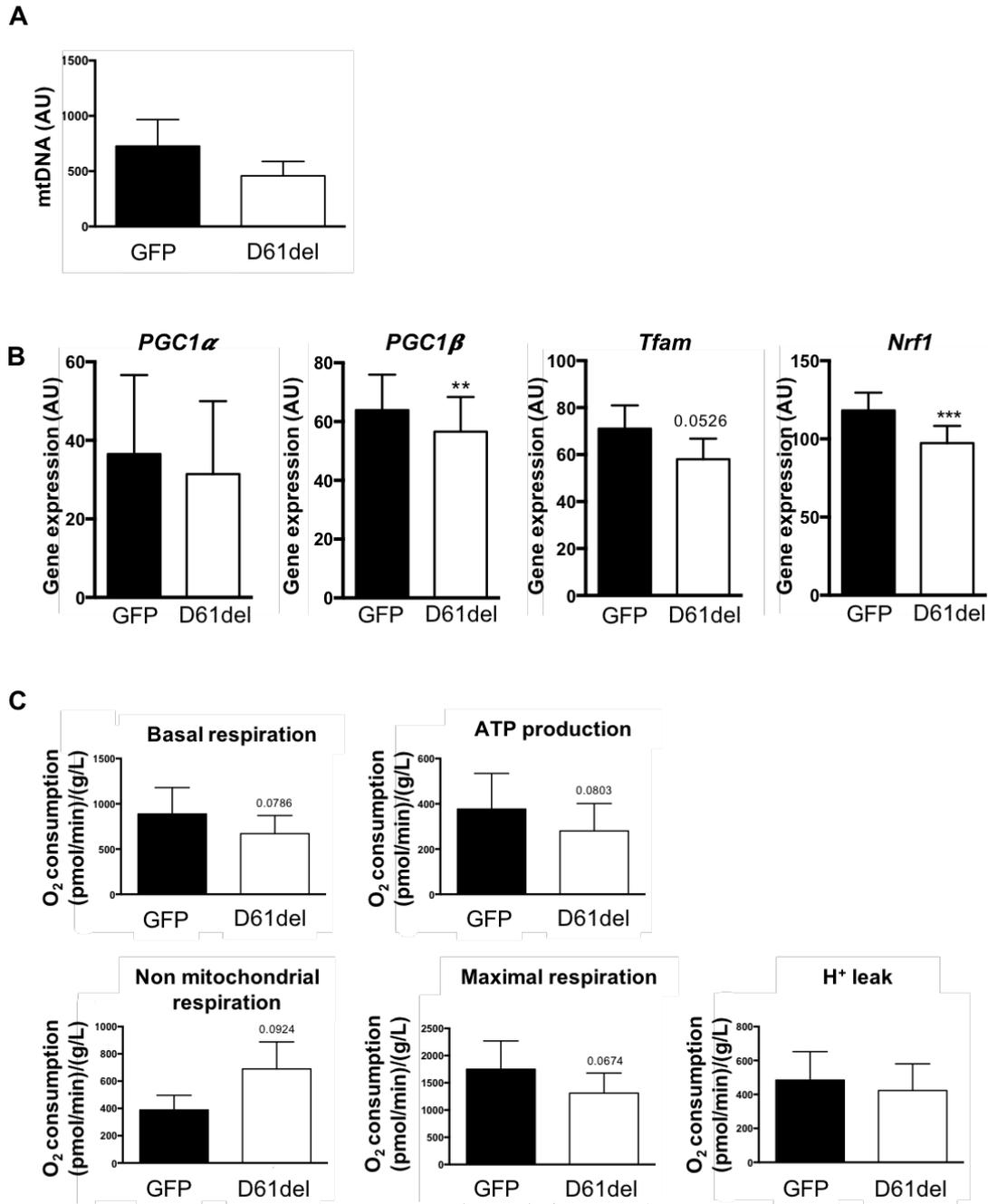


Figure 6 : L'expression d'une mutation SN de SHP2 dans des cellules fibroblastiques altère la fonction mitochondriale

(A-B) Les cellules MEFs transduites avec des adénovecteurs GFP ou SHP2-D61del ont été ensemencées à 85000 cellules/puits et une extraction d'ADN (A) ou d'ARN (B) suivies d'une qPCR ont été effectuées pour estimer la densité mitochondriale (A) ou évaluer l'expression des gènes indiqués (B). (C) Ces cellules ont été ensemencées dans une plaque adéquate dans le but de mesurer la consommation d'oxygène cellulaire grâce à un appareil d'oxygraphie (Seahorse®, Agilent). Des inhibiteurs spécifiques de la chaîne de transport des électrons mitochondriale ont alors été ajoutés successivement afin de déterminer la consommation d'oxygène à différentes étapes de la machinerie métabolique. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la concentration protéique contenue dans les puits, dosée à l'issue de la mesure oxygraphique. Test statistique : test de Student : ** p < 0.01 ; *** p < 0.001.

2- L'expression d'une mutation SN de SHP2 semble affecter la balance fusion/fission mitochondriale

L'activité mitochondriale étant intimement liée à la structure du réseau mitochondrial, nous avons également exploré l'impact de l'expression exogène du mutant SN de SHP2 sur la morphologie des mitochondries. Pour cela, des MEFs ont été transduites comme précédemment, puis leur réseau mitochondrial a été marqué à l'aide du MitoTracker, et analysé par microscopie à fluorescence super résolutive. Des premières expériences avaient ainsi permis d'observer une morphologie très particulière des mitochondries, en forme toroïdale (\Leftrightarrow donuts), dans les cellules exprimant le mutant D61del (Figure 7A). De façon intéressante, ces donuts sont généralement associés à une forme de stress cellulaire correspondant à une morphologie hyper-fissionnée. Cette forme mitochondriale particulière a notamment été rapportée dans des situations d'hypoxie-réoxygénation et de changements de pression osmotique (Long et al., 2015), ou de dysfonction au niveau de la chaîne de transport des électrons (Benard et al., 2007). Toutefois, ces résultats n'ont pu être reproduits malgré une large mise au point comprenant différentes confluences à l'ensemencement, différentes concentrations du marqueur mitochondrial (MitoTracker), deux modes de fixation (méthanol et paraformaldéhyde), ou encore, une visualisation en vidéo-microscopie sur cellules vivantes avec synchronisation des cellules en phase G2/M (double bloc thymidine). Des différences dans le niveau d'expression du mutant, ou un stress cellulaire particulier, associés à une méthode de fixation pouvant fragmenter le réseau mitochondrial (e.g. méthanol), pourraient expliquer cette perte du phénotype en donuts (Figure 7B).

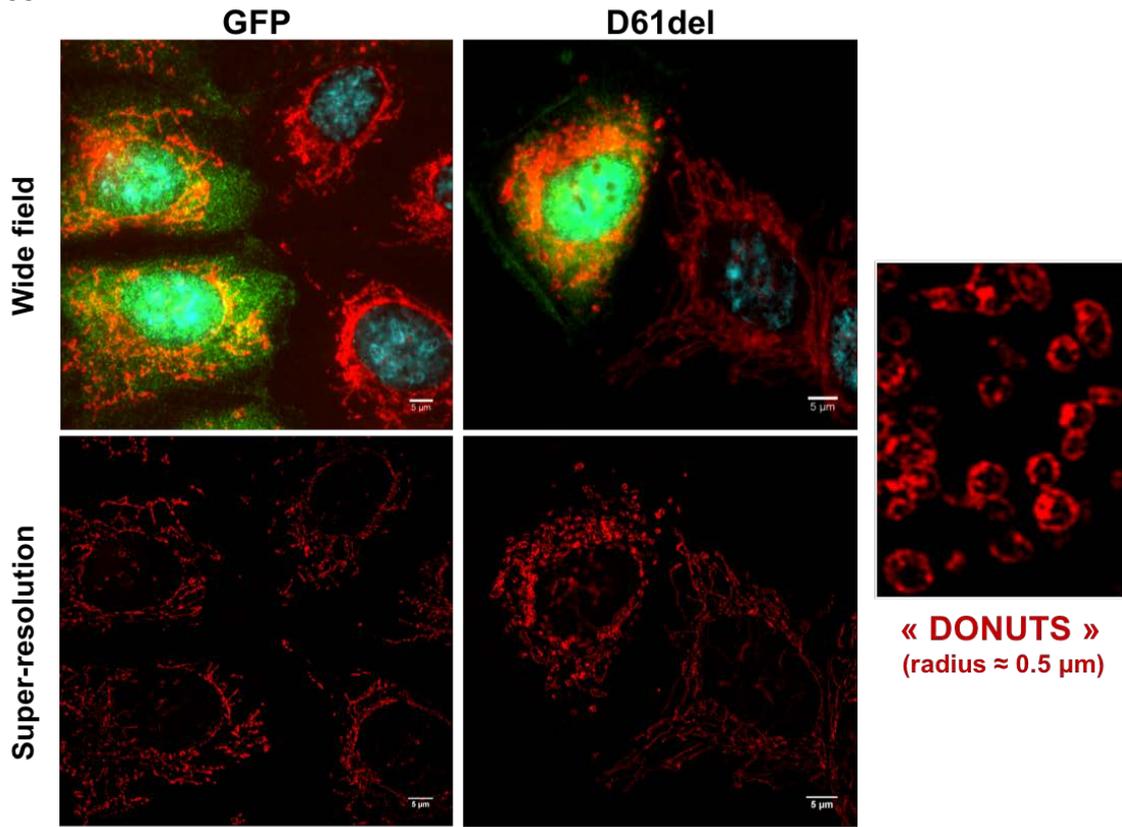
En définitive, l'observation du réseau mitochondrial dans des conditions de fixation douce (paraformaldéhyde) ne montre pas de différence de structure entre les cellules GFP et D61del (Figure 7C). Nous avons malgré tout complété cette analyse en étudiant les niveaux de phosphorylation de la protéine de fission DRP1 et les niveaux d'expression de la protéine de fusion Mitofusine 2. Comme le montre la figure 7D, dans des cellules exprimant le mutant SN de SHP2, on observe une augmentation significative de la phosphorylation de DRP1, et une diminution de l'expression de MFN-2 (Figure 7D). Ces résultats nous permettent de suggérer que le mutant SN de SHP2 modifie la balance fusion/fission au profit de la fission. La fragmentation mitochondriale résultante pourrait expliquer la diminution de la respiration mitochondriale dans ces cellules.

Cette diminution de la fonction mitochondriale pourrait ainsi signer un profil métabolique glycolytique. Malgré tout, nos analyses actuelles ne permettent pas de confirmer ce phénotype avec un taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) élevé par exemple. En ce sens, nous avons donc voulu compléter nos résultats et nous avons observé une augmentation de l'expression génique de marqueurs hypoxiques tels que *HIF1 α* ou *VEGFR* (Figure supplémentaire 3). Aussi, une mesure sur du milieu de culture de ces MEFs montre une augmentation de la concentration extracellulaire de lactate (Figure supplémentaire 4). Ces résultats complémentaires appuient donc une dysfonction métabolique en faveur d'une activité glycolytique accrue.

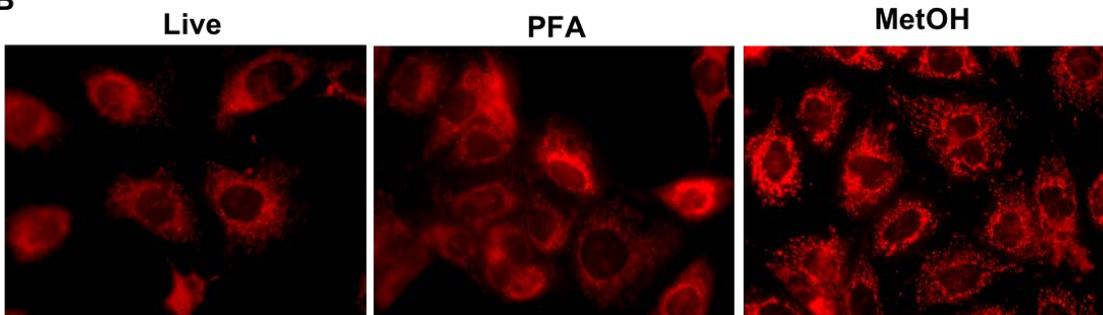
En définitive, ces résultats amènent de multiples questionnements quant à l'impact de la mutation SN de SHP2 sur le métabolisme mitochondrial, ses effets semblant dépendre du type cellulaire. Compte tenu des observations précédentes et *in vivo*, il serait judicieux de reproduire ces manipulations *in vitro* dans un modèle cellulaire adipeux.

MitoTracker/GFP

A



B



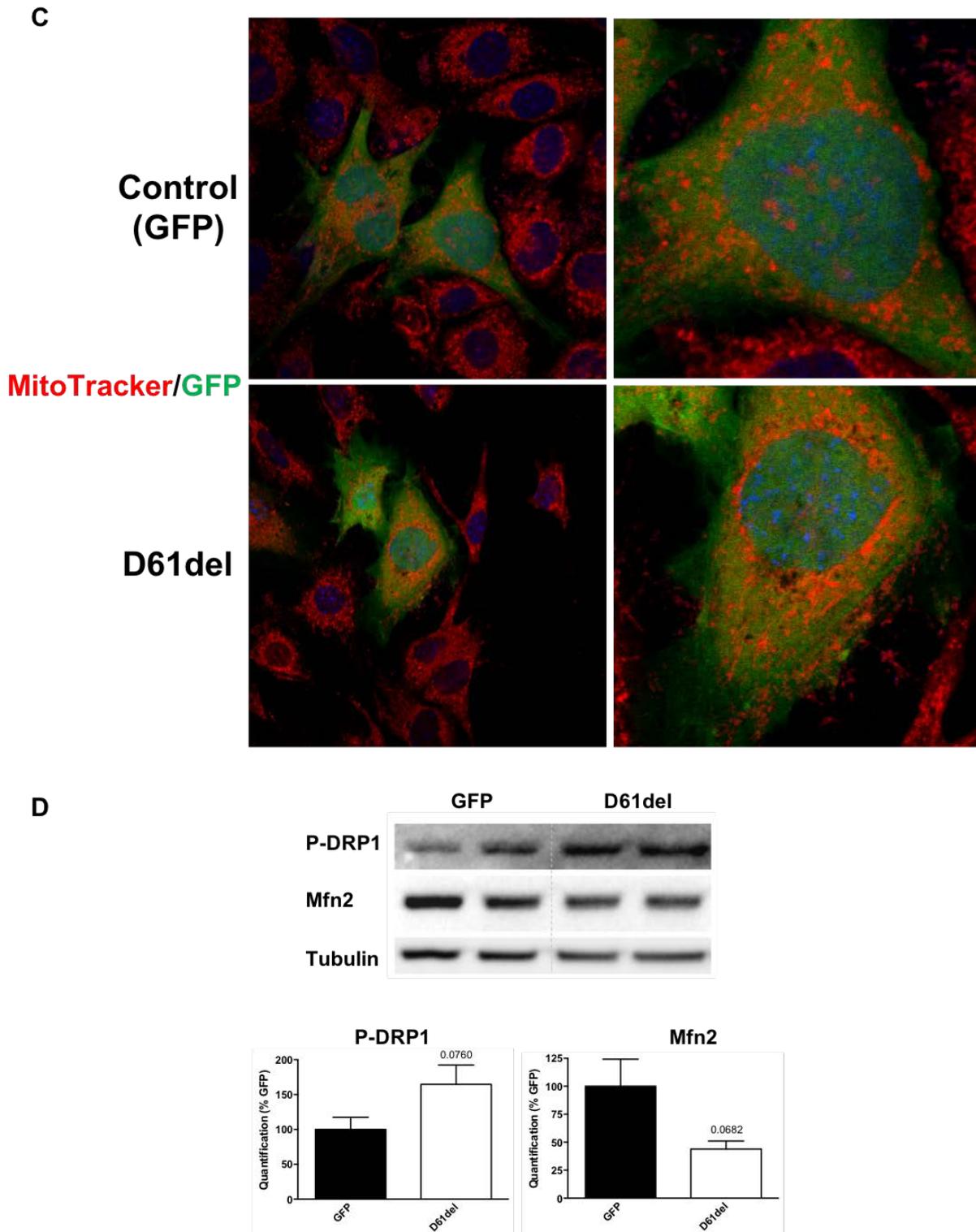


Figure 7 : L'expression d'une mutation SN de SHP2 semble affecter la balance fusion/fission mitochondriale

(A, C) Des photographies de cellules MEFs transduites et marquées au MitoTracker®Red CMXRos ont été prises selon une technique super-résolutive confocale et la reconstruction a été réalisée à l'aide du logiciel imageJ. (B) Des images comparatives de ces cellules ont été prises selon un état non fixé, fixé en paraformaldéhyde ou fixé au méthanol. (D) Les cellules MEFs transduites avec des adénovecteurs GFP ou SHP2-D61del ont été récupérées pour une préparation de lysats protéiques et analysées par immunoempreinte avec les marqueurs P-DRP1, Mfn2, et Tubuline puis quantifiés. Test statistique : test de Student : non significatif : $p > 0.05$.

Conclusion : discussion des résultats expérimentaux

Nos résultats démontrent que les souris SN ont une dépense énergétique plus élevée que celle des souris WT, phénotype qui semble s'accroître avec l'âge des souris. Nous avons choisi d'analyser la dépense énergétique en la normalisant au poids métabolique des animaux. Cette normalisation est largement controversée dans la littérature, ayant faussé nombre d'analyses, notamment du fait de la contribution différente des tissus maigres et gras lors de comparatifs d'individus minces vs obèses (Butler et Kozak, 2010). Toutefois dans le cas présent, le déficit en poids des animaux SN est lié à un retard de croissance, associant retard de taille et de poids, et réduction concomitante des tissus maigres et gras, bien que la proportion de masses grasse et maigre soit significativement modifiée. C'est pourquoi il nous a semblé pertinent de considérer le paramètre normalisé dans cette étude. A noter que dans une étude clinique sur des patients atteints du SC, Leoni *et al.* retrouvent une dépense énergétique diminuée chez les patients, mais qui devient significativement supérieure lorsque normalisée au poids ou à la surface corporelle, et associée à une augmentation de la prise alimentaire (Leoni et al., 2016). Il serait donc intéressant d'évaluer si ce phénotype est retrouvé chez des patients atteints de SN, notamment ceux portant une mutation de *PTPN11*. Dans ce sens, de façon cohérente, les résultats du laboratoire montrent une adiposité sensiblement diminuée chez les patients SN-*PTPN11*, bien que nous n'ayons pas eu l'opportunité de mesurer la dépense énergétique chez ces patients.

A l'échelle des tissus métaboliquement actifs, nos résultats révèlent une augmentation de la densité, de la biogenèse et de l'activité mitochondriales, spécifiquement dans le tissu adipeux blanc SC, et dans une moindre mesure le tissu adipeux PG, alors que dans les autres tissus testés (tissus maigres tels que le foie et le muscle squelettique), il existe un effet miroir de ces paramètres qui restent normaux, voire sensiblement diminués. Le tissu adipeux blanc ayant une composition cellulaire complexe, il serait intéressant de caractériser le statut énergétique des différentes cellules le composant, notamment les adipocytes matures, les pré-adipocytes mais aussi les cellules inflammatoires. En effet, les résultats de l'équipe montrent une infiltration de macrophages pro-inflammatoires, connus pour avoir une forte

activité métabolique, dans différents tissus métaboliques dont le tissu adipeux SC (*Paccoud et al., en révision, annexe 2*).

Nos résultats révèlent également que le tissu adipeux SC présente des caractéristiques de beigisation avec notamment une expression accrue de la protéine découplante thermogénique UCP1, potentiellement responsable de l'augmentation de la respiration mitochondriale dans ce tissu. Ce processus semble gouverné par des mécanismes intrinsèques : en effet, nous n'avons pas mesuré de différence de concentration plasmatique de plusieurs facteurs circulants connus pour promouvoir la beigisation. Toutefois, une multitude d'autres facteurs extérieurs au tissu adipeux sont capables d'induire ce phénotype (peptides natriurétiques, irisine, BMP8b, hormone thyroïdienne, espèces réactives de l'oxygène), dont la contribution éventuelle reste à explorer. De plus, plusieurs arguments sont en faveur d'une sensibilité accrue du tissu adipeux aux catécholamines, inducteurs connus de la beigisation : d'une part, nous mesurons une hypersensibilité à l'isoprénaline dans des tests de lipolyse sur adipocytes isolés. D'autre part, lors des expériences de calorimétrie indirecte, nous avons observé que le quotient respiratoire s'effondrait chez les animaux SN durant les premières heures d'acclimatation, laissant présager d'une potentialisation de la lipolyse induite lors du stress. Cette hypersensibilité aux catécholamines pourrait donc expliquer l'orientation beige du tissu adipeux. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en traitant les animaux par des β -bloquants pour évaluer si cela réverse la beigisation du tissu adipeux SC dans des souris SN. En termes de processus intrinsèques, nos travaux montrent également une légère altération de la différenciation blanche de la FSV du tissu adipeux SC SN, avec une augmentation d'expression du marqueur pré-adipocytaire beige *Prdm16* qui signerait une préférence de différenciation beige. Aussi, l'expression d'un mutant SN dans la lignée pré-adipocytaire hMADS suffit à promouvoir la trans-différenciation beige de ces cellules, attestant d'un mécanisme cellule autonome, qui reste à explorer. Il serait intéressant de confirmer ces observations in vivo, afin d'évaluer si l'expression d'un mutant SN de SHP2 dans le tissu adipeux (Adiponectine-Cre/SHP2 SN) suffit à induire sa beigisation. Alternativement, il serait possible de greffer du tissu adipeux SC de souris SN dans des souris WT, pour déterminer s'il conserve ses propriétés beiges.

Par ailleurs, la beigisation paraît être dépendante de l'hyperactivation de la voie RAS-MAPK, dans la mesure où l'augmentation de biogenèse mitochondriale et la surexpression d'UCP1 dans le tissu adipeux SC des SN sont réversées par un traitement chronique des animaux SN avec un inhibiteur de MEK. Il serait judicieux de compléter ces observations avec des mesures d'activité et des analyses histologiques. De façon intéressante, les MAPK ERK1/2 jouent un rôle majeur dans le contrôle de la différenciation adipocytaire blanche et brune, de même que différents processus de trans-différenciation, laissant supposer qu'elles peuvent également influencer l'orientation de ces cellules vers un phénotype beige ((Bost et al., 2005) ; (Kim et al., 2015)). Par conséquent, il sera également intéressant d'évaluer in vitro si l'inhibition de MEK réduit le processus de trans-différenciation beige dans des hMADS ou bien dans une lignée adipocytaire murine comme dans des 3T3-F442A. Il est intéressant de noter que la voie RAS-MAPK peut réguler la signalisation en aval des récepteurs adrénergiques, en les phosphorylant (Hong et al., 2018). Malgré cela, nous ne pouvons pas exclure l'éventuelle implication des acteurs P38-PPAR γ dans le processus de différenciation adipocytaire des SN. Il a en effet été montré que SHP2 inhibait P38 pour permettre la différenciation adipocytaire blanche via PPAR γ (He et al., 2013).

L'identification d'un processus de beigisation du tissu adipeux SC en lien avec une augmentation de la dépense énergétique pose également la question de la contribution de cette beigisation à la dépense énergétique totale des animaux. Nos résultats, bien que préliminaires, montrent effectivement que les animaux SN semblent présenter une résistance au froid, et que l'augmentation de la dépense énergétique des animaux SN n'est plus observée lorsque les animaux sont placés à thermoneutralité. Aussi, dans divers modèles pré-cliniques, l'induction d'un phénotype brun/beige s'accompagne d'une augmentation de la dépense énergétique ((Whittle et al., 2012) ; (Yan et al., 2016)). Pour tester cette hypothèse et comme évoqué précédemment, il serait nécessaire d'évaluer si l'expression de mutants SN de SHP2 restreinte au tissu adipeux s'accompagne d'une beigisation de ce tissu et suffit à augmenter la dépense énergétique des animaux. Comme évoqué précédemment, il serait possible de réaliser des greffes de tissu adipeux SC de souris SN dans des souris WT afin d'en mesurer la maintenance beige et, dans l'affirmative, l'impact sur la dépense énergétique.

Toutefois, considérant les rôles multiples de SHP2 dans les différents tissus métaboliques, illustrés notamment par le phénotype métabolique des modèles d'expression

ou de délétion de SHP2 tissu-spécifiques, il est probable que l'augmentation de la dépense énergétique des animaux SN soit la résultante de l'effet dans différents tissus et organes. Ainsi, l'inactivation de SHP2 dans le foie, mais aussi l'expression d'un mutant SN dans le cerveau, sont toutes deux associées à une augmentation de la dépense énergétique des animaux, attestant de rôles opposés de SHP2 dans la régulation du métabolisme énergétique selon le tissu considéré, probablement en lien avec des mécanismes moléculaires différents ((Nagata et al., 2012) ; (He et al., 2012)). A l'appui d'une contribution d'autres tissus, dans les protocoles de réversion phénotypique, l'observation d'une diminution des marqueurs de beigisation du tissu adipeux SC sans diminution de la dépense énergétique est un argument en défaveur d'un lien direct entre ces deux processus. Bien qu'il soit possible que la durée du traitement n'ait pas permis une modification perceptible de la dépense énergétique, ou ait induit d'autres effets contrebalançant la moindre beigisation (e.g. augmentation de l'activité spontanée), d'autres mécanismes entrent certainement en jeu comme des régulations hormonales. Un candidat tout à fait prometteur serait notamment la leptine, dont les taux sont effondrés chez les patients et les souris SN (cf. annexe 2), et dont la signalisation est fortement dépendante du couple SHP2/RAS-MAPK (cf. Discussion générale).

Enfin, de façon contradictoire avec les résultats obtenus sur le tissu adipeux SC, ces travaux révèlent que, dans des cellules de type fibroblastique, l'expression d'un mutant SN de SHP2 induit une diminution de la biogenèse et de l'activité mitochondriale et semble influencer la balance fusion/fission en faveur de la fission. Il faudrait toutefois confirmer la fragmentation par microscopie, malgré une mise au point actuelle difficile sur les MEFs. Au-delà des MEFs et au plus près d'un modèle physiologique, nous pourrions établir une culture primaire de myocytes, d'hépatocytes, ou bien de fibroblastes de patients SN disponibles, afin d'observer ce réseau mitochondrial en microscopie. Il serait aussi nécessaire de voir si cette augmentation de fission est dépendante de l'hyperactivation des MAPK ERK1/2, dans la mesure où il a été proposé que les kinases ERK pouvaient phosphoryler DRP1, et ainsi promouvoir la fission mitochondriale ((Kashatus et al., 2015) ; (Prieto et al., 2016)). Alternativement, ayant été décrit que SHP2 pouvait être actif au sein même de la mitochondrie ((Arachiche et al., 2008) ; (Guo et al., 2017) ; (Salvi et al., 2004)), il est possible que le mutant SN de SHP2 affecte directement la fonction mitochondriale. Les effets observés dans les MEFs pourraient aussi refléter un stress cellulaire, associé notamment à une élévation

des espèces réactives de l'oxygène, puisque nous relevons une augmentation de l'expression génique de marqueurs pro-hypoxiques (HIF1 α , VEGFR) ainsi qu'une élévation de la concentration en lactate extracellulaire (à confirmer), qui nous permet de suggérer que le métabolisme des cellules portant la mutation SN se tourne vers un métabolisme glycolytique.

Bien que contradictoire avec les résultats obtenus dans le tissu adipeux SC, ces données confirment des résultats publiés (Lee et al., 2010) et rappellent le profil observé dans des tissus maigres comme le foie et le muscle, laissant supposer un impact différentiel selon le type cellulaire ou son environnement. Cette disparité mitochondriale avec le tissu adipeux SC pourrait s'expliquer par l'implication d'une autre voie de signalisation que la voie RAS-MAPK selon les tissus, mais aussi, par une gestion différentielle des substrats entre les différents tissus (cf. Discussion générale).

Ces travaux permettent ainsi de comprendre une partie des mécanismes métaboliques énergétiques associés au SN, et notamment de la contribution probable du tissu adipeux beige à l'augmentation de la dépense énergétique. Bien que la mécanistique cellulaire sous-jacente reste à compléter, la mutation SN D61del induit une modification de la différenciation adipocytaire mais touche aussi la fonction et la dynamique mitochondriale. Cette étude de thèse devient ainsi une ouverture pour de nouvelles perspectives quant à l'étude de mécanismes communs aux Rasopathies et aux maladies métaboliques fréquentes.

Figures supplémentaires

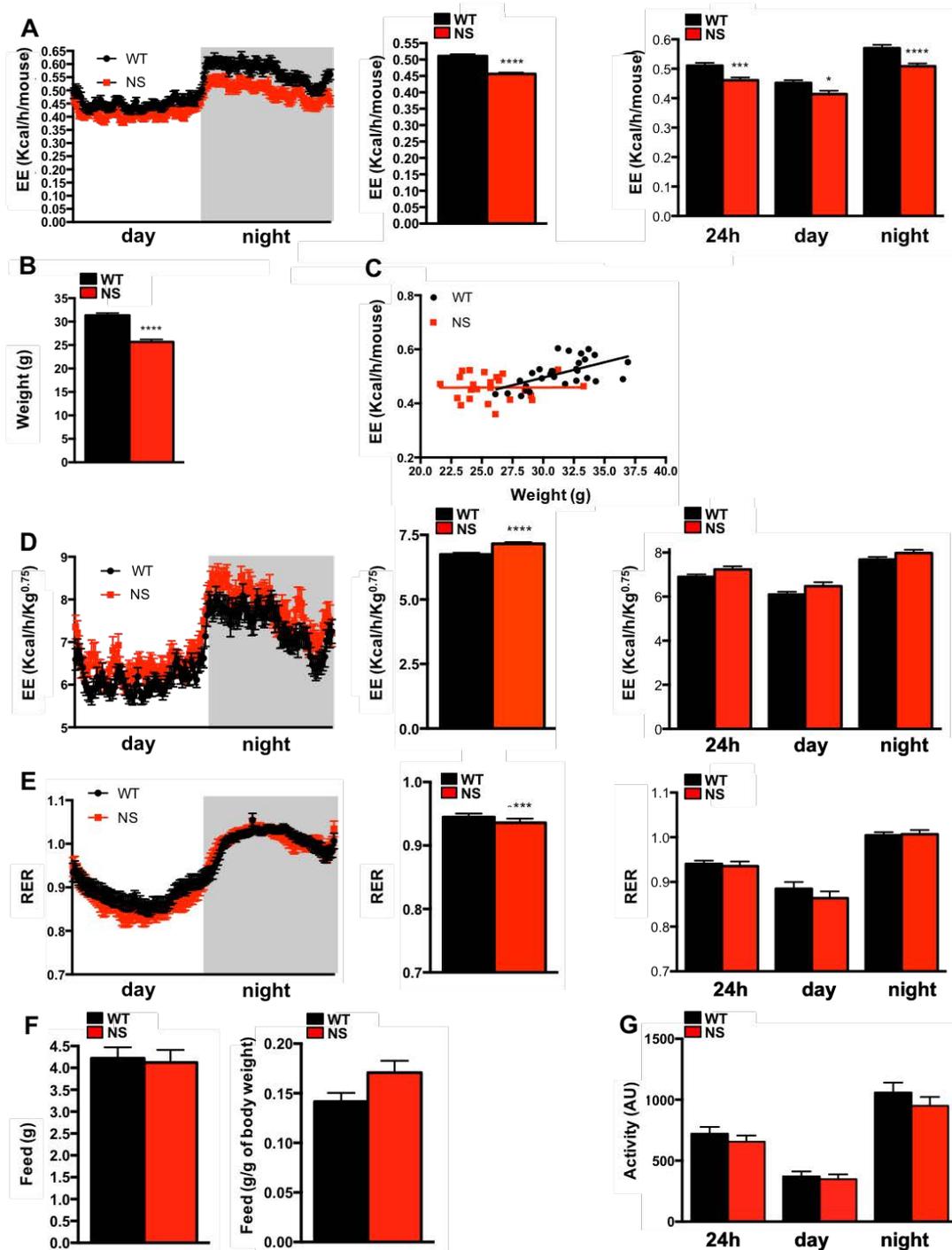


Figure Supplémentaire 1 : Les souris SN âgées de 10-15 semaines ont une augmentation de leur dépense énergétique normalisée, mais moins marquée que les souris plus âgées

(A) Des souris WT et SN âgées de 10 à 15 semaines ($26 < n < 32$) ont été maintenues en régime standard et la dépense énergétique a été analysée par calorimétrie indirecte durant 24h (PhenoMaster). (B) Poids des souris WT et SN. (C) Corrélation entre la dépense énergétique et le poids (D) Les données de dépense énergétique ont été ré-analysées avec une normalisation par rapport au poids des souris. (E, F, G) Le quotient respiratoire, la prise alimentaire et l'activité locomotrice spontanée des souris ont aussi été calculés pendant l'expérience de calorimétrie indirecte. Tests statistiques : test de Student en série appariées pour les analyses de calorimétrie et de télémétrie, test de Student pour les analyses de poids, de composition corporelle et de prise alimentaire, t : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

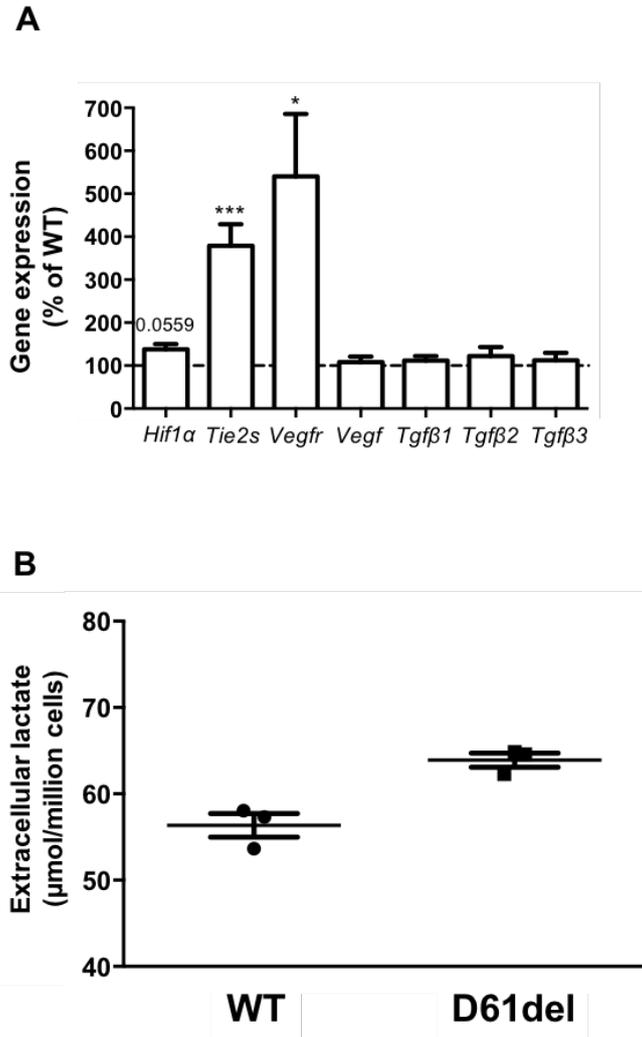


Figure Supplémentaire 2 : Augmentation de l'expression de gènes hypoxiques et tendance à l'augmentation du lactate extracellulaire des cellules MEFs SN SHP2-D61del

(A) Une extraction d'ARN et une qPCR ont été réalisées sur les cellules MEFs adénofectées (GFP ou SHP2-D61del) pour évaluer l'expression des gènes indiqués (n=5). Test statistique : * p < 0.05 ; *** p < 0.001. (B) Un dosage du lactate extracellulaire a été réalisé grâce à un lactatomètre sur le milieu des cellules MEFs adénofectées (GFP ou SHP2-D61del). Les concentrations ont été normalisées par rapport au nombre de cellules (n=1, triplicat).

Matériels et méthodes

Produits et réactifs : Les anticorps anti-Phospho-ERK1/2, anti-Phospho-DRP1 et anti-Mfn2 sont fournis par Cell Signaling Technology, l'anticorps anti-Tubuline par Sigma, les anticorps secondaires anti-immunoglobulines de souris et de lapin couplés à la peroxydase par Sigma. Les produits chimiques courants et les réactifs de biologie moléculaire et de biochimie sont fournis par Sigma, et les réactifs de culture cellulaire par Invitrogen et Sigma.

Modèle murin : Un modèle murin du SN, portant à l'état hétérozygote la mutation D61G de SHP2, a été obtenu par collaboration avec l'équipe de B. NEEL (Araki et al., 2004 ; De Rocca Serra et al., 2012). Les animaux sont maintenus sous fond génétique mixte B6x129Sv, par croisement d'un mâle SHP2^{D61G/+} avec une femelle F1 B6x129Sv et sont élevés dans une zootechnie SOPF avec un cycle jour/nuit de 12h /12h. Des animaux mâles SHP2^{D61G/+} et leurs frères SHP2^{+/+} issus de mêmes portées ont été comparés.

Phénotypage et tests in vivo :

- **Régimes alimentaires** : Les souris sont maintenues en régime standard (Normal Diet, ND) ou placées sous un régime riche en graisse (High Fat Diet, HFD 45%) à l'âge de 10 semaines.
- **Calorimétrie indirecte** : Les souris, préalablement individualisées pendant une période d'acclimatation à la cage métabolique, sont placées dans un cabinet de calorimétrie indirecte (PhenoMaster) pendant une durée minimale de 48h. A l'issue des 24 premières heures considérées comme de l'acclimatation à leur nouvel environnement, la dépense énergétique, le quotient respiratoire, la prise alimentaire et hydrique, et l'activité locomotrice spontanée ont été déterminés.
- **Composition corporelle** : La proportion de masses grasse et maigre des souris WT et SN a été mesurée grâce à un EchoMRI à des âges différents.
- **Télémetrie** : Des sondes ont été implantées par chirurgie dans l'abdomen des animaux (Sophie Le Gonidec, Service de Phénotypage, US006) et leur température interne a été mesurée par télémetrie.

- Résistance au froid : Les souris individualisées ont été placées dans une chambre froide (4°C) pendant 4h et la température rectale a été mesurée à différents temps (0h, 2h, 4h).
- Thermoneutralité : Les souris, préalablement individualisées dans les cages métaboliques, ont été placées à thermoneutralité (30°C) et leur température a été mesurée par télémétrie sur 24h.
- Traitement pharmacologique : Des souris WT et SN ont été réparties dans des groupes homogènes du point de vue du poids, de la composition corporelle et de la dépense énergétique. Les souris ont été injectées en position intra-péritonéale.
 - ⇒ PD0325901 (inhibiteur de MEK1 ; 1mg.kg⁻¹.jour⁻¹) ou véhicule (HPMC 0,5%, Tween80 0,2%) en contrôle tous les jours durant 4 semaines.
 - ⇒ Leptine (2mg.kg⁻¹.jour⁻¹) ou véhicule (PBS : phosphate buffer saline) en contrôle tous les jours durant 2 semaines.

Extraction d'ADN/d'ARN et qPCR : À partir de cellules récupérées dans du Qiazol ou à partir de tissu récolté lors de sacrifices de souris, les ARN totaux ont été extraits grâce au kit de purification « molecular biology » de Thermo Scientific et l'ADN total extrait à partir du kit « DNeasy® Blood and Tissue kit » de Qiagen, puis dosés au *Nanodrop*. Pour l'ARN, une quantité fixe est réverse transcrite en ADN complémentaire (ADNc) en présence de réverse transcriptase et d'hexamères dans un thermocycleur. Les séquences d'intérêt d'ADN et d'ADNc ont ensuite été amplifiées au *Vii7* en présence de MESABLUE (MasterMix Plus for SYBR® assay) et d'amorces adéquates (Eurogentec).

- Cycle de réverse transcription :
 1. Hybridation à 25°C pendant 10 minutes.
 2. Élongation à 37°C pendant 60 minutes.
 3. Inactivation de la réverse transcriptase à 85°C pendant 5 minutes.
 4. Pause à 10°C.
- Cycle de qPCR :
 1. Dénaturation de l'ADNc, activation de la polymérase et hybridation de l'amorce à 95°C.
 2. Polymérisation à 60°C.

AMORCES	SENS	ANTI-SENS
mβ2-μglobulin	CACTGACCGGCCTGTATGC	GGGTGGCGTGAGTATACTTGAATT
m36B4	AGTCGGAGGAATCAGATGACGAT	GGCTGACTTGTTGCTTTGG
mGAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
mPGC1α	AAAGGATGCGCTCTCGTTCA	GGAATATGGTGATCGGGAACA
mPGC1β	TTGAGGTGTTCCGGTGAGATTGTAG	GAAGGTGATAAAACCGTGCTTCTG
mTFAM	GCACCCTGCAGAGTGTTCAA	CGCCCAGGCCTCTACCTT
mNrf1	CAGACACGTTTGCTTCGGAAA	GTCCCACTCGCGTCGTGTA
mUCP1	CCTGCCTCTCTCGGAAACAA	TGTAGGCTGCCCAATGAACA
mUCP2	CCTCAAAGCAGCTCCAGAA	TCAATCGGCAAGACGAGACA
mUCP3	TGCTGGAGTCTCACCTGTTTACTG	ACAGAAGCCAGCTCCAAAGG
mPrdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
mElovl3	GGACCTGATGCAACCCTATGA	TCCGCGTTTCATGTAGGTCT
mAdiponectin	TGGAATGACAGGAGCTGAAGG	TATAAGCGGCTTCTCCAGGCT
maP2	TTCGATGAAATCACCGCAGA	GGTCGACTTTCATCCCACTT
mHSL	GACCATCAACCGACCAGGA	AGCAGCCTTTGTGTAGCGTG
mPref1	GCTGGGACGGGAAATTCTG	TCCAGGTCCACGCAAGTTC
mPPARα	TGGCAGCAATATCAGAGGTAGATTC	ATCATATCAAAGGAGCTGCCAAA
mPPARγ1/2	CCGAAGAACCATCCGATTGA	TTTGTGGATCCGGCAGTTAAG
mHIF1α	AATGCCAGATCACAGCACATTC	GCAATGCAATGGTGAAATGC
mVEGFR	ACTGCAGTGATTGCCATGTTCT	CCTTCATTGGCCCCGCTTA
mR adr.β3	GCCTCTCCGTCGTCTTCTGTG	TTCATAGCCATCAAACCTGTTGAG
hLRP10	GCTCTCCTACAGCCAAGATTGG	GCGCTGGACAGCAGATACAC
hUCP1	ACCCACAGAGGTCGTGAAAG	GAGGTTTGATTCCGTGGAGA
hElovl3	ACCAAGAGGCTGGGCTTAGT	AACCATGCAGGTAAGGCAAC
hTmem26	ATTCCCCAGCCTGTTCTTTT	TGATTCCGATGTTCCACAGA

Adénofection : Lorsque indiqué, les cellules sont mises en présence d'adénovecteur GFP, GFP-SHP2 WT ou GFP-SHP2 D61del à une concentration de 300 MOI dans du milieu sans serum et sans antibiotiques pendant 3h. A l'issue de l'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS puis replacées en milieu complet.

Culture cellulaire : Des cellules provenant de FSV de tissu adipeux sous-cutané, une lignée de MEFs ou de cellules hMADS sont cultivées à 37°C et 5% de CO₂ dans un milieu de culture complet adéquat (FSV : DMEM-F12 (Gibco) ; MEFs : DMEM « high glucose 4500mg/mL »), additionné de 10% de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine).

- **Lignée MEFs :** Une lignée cellulaire a été préalablement établie à partir de fibroblastes embryonnaires murins (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) et immortalisée. Ces MEFs sont transduites avec des adénovecteurs exprimant la GFP ou le mutant D61del de SHP2 ainsi que la GFP. 48h heures après la transduction, les cellules sontensemencées dans différents types de plaque selon l'expérimentation envisagée.
- **Lignée hMADS et trans-différenciation beige :** Les cellules sontensemencées à 35.000 cellules/mL dans des plaques 12 puits. Durant 7 jours et jusqu'à confluence, les cellules sont cultivées dans un milieu de prolifération (DMEM faible en glucose (1g/L), facteur de croissance FGF2 (2,5ng/mL), sérum de veau fœtal (10%), L-Glutamine (2mM), HEPES (5mM), Pénicilline (10000U/mL)/Streptomycine(10000µg/mL) (0,5%). A noter que 24h avant la différenciation, le FGF2 est retiré du milieu. La différenciation est alors induite pendant 10 jours par un milieu spécifique contenant du milieu de prolifération sans sérum / milieu Ham's F12 (50/50), de l'insuline (10nM), de la transferrine (10µg/mL), de la T3 (0,2nM), et de la rosiglitazone (0,1µM). Pendant les trois premiers jours seulement, le milieu est supplémenté en IBMX (100µM) et Dexaméthasone (1µM) qui activent les facteurs de transcription de la famille C/EBP, nécessaires aux premiers stades de différenciation. Au jour 10, la rosiglitazone est enlevée et les cellules sont transduites avec les adénovecteurs GFP, SHP2 WT ou SHP2 D61del (200MOI). Aux jours 14 et 16, de la rosiglitazone (0,1 µM) est ajoutée au milieu afin d'induire une trans-différenciation adipocytaire beige. Les cellules sont collectées aux jours 15, 16, 17 et 18 (*Protocole fourni par l'équipe du Pr D.Langin, équipe 4, INSERM-UMR1048-I2MC*).
- **Culture primaire de cellules de FSV et différenciation adipocytaire :** Des souris WT et SN (exprimant le mutant D61G de SHP2) sont sacrifiées, puis leur tissu adipeux sous-cutané est récupéré et digéré par la collagénase (*cf.méthode de la lipolyse*). La fraction stromale vasculaire (FSV) est séparée des adipocytes par centrifugation. Après lyse des hématies puis re-suspension de la FSV dans du milieu de culture, les cellules ont étéensemencées (150000 cellules/mL) dans du milieu complet supplémenté en fungizone

et gentamycine. Après trois jours de prolifération, la différenciation en adipocytes est induite par ajout d'un cocktail spécifique [Biotine (33 μ M)/Panthoténate (17 μ M), Transferrine (0.1 μ g/mL), Insuline (66nM), T3 (1nM)]. Enfin, ces cellules sont récupérées aux jours 0 et 7 (J0 et J7) de différenciation.

Préparation d'échantillons protéiques : Les cellules sont lysées dans du tampon de lyse *Whole cell extract* (20 mM HEPES ; 25% glycérol ; 15 mM NaF ; 0,4 M NaCl ; 1 mM EDTA ; 0,1% NP40) additionné d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Ensuite, un dosage au réactif de Bradford (BioRad Protein Assay) par spectrophotométrie à 595 nm est réalisé et les lysats sont préparés dans du *Laemmlli Sample Buffer* en ajustant les volumes pour normaliser les concentrations.

Immunoempreinte (Western blot) : Les lysats cellulaires sont déposés sur un gel SDS-PAGE pour séparer les protéines selon leur masse moléculaire. Les protéines du gel sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose. La qualité du transfert est vérifiée au rouge Ponceau et la membrane est saturée pendant 1h dans du TBS supplémenté en Tween 20 à 0,05% (TBST) - BSA 5%. Une incubation sur la nuit à 4°C est réalisée dans un anticorps primaire. Le lendemain, trois lavages au TBST sont effectués, la membrane est incubée dans une solution d'anticorps secondaires puis lavée trois fois. Les immunoempreintes sont ensuite révélées dans une solution de Clarity western ECL substrate (Biorad) grâce au dispositif *Chemidoc*.

Dosage ELISA des catécholamines plasmatiques et du FGF21 : Sur du sang frais issu de souris WT et SN, les plasmas sont isolés par centrifugation à 4°C et une extraction suivie d'un dosage de catécholamines plasmatiques (adrénaline et noradrénaline) est réalisé à l'aide du kit 2-CAT (A-N) Research ELISA (LDN). Les absorbances de ces paramètres sont lues à 450 nm grâce à un spectrophotomètre et le bruit de fond (lu à 620 nm) a été soustrait. Les concentrations sont enfin calculées à l'aide d'une courbe polynomiale permettant de transformer les valeurs d'absorbance en valeurs de concentration, à partir des mesures logarithmiques de la gamme pré-établie du kit. De la même façon, le FGF21 est dosé à l'aide d'un kit ELISA spécifique (EZRMFGF21-26K, Merck Millipore) selon les recommandations du fournisseur.

Oxygraphie :

- **(Seahorse®, Agilent)** : Les cellules MEFs transduites avec des adénovecteurs « contrôle-GFP » ou « SN-D61del » sontensemencées à 85000 cellules/mL dans une plaque 24 puits adéquate. Ainsi, la consommation d'oxygène cellulaire est mesurée grâce à un appareil d'oxygraphie (Seahorse®, Agilent) piloté par le logiciel *Wave*. Des inhibiteurs spécifiques de la chaîne de transport des électrons mitochondriale sont alors ajoutés successivement afin de déterminer la consommation d'oxygène à différentes étapes de la machinerie métabolique. Les cellules sont ensuite récupérées et lysées pour réaliser un dosage protéique et normaliser les valeurs de consommation d'oxygène obtenues.
- **Oroboros O2k, Bioblast** : La consommation d'O₂ par différents tissus a été mesurée grâce à l'utilisation d'un Oroboros oxygraphe après optimisation des quantités de tissus et des conditions de perméabilisation pour chaque tissu.
 - tissus adipeux sous-cutané et péri-gonadique : 20mg, saponine 12,5ng/mL
 - foie : 5mg, saponine 25ng/mL
 - BAT : 10 mg, saponine 25ng/mL
 - muscle squelettique : 10 mg, saponine 25ng/mL après dissection des fibres

Plusieurs composants sont ensuite ajoutés pour activer les différents complexes mitochondriaux (Complexe I : Glutamate + Malate ; Complexe II : Roténone + Succinate ; Complexe IV : antimycine A + ascorbate/TMPD). Du CCCP (25ng/mL) est ajouté pour déterminer la respiration maximale du tissu adipeux sous-cutané. Les résultats ont été normalisés par rapport aux poids des tissus.

Lipolyse : Le tissu adipeux sous-cutané et péri-gonadique des souris WT et SN est prélevé puis émincé et digéré pendant une trentaine de minutes à la collagénase (v/v Collagénase A, 1mg/mL 2%BSA, Roche® 10103586001) sous agitation à 37°C. Puis, le digestat est filtré (filtre 150µm) grâce à un tampon contenant des sels (KRBHA/BSA). La fraction flottante d'adipocytes et la FSV sont séparées et encore lavées. Un volume constant d'adipocytes est ensuite incubé pendant 1h30 sous agitation à 37°C selon une dilution au 1/10^{ème} dans du tampon (condition

non stimulée) ou stimulés avec de l'isoprotérénol (10^{-6}M , 10^{-7}M ou 10^{-8}M). La réaction est arrêtée sur glace. Le dosage du glycérol libéré est réalisé en présence du réactif « free glycerol reagent (Sigma F6428) » durant 20 minutes à température ambiante. Sa détection est ensuite réalisée à 540nm grâce à un spectrophotomètre et les valeurs sont normalisées par un dosage lipidique selon la méthode de Dole.

Immunohistochimie : Les tissus ont été fixés en 10% de formaline durant 24h puis incubés dans de l'éthanol 75% à 4°C. Des sections longitudinales (4 μm) (passant par le ganglion lymphatique) de tissu adipeux sous-cutané ont été incluses en paraffine et marquées à l'aide d'hématoxyline-éosine ou avec un anticorps primaire anti-UCP1 (Abcam) révélé grâce à une méthode de réaction chimique (SignalStain® Boost, HRP, Cell Signaling Technology). Les images ont été prises respectivement au Nanozoomer, Hamamatsu (section entière) ou bien avec un microscope Nikon Eclipse TE2000-U, x10.

Microscopie optique, à fluorescence et en super-résolution confocale :

- Des photographies des cellules MEFs transduites ont été prises au microscope *Nikon Eclipse TE2000-U* en lumière blanche et en fluorescence à un grossissement x20 grâce au logiciel *Lucia G*.
- Des photographies des cellules issues de la FSV ont été prises au microscope *Nikon Eclipse Ti* en lumière blanche à un grossissement x20 grâce au logiciel *NIS-Element AR*.
- Des photographies de cellules MEFs transduites et marquées au MitoTracker®Red CMXRos (Thermofisher) ont été prises avec le microscope *Zeiss Elyra PS.1* selon une technique de super-résolution confocale.

Traitement et analyses de données : Les données acquises ont été traitées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 5 ou 7* et exprimées en moyenne \pm SEM. La significativité a été déterminée grâce à un test t de Student avec une correction de Welch en cas d'inégalité des variances, et en séries appariées lorsque nécessaire. Pour certaines données, un test two-way ANOVA a été utilisé. Les analyses ANCOVA de la dépense énergétique ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS, en prenant le génotype en variable fixe et le poids ou la

composition corporelle en covariables. Les p-values inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives (non significatives (ns) $p > 0.05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Discussion générale : hypothèses et perspectives

Les travaux obtenus au cours de cette thèse ont permis de documenter un phénotype métabolique complexe associé au SN, associant une modification de la dépense énergétique, des altérations du tissu adipeux et des perturbations de la fonction mitochondriale différentes selon les tissus considérés. Ces données ouvrent de nombreuses perspectives quant aux mécanismes permettant d'expliquer ce phénotype, mais aussi aux conséquences qu'il peut avoir sur la physiopathologie du SN, et aux retombées éventuelles au-delà du contexte des maladies rares.

1. Le SN pourrait être associé à une gestion différentielle des substrats énergétiques

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse appuient l'hypothèse d'une gestion différentielle des substrats glucidiques et lipidiques qui pourraient expliquer les différences mitochondriales/métaboliques observées entre le tissu adipeux SC et les tissus/cellules « non adipeux » (muscle, foie, MEFs).

En effet, l'augmentation du quotient respiratoire observée chez les animaux en régime normal traduit une utilisation préférentielle du glucose (Figure 1G). Nous remarquons de plus qu'il existe un décalage du quotient respiratoire des souris SN, qui semble précéder la période d'activité et d'alimentation des animaux (nuit). Cela pourrait s'expliquer par des perturbations du rythme circadien et de certaines productions hormonales associées chez les animaux SN. Il est alors par exemple intéressant de remarquer que l'hormone orexine est connue pour réguler l'homéostasie glucidique. En effet, les neurones orexines sont actifs en période d'activité et leur excitation induit une élévation de la production et de l'utilisation de glucose par les tissus périphériques (Tsuneki et al., 2012).

D'autre part et de façon surprenante, des analyses complémentaires de calorimétrie indirecte d'animaux WT et SN âgés d'environ 20 semaines et mis en régime gras (45%) montrent une moindre augmentation de la dépense énergétique des animaux SN, alors que leur activité spontanée est sensiblement augmentée, probablement du fait du fort écart de poids (environ 20 g). De façon notable, une analyse ANCOVA sur ces cohortes révèle que la dépense énergétique des animaux SN passe en dessous de celle des animaux WT (0,540 +/-

0,03 Kcal/h vs 0,505 +/- 0,02 Kcal/h). Ces résultats pourraient être évocateur d'une utilisation préférentielle des substrats glucidiques, au détriment des substrats lipidiques, bien que dans ces protocoles HFD, le quotient respiratoire ne diminue pas chez les souris SN (Figure A).

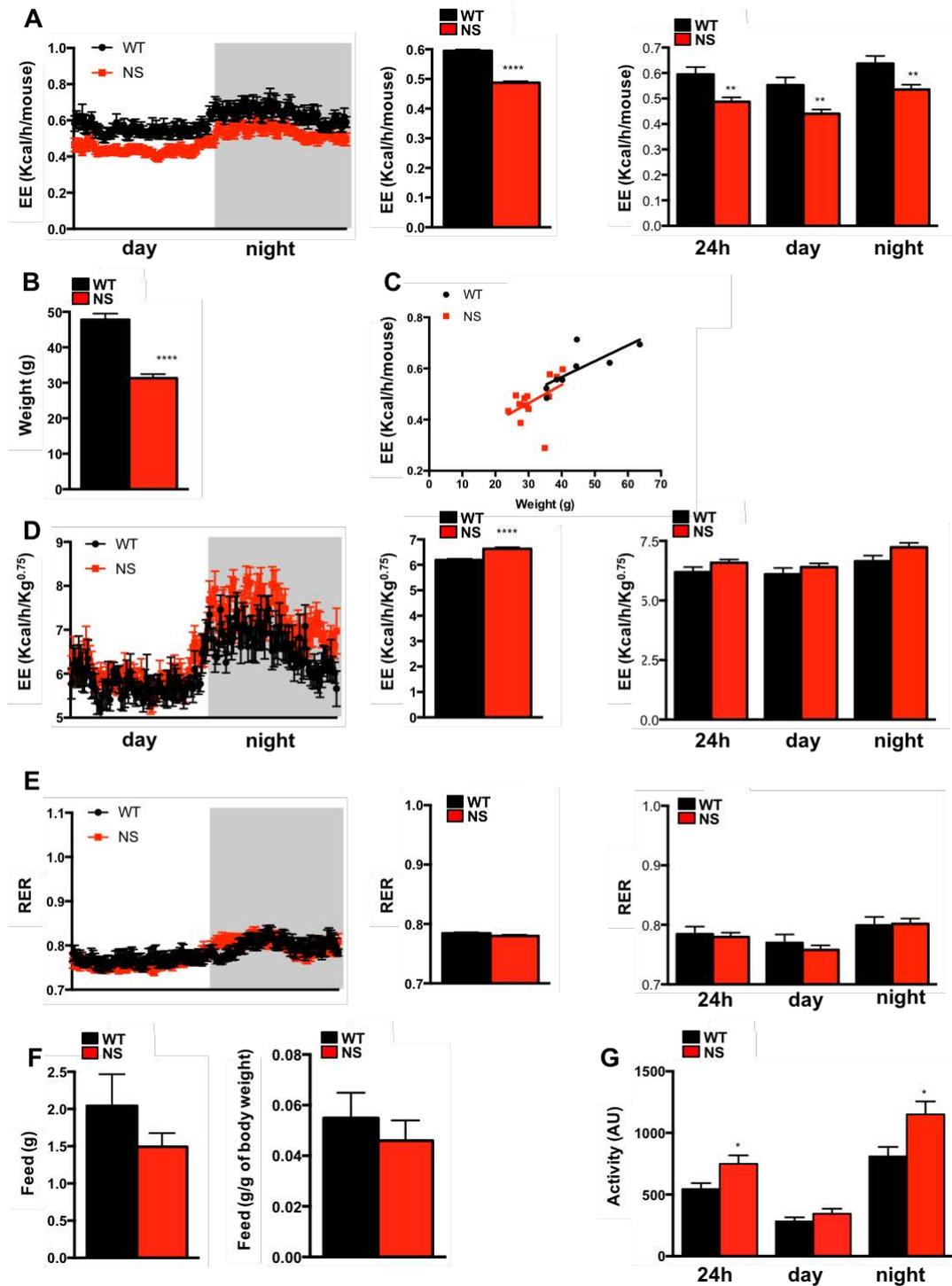


Figure A : Les souris SN maintenues en régime gras ne présentent pas d'augmentation plus forte de la dépense énergétique qu'en régime standard

(A) Des souris WT et SN âgées de 20 à 24 semaines ($8 < n < 14$) ont été maintenues en régime HFD 45% et la dépense énergétique a été analysée par calorimétrie indirecte durant 24h (PhenoMaster). (B) Poids des souris WT et SN. (C) Corrélation entre la dépense énergétique et le poids. (D) Les données de dépense énergétique ont été ré-analysées avec une normalisation par rapport au poids des souris. (E, F, G) Le quotient respiratoire, la prise alimentaire et l'activité locomotrice spontanée des souris ont aussi été calculés pendant l'expérience de calorimétrie indirecte. Tests statistiques : test de Student en série appariées pour les analyses de calorimétrie et de télémétrie, test de Student pour les analyses de poids, de composition corporelle et de prise alimentaire, t : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En ce sens, lorsque nous procédons à l'activation du complexe II mitochondrial grâce à l'utilisation de succinate (pour mimer l'utilisation de dérivés lipidiques, c'est-à-dire $FADH_2$) dans le foie d'animaux SN mis à jeun, la respiration mitochondriale semble diminuer par rapport à celle des WT (Figure B). Mis ensemble et bien que ces résultats doivent être confirmés, cela révèle un défaut des tissus SN à utiliser des substrats lipidiques.

Une étude récente utilisant des souris modèles du SC ($HRAS^{G12S/+}$) à jeun suggère d'ailleurs une altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras associée à une augmentation d'acides gras sanguins (Oba et al., 2018). De plus, une autre étude identifie des taux effondrés de carnitine et des défauts d'oxydation des lipides, dans une petite cohorte de patients SN (Mamedov et al., 2015).

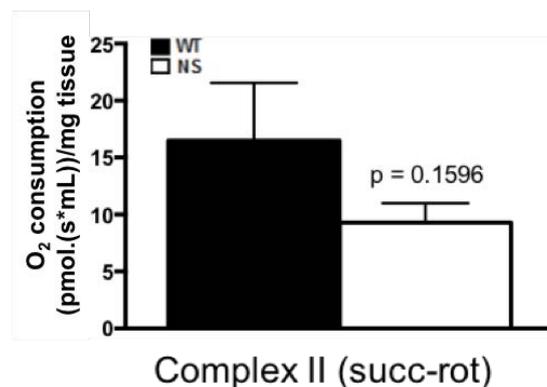


Figure B : Diminution de l'activité du complexe II mitochondrial dans le foie de souris SN à jeun

Dans le foie de souris WT et NS ($n=4$) âgées d'environ 20 semaines, la consommation d'O₂ a été mesurée grâce à un oxygraphe (Oroboros), à la suite d'une stimulation au succinate. Les résultats ont été normalisés par rapport au poids du morceau de tissu placé dans l'oxygraphe. Test statistique : test de Student : non significatif $p > 0.05$.

Néanmoins, une étude menée en parallèle au laboratoire ne révèle pas d'élévation des acides gras sanguins ni de dépôts ectopiques de lipides dans les souris SN (*Paccoud et al., en révision, annexe 2*). Cela pourrait éventuellement être expliqué par un cycle futile au niveau des dépôts adipeux, une excrétion augmentée ou une utilisation ciblée de ces lipides par certains types cellulaires, notamment par le tissu adipeux beige, mais aussi par des cellules inflammatoires, dont nous avons pu observer l'accumulation dans les tissus métaboliques des souris SN, et qui semblent porter une signature d'utilisation accrue de lipides (*Paccoud et al., en révision, annexe 2*). Bien que hautement spéculatif, cette utilisation ciblée, associée à un défaut d'utilisation dans d'autres tissus (foie, muscle), expliquerait que les animaux SN aient un profil lipidique et un quotient respiratoire semblables aux animaux WT en régime HFD.

Il serait intéressant de comparer les profils de calorimétrie d'animaux challengés de façon aigue par un bolus de glucose ou de lipides pour évaluer cette hypothèse. De plus, pour évaluer la gestion des substrats énergétiques chez les souris SN, nous proposons d'injecter des animaux avec des substrats radiomarqués (glucose-H3 et palmitate-C14) afin de tracer leur utilisation par les différents tissus en dosant la radioactivité incorporée dans chacun d'entre eux.

De façon intéressante, en terme de mécanistique, une étude récente démontre que l'absence de Neurofibromine, protéine dont l'inactivation est responsable de la NF1, un autre membre de la famille des Rasopathies, en induisant une hyperactivation des kinases ERK1/2, permet la phosphorylation et le recrutement de la protéine chaperonne TRAP1 et l'inhibition subséquente de la succinate déshydrogénase ; cette enzyme permet notamment la conversion de dérivés de lipides de la β -oxydation (FADH₂ en FAD) pour activer le complexe II mitochondrial (Masgras et al., 2017). En lien avec nos résultats préliminaires (Figure B), nous souhaitons déterminer si dans les tissus de souris SN, ou les cellules exprimant des mutants SN de SHP2, il existe une hyperphosphorylation de TRAP1, qui pourrait expliquer la mauvaise gestion des lipides par les mitochondries dans le contexte du SN.

2. Une hypersensibilité à la leptine, responsable de l'augmentation de la dépense énergétique des souris SN ?

Le métabolisme énergétique, et notamment la dépense énergétique, sont contrôlés au niveau central par l'action de la leptine, une hormone principalement sécrétée par le tissu adipeux et connue pour être satiétogène et augmenter la dépense énergétique. Nous avons initialement écarté l'hypothèse d'une contribution forte de la leptine, dans la mesure où les résultats du laboratoire montrent que sa concentration plasmatique est considérablement réduite chez les patients et les souris SN ce que nous avons relié à l'adiposité réduite des sujets SN et qui devrait être associé à un phénotype de prise alimentaire augmentée/dépense énergétique diminuée. Cependant, il est bien établi que SHP2 joue un rôle positif dans signalisation en aval du récepteur à la leptine, notamment en activant la voie RAS/MAPK. En effet, l'inactivation neuronale de SHP2 se traduit par une hyperphagie et une diminution de la dépense énergétique des animaux, tandis que l'expression d'un mutant hyperactif de SHP2 dans l'hypothalamus conduit à un phénotype maigre et une dépense énergétique augmentée ((He et al., 2012) ; (Zhang et al., 2004) ; (Do carmo et al., 2014)). Aussi, l'hypothèse d'une hypersensibilité à la leptine pourrait expliquer l'augmentation de dépense énergétique, la réduction d'adiposité et l'hypoleptinémie observée dans le contexte du SN. Quant à la prise alimentaire, bien qu'elle ne soit pas diminuée dans notre modèle murin, il est intéressant de noter que les patients SN présentent des difficultés d'alimentation dans les premières années de vie, justifiant une nutrition parentérale dans 30% des cas.

Appuyant l'hypothèse d'une sensibilité accrue à la leptine, une expérience pilote de traitement chronique durant deux semaines par de la leptine a montré que les souris SN semblaient être plus sensibles que les WT à la leptine avec une tendance à la hausse de leur dépense énergétique. On ne retrouve cependant pas de réduction significative de la prise alimentaire (Figure C).

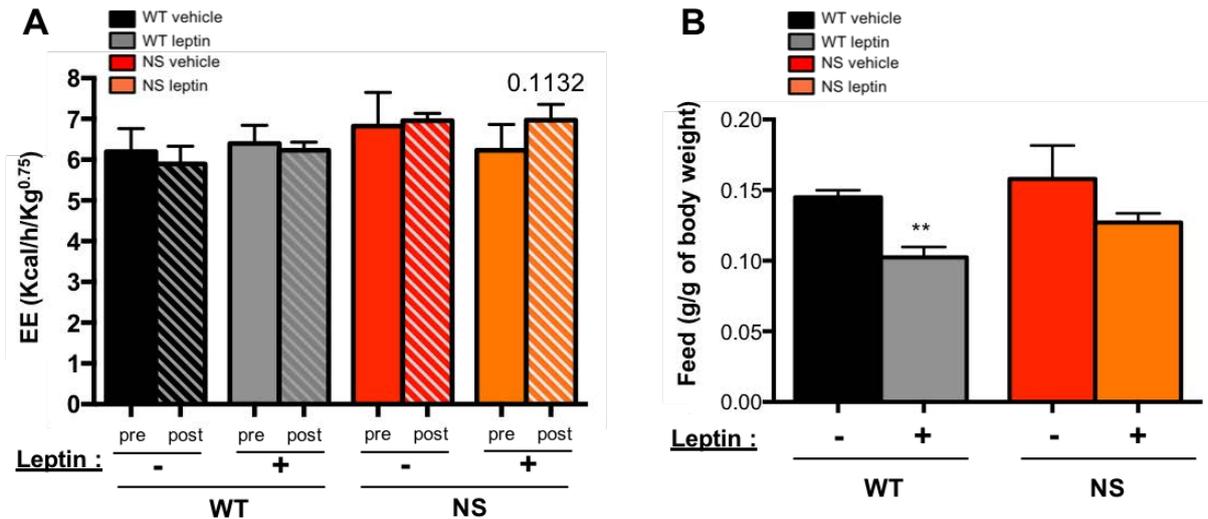


Figure C : La dépense énergétique des souris SN semble être plus sensible à un traitement à la leptine que les souris WT, sans modification significative de la prise alimentaire

Des souris WT et SN âgées de 16 semaines (n=8 pour chaque génotype, répartis en 2 groupes homogènes) ont reçu un traitement quotidien de leptine (2mg/Kg/jour) pendant 2 semaines par injection intrapéritonéale, ou de PBS (contrôle). (A) Grâce à une technique de calorimétrie indirecte, la dépense énergétique des animaux a été mesurée et normalisée par rapport au poids des animaux. Les moyennes individuelles ont été comparées. (B) La prise alimentaire a été déterminée et normalisée par rapport au poids des animaux. Test statistique : test de Student : ** p < 0.01.

De manière remarquable, cette hypothèse est également soutenue par les observations cliniques d'un patient SN atypique, récemment diagnostiqué. Ce patient présente un tableau clinique de SN (cardiopathie, retard de croissance, dysmorphie, JMML), mais de façon étonnante un phénotype obèse et une hyperleptinémie. L'analyse génétique confirme une mutation de *PTPN11* type SN mais aussi une mutation du récepteur de la leptine (Db) qu'une complémentation en leptine ne peut corriger (communication personnelle, Dr. T. Edouard, Hôpital des enfants, Toulouse). Cette association génétique révèle donc que le phénotype maigre et l'hypoleptinémie associés à l'hyperactivation de SHP2 dans le contexte du SN sont consécutifs à une hypersensibilité à la leptine, qui est neutralisée par la mutation Db (Figure D). Il serait intéressant pour confirmer cette hypothèse de croiser des animaux SN avec des animaux Db et d'en analyser le phénotype métabolique (adiposité, énergétique...), et d'étudier la signalisation en aval du récepteur de la leptine dans l'hypothalamus de souris SN.

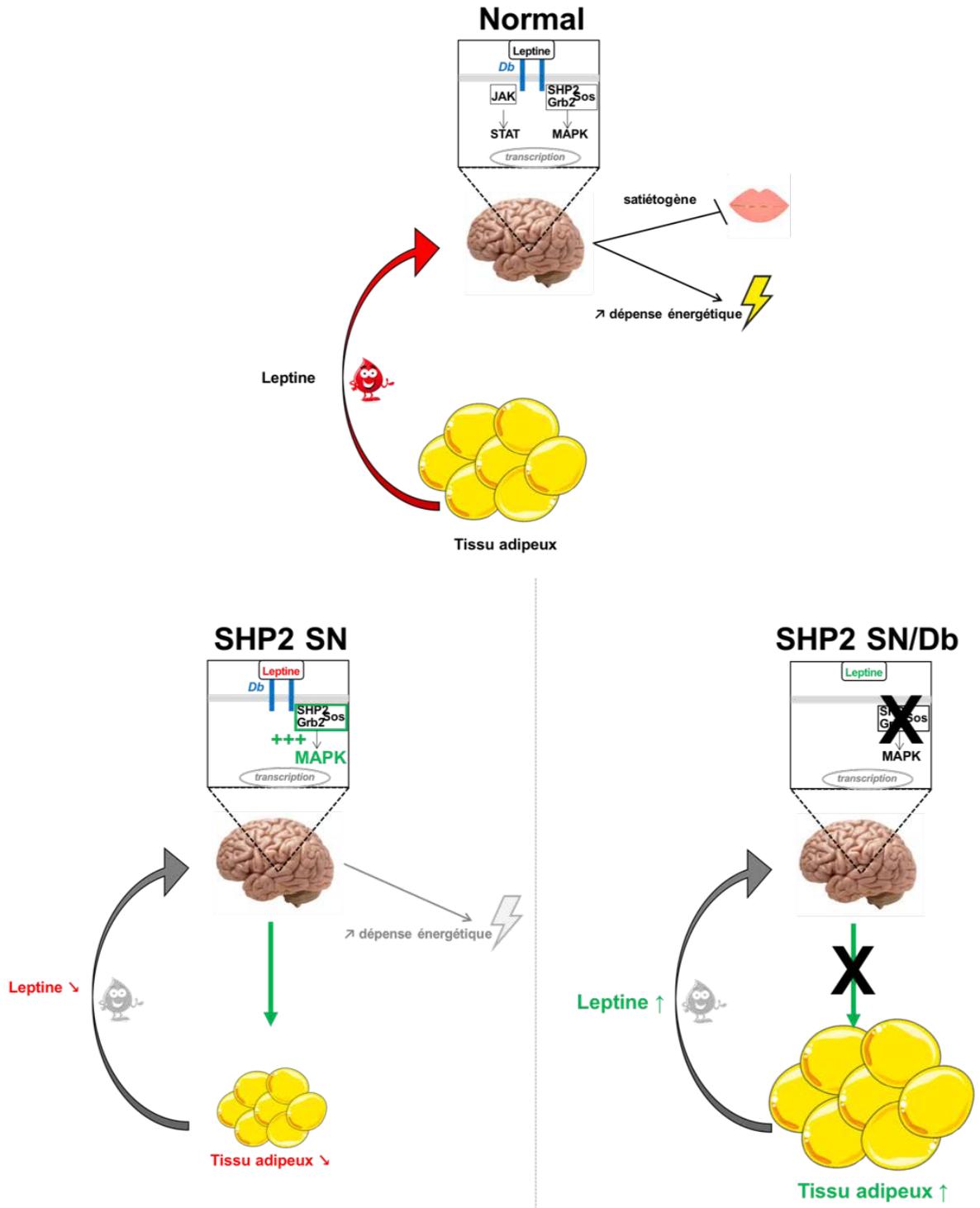


Figure D : Schéma explicatif de l'action de la leptine en conditions normales, SN et SN/Db

3. Conséquences physiopathologiques des modifications du tissu adipeux et du métabolisme énergétique dans les Rasopathies

L'identification d'une dépense énergétique augmentée, d'un défaut d'adiposité, cause ou conséquence d'une hypoleptinémie, et d'un phénomène de beigisation pose également la question du lien possible entre ces altérations et certains traits cliniques de ces maladies.

a. Beigisation et amélioration du métabolisme glucidique et insulinique ?

La beigisation a été associée à une amélioration de la gluco-tolérance mais aussi de l'insulino-résistance (Chondronikola et al., 2014). Il serait alors logique de penser que le phénomène de beigisation qui apparaît dès l'âge de 20 semaines chez les souris SN pourrait être associé à une amélioration du métabolisme glucidique, ce qui est d'ailleurs suggéré par l'augmentation du quotient respiratoire. Or, l'analyse approfondie du métabolisme glucidique chez nos souris SN, de même que chez des patients SN-PTPN11, révèle une gluco-intolérance et une résistance à l'insuline (*Paccoud et al., en révision, annexe 2*). Ce phénotype est lié à une inflammation des tissus métaboliques et apparaît peu dépendant de la voie RAS-MAPK. Toutefois, il semble s'atténuer avec l'âge des animaux, et est notamment moins marqué lorsque le phénotype de beigisation se développe. Il est donc possible d'envisager que la beigisation observée dans ce modèle murin vienne contrecarrer l'insulino-résistance induite par les mutants hyperactifs de SHP2. A l'appui de cette hypothèse, un modèle de SN-LM, associé à des mutations hypoactivatrices de SHP2, présente une meilleure tolérance au glucose. De façon intéressante, un profil de beigisation, lié à une hyperactivation de la voie RAS-MAPK, s'installe également chez ce modèle murin, de manière concomitante avec une exacerbation de leur tolérance au glucose. Alternativement, étant donnée la diminution de la fonction métabolique (ici, mitochondriale) dans les autres tissus métaboliquement actifs (muscle, foie), il serait également possible que l'insulino-résistance perdure dans le contexte du SN malgré l'apparition de la beigisation.

Enfin, outre l'effet de la beigisation du tissu adipeux, une réduction ou une modification des propriétés du tissu adipeux blanc peut altérer la sécrétion des adipokines. Etant intimement impliquées dans l'insulino-sensibilité pour certaines, il serait évident d'entrevoir un lien entre une altération du profil des adipokines et l'insulino-résistance dans le SN par exemple.

b. Re-distribution des flux énergétiques et retard de croissance?

Les anomalies métaboliques documentées au cours de ce travail de thèse pourraient être à rapprocher au retard staturo-pondéral associé au SN. La beigeisation pourrait ainsi être contributive à l'augmentation de la dépense énergétique du fait d'une activité mitochondriale accrue thermogénique dans le tissu adipeux d'une part, mais aussi, au faible IMC avec une atténuation du stockage lipidique dans les adipocytes beiges. De plus, une part importante de l'énergie puisée par l'organisme entier a lieu dans le tissu adipeux lors de la beigeisation, éventuellement au détriment d'autres tissus. Dans ce sens et de façon plus générale, il est bien admis qu'une augmentation du métabolisme de base a lieu au détriment de la croissance. Il serait alors par exemple intéressant d'imaginer que le retard de croissance des patients soit en partie dû à une délocalisation de l'apport énergétique vers le tissu adipeux beige. Par ailleurs, certains tissus/cellules semblant présenter une certaine « faiblesse » mitochondriale, il est possible d'envisager que les capacités trophiques de certains tissus (muscles, os) soient altérées.

c. Leptine, métabolisme énergétique et cardiomyopathie hypertrophique ?

Environ 30% des patients SN sont touchés par une cardiomyopathie hypertrophique (CMH). Or, des liens étroits entre un manque de leptine chez des souris ob/ob et une hypertrophie des cardiomyocytes a déjà été documentée (Barouch et al., 2003). Aussi, la réduction des taux de leptine sécrétée observée chez les souris et les patients SN pourrait participer à l'évolution des cardiopathies. Il faudrait dans ce cas considérer que le cardiomyocyte ne soit pas hypersensible à la leptine, et que SHP2 ne soit pas recruté au niveau de son récepteur par exemple. Il serait donc intéressant d'évaluer si un traitement chronique par de la leptine permet d'améliorer leur fonction cardiaque. Par ailleurs, une caractéristique métabolique de l'hypertrophie cardiomyocytaire est un shift métabolique vers le glucose. En effet, alors qu'en situation saine, le cœur utilise préférentiellement les lipides, la CMH est associée à un catabolisme glucidique élevé, avec une inhibition des cascades transcriptionnelles promouvant l'oxydation des acides gras et du métabolisme mitochondrial OXPHOS. Le cœur hypertrophique adopte alors un métabolisme glycolytique et augmente sa captation de glucose, profil qui semble être favorisé dans le contexte du SN (Kolwicz et Tian, 2011).

4. La dysfonction mitochondriale : au cœur d'altérations majeures retrouvées dans le SN ?

a. Les cardiopathies

A côté de la communication entre le tissu adipeux et le tissu cardiaque et du shift métabolique mentionnés ci-dessus, il serait à l'avenir intéressant d'évaluer la possibilité d'une dysfonction mitochondriale comme composante des cardiopathies associées au SN, dans la mesure où il est largement établi qu'une perte de l'homéostasie énergétique cardiaque est un facteur causal majeur de différentes pathologies cardiaques (Horowitz et al., 2010). Une ouverture d'étude serait de savoir si une anomalie de biogenèse mitochondriale (ADN mitochondrial, PGC1...) et/ou des dysfonctions mitochondriales (respiration, déséquilibre fusion/fission...) sont présentes dans les cardiomyocytes hypertrophiques de souris SN, et dans des iPSCs de patients reprogrammés en cardiomyocytes. Il serait également judicieux d'effectuer des recherches sur la possible accumulation de produits délétères pouvant participer à l'aggravation de la CMH (espèces réactives de l'oxygène, céramides) résultant d'une hyperactivité mitochondriale. Concernant les événements en amont qui pourraient promouvoir ces dysfonctions, une hyperactivation d'AMPK, retrouvée dans des formes familiales de CMH (Blair et al., 2001), pourrait être recherchée, de même qu'un effet cellulaire de l'hyperactivation de la voie Ras-MAPK.

b. La force musculaire

Les résultats de ces travaux de thèse montrent une tendance à la diminution de la fonction et de la densité mitochondriale dans le muscle squelettique (ici, gastrocnémien). Néanmoins, ce paramètre pourrait varier selon le type métabolique des différentes fibres musculaires (glycolytique / oxydatif).

Une réduction de la fonction mitochondriale dans les cellules musculaires squelettiques, générant un déficit énergétique, pourrait très certainement être causale d'une faiblesse musculaire. Un phénotype de faiblesse musculaire a d'ailleurs été rapporté chez des patients atteints de Rasopathies (Stevenson et al., 2012). Ce trait a aussi été confirmé sur notre modèle de souris SN. Des résultats préliminaires du laboratoire montrent effectivement

une réduction de la force musculaire de ces souris dans une expérience de « grip-test », associée à une réduction de la taille des fibres musculaires. De plus, des analyses d'expression génique révèlent une élévation de marqueurs de sénescence, qui pourraient potentiellement être associés à une haute proportion d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales. Le lien altération de la fonction mitochondriale–production d'espèces réactives de l'oxygène pourrait alors être étudié.

5. Perspectives thérapeutiques

Ces travaux de thèse permettent d'envisager, bien évidemment à très long terme, différentes stratégies thérapeutiques ciblant les anomalies énergétiques associées au SN, mais aussi, au-delà du SN, visant à mimer ces dysfonctions.

D'une part, dans le contexte du SN, il peut paraître important de réverser certaines anomalies métaboliques, soit pour leur effet délétère direct, soit pour leurs éventuelles conséquences indirectes. Par exemple, au vu de l'éventuelle hypersensibilité du tissu adipeux aux catécholamines (Figure 4B), l'utilisation de β -bloquants pourrait permettre de normaliser leur beigisation et ses éventuelles conséquences physiopathologiques. De manière remarquable, les β -bloquants sont des médicaments déjà utilisés en clinique dans le cadre du SN, notamment nécessaires pour traiter des cas de cardiopathies. Néanmoins, leur effet sur l'adiposité de ces patients n'a encore jamais été évalué. De plus, il pourrait être pertinent de tenter de normaliser le tonus leptinique, par des approches qui restent à développer. Enfin, bien qu'il soit encore trop tôt pour poser des préconisations, une adaptation du régime alimentaire en termes d'apports lipidiques/glucidiques pourrait présenter un intérêt.

De façon plus directe et permettant de cibler l'ensemble des altérations associées au SN, il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur de SHP2 ou bien de la voie Ras-MAPK afin de normaliser leur hyperactivité ainsi que les anomalies métaboliques associées. De façon intéressante, le SHP099 est un inhibiteur allostérique de SHP2 biodisponible oralement qui a déjà fait ses preuves sur l'inhibition de la croissance tumorale de cellules cancéreuses humaines in vitro et xénogreffes tumorales sur souris (Chen et al., 2016). Cependant, une étude récente révèle que certains mutants SN de SHP2 seraient hélas résistants à l'action de ce composé ((LaRoche et al., 2018) ; (Sun et al., 2018)). Concernant l'inhibition de la voie RAS-MAPK, des inhibiteurs spécifiques actuellement développés dans le domaine de

l'oncologie pourraient s'avérer efficace, bien que leurs effets secondaires nécessitent d'évaluer précisément la balance bénéfique/risque de tels traitements. Une approche alternative, visant à normaliser l'activation de la voie RAS/MAPK en réduisant l'isoprénnylation de RAS à l'aide de statines, mieux tolérées, est actuellement en phase de test dans le cadre d'un PHRC (coordinateur Dr. T. Edouard).

Nos résultats permettent d'ouvrir des perspectives au-delà du contexte des maladies rares. Ainsi, l'utilisation de l'inhibiteur de SHP2 pourrait s'avérer intéressant dans un contexte d'obésité/diabète, dans la mesure où des résultats du laboratoire montrent que l'inhibition pharmacologique de SHP2 améliore la sensibilité à l'insuline et réduit l'inflammation des tissus métaboliques chez des souris obèses-diabétiques (*Paccoud et al., en révision ; annexe 2*).

D'autre part et à l'inverse, dans un contexte d'obésité, il serait intéressant d'utiliser un activateur de SHP2 ou bien de la voie Ras-MAPK afin de promouvoir la beigeisation. Néanmoins, compte tenu de leurs rôles pleiotropiques, notamment de leur potentiel oncogénique, cette proposition ne pourrait se réaliser qu'après de très fines mises au point pour ajuster leur niveau d'activation et éviter de générer un processus tumoral. Aussi, afin de minimiser les effets secondaires liés à l'ubiquité de ces acteurs, nous pourrions imaginer utiliser cette stratégie thérapeutique en application locale (type crème ou injection locale), afin de ne cibler que le tissu adipeux.

Ces travaux de thèse ouvrent des perspectives nouvelles dans la compréhension de la physiopathologie du SN et des autres Rasopathies. De façon plus large, la compréhension du phénotype énergétique de ces maladies pourrait également permettre d'ouvrir des perspectives quant à la compréhension de maladies plus communes telles que l'obésité.

Références bibliographiques

- Aeby, A., Sznajder, Y., Cavé, H., Rebuffat, E., Van Coster, R., Rigal, O., & Van Bogaert, P. (2007). Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *30*(5), 827-827.
- Alfieri, P., Cesarini, L., Mallardi, M., Piccini, G., Caciolo, C., Leoni, C., ... Zampino, G. (2011). Long Term Memory Profile of Disorders Associated with Dysregulation of the RAS-MAPK Signaling Cascade. *Behavior Genetics*, *41*(3), 423-429.
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism - Clinical and Experimental*, *63*(7), 895-902.
- Arachiche, A., Augereau, O., Decossas, M., Pertuiset, C., Gontier, E., Letellier, T., & Dachary-Prigent, J. (2008). Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src Exclusively in Rat Brain Mitochondria and Functional Consequences. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(36), 24406-24411.
- Araki, T., Mohi, M. G., Ismat, F. A., Bronson, R. T., Williams, I. R., Kutok, J. L., ... Neel, B. G. (2004). Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of *Ptpn11* mutation. *Nature Medicine*, *10*(8), 849-857.
- Araki, T., Chan, G., Newbigging, S., Morikawa, L., Bronson, R. T., & Neel, B. G. (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*(12), 4736-4741.
- Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., & Myers, M. G. (2000). Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(19), 14563-14572.
- Banno, R., Zimmer, D., Jonghe, B. C. D., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., & Bence, K. K. (2010). PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(3), 720-734.
- Barouch, L. A. (2003). Disruption of Leptin Signaling Contributes to Cardiac Hypertrophy Independently of Body Weight in Mice. *Circulation*, *108*(6), 754-759.
- Barquissau, V., Beuzelin, D., Pisani, D. F., Beranger, G. E., Mairal, A., Montagner, A., ... Langin, D. (2016). White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic

- reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Molecular Metabolism*, 5(5), 352-365.
- Barquissau, Valentin, Léger, B., Beuzelin, D., Martins, F., Amri, E.-Z., Pisani, D. F., ... Langin, D. (2018). Caloric Restriction and Diet-Induced Weight Loss Do Not Induce Browning of Human Subcutaneous White Adipose Tissue in Women and Men with Obesity. *Cell Reports*, 22(4), 1079-1089.
- Barreau, C., Labit, E., Guissard, C., Rouquette, J., Boizeau, M.-L., Koumassi, S. G., ... Lorsignol, A. (2016). Regionalization of browning revealed by whole subcutaneous adipose tissue imaging. *Obesity*, 24(5), 1081-1089.
- Barsoum, M. J., Yuan, H., Gerencser, A. A., Liot, G., Kushnareva, Y., Gräber, S., ... Bossy-Wetzel, E. (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *The EMBO Journal*, 25(16), 3900-3911.
- Bartness, T. J., Liu, Y., Shrestha, Y. B., & Ryu, V. (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(4), 473-493.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., & Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of Cell Science*, 120(5), 838-848.
- Benard, G., Trian, T., Bellance, N., Berger, P., Lavie, J., Espil-Taris, C., ... Rossignol, R. (2013). Adaptive Capacity of Mitochondrial Biogenesis and of Mitochondrial Dynamics in Response to Pathogenic Respiratory Chain Dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(4), 350-365.
- Bergouignan, A., Antoun, E., Momken, I., Schoeller, D. A., Gauquelin-Koch, G., Simon, C., & Blanc, S. (2012). Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. *Journal of Applied Physiology*, 114(3), 371-379.
- Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D., & Graff, J. M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Development (Cambridge, England)*, 140(19), 3939-3949.
- Bertholet, A. M., & Kirichok, Y. (2017). UCP1: a transporter for H⁺ and fatty acid anions. *Biochimie*, 134, 28-34.
- Bertholet, A. M., Kazak, L., Chouchani, E. T., Bogaczyńska, M. G., Paranjpe, I., Wainwright, G. L., ... Kirichok, Y. (2017). Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals

- UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. *Cell Metabolism*, 25(4), 811-822.e4.
- Bertola, D. R., Chong, A. K., Sugayama, S. M. M., Albano, L. M. J., Wagenführ, J., Moysés, R. L., & Gonzalez, C. H. (2000). Cardiac findings in 31 patients with Noonan's syndrome. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 75(5), 409-412.
- Bettaieb, A., Matsuo, K., Matsuo, I., Nagata, N., Chahed, S., Liu, S., & Haj, F. G. (2011). Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism*, 60(8), 1193-1201.
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066-1077.
- Binder, G., Grathwol, S., von Loeper, K., Blumenstock, G., Kaulitz, R., Freiberg, C., ... Paul, T. (2012). Health and Quality of Life in Adults with Noonan Syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 161(3), 501-505.e1.
- Bjørnbæk, C., Buchholz, R. M., Davis, S. M., Bates, S. H., Pierroz, D. D., Gu, H., ... Flier, J. S. (2001). Divergent Roles of SHP-2 in ERK Activation by Leptin Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4747-4755.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., ... Watkins, H. (2001). Mutations in the γ 2 subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human Molecular Genetics*, 10(11), 1215-1220.
- Boivin, A., Brochu, G., Marceau, S., Marceau, P., Hould, F.-S., & Tchernof, A. (2007). Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men. *Metabolism*, 56(4), 533-540.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., ... Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 1022-1036.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., ... Binétruy, B. (2005). The Extracellular Signal-Regulated Kinase Isoform ERK1 Is Specifically Required for In Vitro and In Vivo Adipogenesis. *Diabetes*, 54(2), 402-411.

- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., ... Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature*, *481*(7382), 463-468.
- Brown, R. J., Araujo-Vilar, D., Cheung, P. T., Dunger, D., Garg, A., Jack, M., ... Yorifuji, T. (2016). The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(12), 4500-4511.
- Burl, R. B., Ramseyer, V. D., Rondini, E. A., Pique-Regi, R., Lee, Y.-H., & Granneman, J. G. (2018). Deconstructing Adipogenesis Induced by β 3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling. *Cell Metabolism*, *28*(2), 300-309.e4.
- Butler, A. A., & Kozak, L. P. (2010). A Recurring Problem With the Analysis of Energy Expenditure in Genetic Models Expressing Lean and Obese Phenotypes. *Diabetes*, *59*(2), 323-329.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277-359.
- Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., ... Collins, S. (2004). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(7), 3057-3067.
- Carling, D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *45*, 31-37.
- Carrière, A., Jeanson, Y., Berger-Müller, S., André, M., Chenouard, V., Arnaud, E., ... Casteilla, L. (2014). Browning of White Adipose Cells by Intermediate Metabolites: An Adaptive Mechanism to Alleviate Redox Pressure. *Diabetes*, *63*(10), 3253-3265.
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M. B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., ... Russell, A. P. (2005). Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *The Journal of Physiology*, *567*(1), 349-358.
- Cavé, H., Caye, A., Strullu, M., Aladjidi, N., Vignal, C., Ferster, A., ... Verloes, A. (2016). Acute lymphoblastic leukemia in the context of RASopathies. *European Journal of Medical Genetics*, *59*(3), 173-178.

- Cessans, C., Ehlinger, V., Arnaud, C., Yart, A., Capri, Y., Barat, P., ... Edouard, T. (2016). Growth patterns of patients with Noonan syndrome: correlation with age and genotype. *European Journal of Endocrinology*, *174*(5), 641-650.
- Chang, C.-R., & Blackstone, C. (2007). Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(30), 21583-21587.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, *160*(2), 189-200.
- Chen, Y.-N. P., LaMarche, M. J., Chan, H. M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M. G., ... Fortin, P. D. (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature*, *535*(7610), 148-152.
- Chondronikola, M., Volpi, E., Borsheim, E., Porter, C., Annamalai, P., Enerback, S., ... Sidossis, L. S. (2014). Brown Adipose Tissue Improves Whole-Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes*, *63*(12), 4089-4099.
- Chouchani, E. T., Kazak, L., Jedrychowski, M. P., Lu, G. Z., Erickson, B. K., Szpyt, J., ... Spiegelman, B. M. (2016). Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, *532*(7597), 112-116.
- Chouchani, E. T., & Kajimura, S. (2019). Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nature Metabolism*, *1*(2), 189-200.
- Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *297*(5), E977-E986.
- Cousin, B., Casteilla, L., Dani, C., Muzzin, P., Revelli, J. P., & Penicaud, L. (1993). Adipose tissues from various anatomical sites are characterized by different patterns of gene expression and regulation. *Biochemical Journal*, *292*(3), 873-876.
- Croonen, E. A., Nillesen, W. M., Stuurman, K. E., Oudesluijs, G., van de Laar, I. M. B. M., Martens, L., ... Yntema, H. G. (2013). Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *European Journal of Human Genetics*, *21*(9), 936-942.
- Croonen, E. A., Harmsen, M., Burgt, I. V. der, Draaisma, J. M., Noordam, K., Essink, M., & Sanden, M. W. G. N. der. (2016). Perceived motor problems in daily life: Focus group

- interviews with people with Noonan syndrome and their relatives. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(9), 2349-2356.
- Dard, L., Bellance, N., Lacombe, D., & Rossignol, R. (2018). RAS signalling in energy metabolism and rare human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*.
- Denton, R. M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(11), 1309-1316.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 870-879.
- Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., & Beylot, M. (2003). Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 846-853.
- do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Ebaady, S. E., Sessums, P. O., Abraham, R. S., Elmquist, J. K., ... Hall, J. E. (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(12), R1438-R1447.
- Dong, L., Yu, W.-M., Zheng, H., Loh, M. L., Bunting, S. T., Pauly, M., ... Qu, C.-K. (2016). Leukaemogenic effects of *Ptpn11* activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature*, 539(7628), 304-308.
- Dong, L., Zheng, H., & Qu, C.-K. (2017). CCL3 is a key mediator for the leukemogenic effect of *Ptpn11*-activating mutations in the stem-cell microenvironment. *Blood*, 130(12), 1471-1474.
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., ... Valet, P. (2008). Apelin Stimulates Glucose Utilization in Normal and Obese Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism*, 8(5), 437-445.
- Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. S. (2007). Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annual review of nutrition*, 27, 79-101.
- Edouard, T., Combier, J.-P., Nédélec, A., Bel-Vialar, S., Métrich, M., Conte-Auriol, F., ... Raynal, P. (2010). Functional Effects of PTPN11 (SHP2) Mutations Causing LEOPARD Syndrome on Epidermal Growth Factor-Induced Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Glycogen Synthase Kinase 3 β Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10), 2498-2507.

- Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Stevanovic Dokic, A., Colin, D. J., & Trajkovski, M. (2016). Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. *Cell Metabolism*, *24*(3), 434-446.
- Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S. (2014). 20 YEARS OF LEPTIN: Human disorders of leptin action. *Journal of Endocrinology*, *223*(1), T63-T70.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., ... Jones, R. G. (2013). AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. *Cell Metabolism*, *17*(1), 113-124.
- Fealy, C. E., Mulya, A., Lai, N., & Kirwan, J. P. (2014). Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *117*(3), 239-245.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell*, *151*(2), 400-413.
- Fischer, A. W., Hoefig, C. S., Abreu-Vieira, G., de Jong, J. M. A., Petrovic, N., Mittag, J., ... Nedergaard, J. (2016). Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Reports*, *14*(7), 1621-1631.
- Fischer, K., Ruiz, H. H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D. J., van der Heide, V., ... Buettner, C. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature Medicine*, *23*(5), 623-630.
- Fisher, f. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., ... Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Development*, *26*(3), 271-281.
- Frayn, K. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*, *45*(9), 1201-1210.
- Fromme, T., Kleigrewe, K., Dunkel, A., Retzler, A., Li, Y., Maurer, S., ... Klingenspor, M. (2018). Degradation of brown adipocyte purine nucleotides regulates uncoupling protein 1 activity. *Molecular Metabolism*, *8*, 77-85.
- Frühbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*, *393*(1), 7-20. <https://doi.org/10.1042/BJ20051578>
- Fujimoto, T., & Parton, R. G. (2011). Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(3), a004838.

- Galgani, J., & Ravussin, E. (2008). Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *International journal of obesity (2005)*, 32(Suppl 7), S109-S119.
- Ganeshan, K., & Chawla, A. (2017). Warming the mouse to model human diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(8), 458-465.
- Garcia, D., & Shaw, R. J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*, 66(6), 789-800.
- Garland, T., Schutz, H., Chappell, M. A., Keeney, B. K., Meek, T. H., Copes, L. E., ... Eisenmann, J. C. (2011). The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *The Journal of Experimental Biology*, 214(2), 206-229.
- Gaspar, R. C., Muñoz, V. R., Kuga, G. K., Nakandakari, S. C. B. R., Minuzzi, L. G., Botezelli, J. D., ... Pauli, J. R. (2019). Acute physical exercise increases leptin-induced hypothalamic extracellular signal-regulated kinase1/2 phosphorylation and thermogenesis of obese mice. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(1), 697-704.
- Ghandour, R. A., Colson, C., Giroud, M., Maurer, S., Rekima, S., Ailhaud, G., ... Pisani, D. F. (2018). Impact of dietary ω 3 polyunsaturated fatty acid supplementation on brown and brite adipocyte function. *Journal of Lipid Research*, 59(3), 452-461.
- Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(11), 1324-1333.
- Guo, W., Liu, W., Chen, Z., Gu, Y., Peng, S., Shen, L., ... Xu, Q. (2017). Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation via ANT1-dependent mitochondrial homeostasis. *Nature Communications*, 8(1), 2168.
- Gupta, R. K., Mepani, R. J., Kleiner, S., Lo, J. C., Khandekar, M. J., Cohen, P., ... Spiegelman, B. M. (2012). Zfp423 Expression Identifies Committed Preadipocytes and Localizes to Adipose Endothelial and Perivascular Cells. *Cell Metabolism*, 15(2), 230-239.
- Gurovich, Y., Hanani, Y., Bar, O., Nadav, G., Fleischer, N., Gelbman, D., ... Gripp, K. W. (2019). Identifying facial phenotypes of genetic disorders using deep learning. *Nature Medicine*, 25(1), 60.

- Hall, K. D. (2010). Predicting metabolic adaptation, body weight change, and energy intake in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 298(3), E449.
- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252-1263.
- Harper, J. A., Dickinson, K., & Brand, M. D. (2001). Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obesity Reviews*, 2(4), 255-265.
- Hata, K., Nishimura, R., Ikeda, F., Yamashita, K., Matsubara, T., Nokubi, T., & Yoneda, T. (2002). Differential Roles of Smad1 and p38 Kinase in Regulation of Peroxisome Proliferator-activating Receptor γ during Bone Morphogenetic Protein 2-induced Adipogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 14(2), 545-555.
- Hawass, Z., Gad, Y. Z., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., ... Pusch, C. M. (2010). Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. *JAMA*, 303(7), 638-647.
- He, Z., Zhang, S. S., Meng, Q., Li, S., Zhu, H. H., Raquil, M.-A., ... Feng, G.-S. (2012). Shp2 Controls Female Body Weight and Energy Balance by Integrating Leptin and Estrogen Signals. *Molecular and Cellular Biology*, 32(10), 1867-1878.
- He, Z., Zhu, H. H., Bauler, T. J., Wang, J., Ciaraldi, T., Alderson, N., ... Feng, G.-S. (2013). Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), E79-E88.
- Hernández-Alvarez, M. I., Thabit, H., Burns, N., Shah, S., Brema, I., Hatunic, M., ... Nolan, J. J. (2010). Subjects With Early-Onset Type 2 Diabetes Show Defective Activation of the Skeletal Muscle PGC-1 α /Mitofusin-2 Regulatory Pathway in Response to Physical Activity. *Diabetes Care*, 33(3), 645-651.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(3), C670-C681.
- Hong, S., Song, W., Zushin, P.-J. H., Liu, B., Jedrychowski, M. P., Mina, A. I., ... Banks, A. S. (2018). Phosphorylation of Beta-3 adrenergic receptor at serine 247 by ERK MAP kinase drives lipolysis in obese adipocytes. *Molecular Metabolism*, 12, 25-38.

- Horowitz, J., Chirkov, Y., Kennedy, J., & Sverdlov, A. (2010). Modulation of myocardial metabolism: an emerging therapeutic principle. *Current Opinion in Cardiology*, *25*(4), 329-334.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 225-238.
- Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J. P., Maki, H., Homma, M., ... Kajimura, S. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nature Medicine*, *23*(12), 1454-1465.
- Ikeda, K., Maretich, P., & Kajimura, S. (2018). The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *29*(3), 191-200.
- Jager, J., Corcelle, V., Grémeaux, T., Laurent, K., Waget, A., Pagès, G., ... Tanti, J. F. (2011). Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia*, *54*(1), 180-189.
- Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(29), 12017-12022.
- Kashatus, J. A., Nascimento, A., Myers, L. J., Sher, A., Byrne, F. L., Hoehn, K. L., ... Kashatus, D. F. (2015). Erk2 Phosphorylation of Drp1 Promotes Mitochondrial Fission and MAPK-Driven Tumor Growth. *Molecular Cell*, *57*(3), 537-551.
- Kazak, L., Chouchani, E. T., Jedrychowski, M. P., Erickson, B. K., Shinoda, K., Cohen, P., ... Spiegelman, B. M. (2015). A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell*, *163*(3), 643-655.
- Kazak, L., Rahbani, J. F., Samborska, B., Lu, G. Z., Jedrychowski, M. P., Lajoie, M., ... Spiegelman, B. M. (2019). Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity. *Nature Metabolism*, *1*(3), 360.
- Ke, R., Xu, Q., Li, C., Luo, L., & Huang, D. (2018). Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biology International*, *42*(4), 384-392.
- Kelley, D. E., & Mandarino, L. J. (2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*, *49*(5), 677-683.

- Khan, A. S., Subramaniam, S., Dramane, G., Khelifi, D., & Khan, N. A. (2017). ERK1 and ERK2 activation modulates diet-induced obesity in mice. *Biochimie*, *137*, 78-87.
- Kim, H., Scimia, M. C., Wilkinson, D., Trelles, R. D., Wood, M. R., Bowtell, D., ... Ronai, Z. A. (2011). Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Molecular Cell*, *44*(4), 532-544.
- Kim, W. K., Oh, K.-J., Choi, H.-R., Park, A., Han, B. S., Chi, S.-W., ... Lee, S. C. (2015). MAP kinase phosphatase 3 inhibits brown adipocyte differentiation via regulation of Erk phosphorylation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *416*, 70-76.
- Kim, Y.-M., Youn, S.-W., Sudhakar, V., Das, A., Chandhri, R., Cuervo Grajal, H., ... Ushio-Fukai, M. (2018). Redox Regulation of Mitochondrial Fission Protein Drp1 by Protein Disulfide Isomerase Limits Endothelial Senescence. *Cell Reports*, *23*(12), 3565-3578.
- Kimmel, A. R., & Sztalryd, C. (2014). Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization: *Current Opinion in Lipidology*, *25*(2), 110-117.
- Kir, S., & Spiegelman, B. M. (2016). CACHEXIA & BROWN FAT: A BURNING ISSUE IN CANCER. *Trends in cancer*, *2*(9), 461-463.
- Kleefstra, T., Wortmann, S. B., Rodenburg, R. J. T., Bongers, E. M. H. F., Hadzsiev, K., Noordam, C., ... Morava, E. (2011). Mitochondrial dysfunction and organic aciduria in five patients carrying mutations in the Ras-MAPK pathway. *European Journal of Human Genetics*, *19*(2), 138-144.
- Kolwicz, S. C., & Tian, R. (2011). Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, *90*(2), 194-201.
- Kompare, M., & Rizzo, W. B. (2008). Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation Disorders. *Seminars in Pediatric Neurology*, *15*(3), 140-149.
- Kopecky, J., Clarke, G., Enerbäck, S., Spiegelman, B., & Kozak, L. P. (1995). Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *96*(6), 2914-2923.
- Kotz, C. M., Teske, J. A., & Billington, C. J. (2008). Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *294*(3), R699-R710.
- Kujiraoka Takehiko, Satoh Yasushi, Ayaori Makoto, Shiraishi Yasunaga, Arai-Nakaya Yuko, Hakuno Daihiko, ... Adachi Takeshi. (s. d.). Hepatic Extracellular Signal-Regulated

- Kinase 2 Suppresses Endoplasmic Reticulum Stress and Protects From Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction. *Journal of the American Heart Association*, 2(4), e000361.
- Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 48(5), 275-297.
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(20), 3589-3594.
- LaRochelle, J. R., Fodor, M., Vemulapalli, V., Mohseni, M., Wang, P., Stams, T., ... Blacklow, S. C. (2018). Structural reorganization of SHP2 by oncogenic mutations and implications for oncoprotein resistance to allosteric inhibition. *Nature Communications*, 9(1), 4508.
- Laurent, V., Guérard, A., Mazerolles, C., Le Gonidec, S., Toulet, A., Nieto, L., ... Muller, C. (2016). Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nature Communications*, 7.
- Lawan, A., & Bennett, A. M. (2017). Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation in Hepatic Metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(12), 868-878.
- Lee, W. J., Kim, M., Park, H.-S., Kim, H. S., Jeon, M. J., Oh, K. S., ... Park, J.-Y. (2006). AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), 291-295.
- Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Neel, B. G., Araki, T., Kucherlapati, R., ... Hüttemann, M. (2010). A suggested role for mitochondria in Noonan syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(2), 275-283.
- Lee, M.-J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(1), 1-11.
- Lee, Y.-S., Ehninger, D., Zhou, M., Oh, J.-Y., Kang, M., Kwak, C., ... Silva, A. J. (2014). Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nature Neuroscience*, 17(12), 1736-1743.
- Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Konkar, A. A., & Granneman, J. G. (2014). Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *The FASEB Journal*, 29(1), 286-299.
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(3), 107-114.

- Lemarie, A., & Grimm, S. (2011). Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene*, *30*(38), 3985-4003.
- Leoni, C., Onesimo, R., Giorgio, V., Diamanti, A., Giorgio, D., Martini, L., ... Zampino, G. (2016). Understanding Growth Failure in Costello Syndrome: Increased Resting Energy Expenditure. *The Journal of Pediatrics*, *170*, 322-324.
- Leoni, C., Triumbari, E. K. A., Vollono, C., Onesimo, R., Podagrosi, M., Giorgio, V., ... Zampino, G. (s. d.). Pain in individuals with RASopathies: Prevalence and clinical characterization in a sample of 80 affected patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *0*(0).
- Levine, J. A. (2007). Nonexercise activity thermogenesis – liberating the life-force. *Journal of Internal Medicine*, *262*(3), 273-287.
- Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R. G., Tian, Y., Li, L., ... Gonzalez, F. J. (2017). Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metabolism*, *26*(4), 672-685.e4.
- Liao, W., Yin, X., Li, Q., Zhang, H., Liu, Z., Zheng, X., ... Feng, X. (2018). Resveratrol-Induced White Adipose Tissue Browning in Obese Mice by Remodeling Fecal Microbiota. *Molecules*, *23*(12), 3356.
- Liu, D., Bordicchia, M., Zhang, C., Fang, H., Wei, W., Li, J.-L., ... Collins, S. (2016). Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. *Journal of Clinical Investigation*, *126*(5), 1704-1716.
- Long, Q., Zhao, D., Fan, W., Yang, L., Zhou, Y., Qi, J., ... Liu, X. (2015). Modeling of Mitochondrial Donut Formation. *Biophysical Journal*, *109*(5), 892-899.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N.-C., Slone, J., Gui, B., ... Huang, T. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(51), 13039-13044.
- Malaquias, A. C., Brasil, A. S., Pereira, A. C., Arnhold, I. J. P., Mendonca, B. B., Bertola, D. R., & Jorge, A. A. L. (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*(11), 2700-2706.
- Mamedov, I., Zolkina, I., Nikolaeva, E., Glagovsky, P., & Sukhorukov, V. (2015). Carnitine insufficiency in children with inborn errors of metabolism: prevalence and treatment efficacy. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *28*(11-12), 1299–1304.

- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I.
- Marin, T. M., Keith, K., Davies, B., Conner, D. A., Guha, P., Kalaitzidis, D., ... Kontaridis, M. I. (2011). Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(3), 1026-1043.
- Markatos, K., Mavrogenis, A. F., Karamanou, M., & Androutsos, G. (2018). Pycnodysostosis: the disease of Henri de Toulouse-Lautrec. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*.
- Masgras, I., Ciscato, F., Brunati, A. M., Tibaldi, E., Indraccolo, S., Curtarello, M., ... Rasola, A. (2017). Absence of Neurofibromin Induces an Oncogenic Metabolic Switch via Mitochondrial ERK-Mediated Phosphorylation of the Chaperone TRAP1. *Cell Reports*, *18*(3), 659-672.
- Matsuo, K., Delibegovic, M., Matsuo, I., Nagata, N., Liu, S., Bettaieb, A., ... Haj, F. G. (2010). Altered Glucose Homeostasis in Mice with Liver-specific Deletion of Src Homology Phosphatase 2. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(51), 39750-39758.
- Merrick, D., Sakers, A., Irgebay, Z., Okada, C., Calvert, C., Morley, M. P., ... Seale, P. (2019). Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science*, *364*(6438), eaav2501.
- Mills, E. L., Pierce, K. A., Jedrychowski, M. P., Garrity, R., Winther, S., Vidoni, S., ... Chouchani, E. T. (2018). Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature*, *560*(7716), 102-106.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O. D., Fryer, L. G. D., Müller, C., Carling, D., & Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, *415*(6869), 339-343.
- Mohi, M. G., Williams, I. R., Dearolf, C. R., Chan, G., Kutok, J. L., Cohen, S., ... Neel, B. G. (2005). Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (PTPN11) mutations. *Cancer Cell*, *7*(2), 179-191.

- Moniez, S., Pienkowski, C., Lepage, B., Hamdi, S., Daudin, M., Oliver, I., ... Edouard, T. (2018). Noonan syndrome males display Sertoli cell-specific primary testicular insufficiency. *European Journal of Endocrinology*, *179*(6), 409-418.
- Münzberg, H., Qualls-Creekmore, E., Berthoud, H.-R., Morrison, C. D., & Yu, S. (2016). Neural Control of Energy Expenditure. *Handbook of experimental pharmacology*, *233*, 173-194.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(1), 1-13.
- Nagata, N., Matsuo, K., Bettaieb, A., Bakke, J., Matsuo, I., Graham, J., ... Haj, F. G. (2012). Hepatic Src Homology Phosphatase 2 Regulates Energy Balance in Mice. *Endocrinology*, *153*(7), 3158-3169.
- Nakamura, T., Colbert, M., Krenz, M., Molkentin, J. D., Hahn, H. S., Dorn, G. W., & Robbins, J. (2007). Mediating ERK1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(8), 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*(36), 15436-15441.
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2013). UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(5), 943-949.
- Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., ... Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, *480*(7375), 104-108.
- Nibbelink, M., Arnaud, E., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2002). La protéine découplante du tissu adipeux brun (UCP1) : la fin des dogmes. *médecine/sciences*, *18*(6-7), 780-783.
- Nugent, D. J., Romano, A. A., Sabharwal, S., & Cooper, D. L. (2018). Evaluation of bleeding disorders in patients with Noonan syndrome: a systematic review. *Journal of Blood Medicine*, *9*, 185-192.
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*, *148*(6), 1145-1159.

- Oba, D., Inoue, S., Miyagawa-Tomita, S., Nakashima, Y., Niihori, T., Yamaguchi, S., ... Aoki, Y. (2018). Mice with an Oncogenic HRAS Mutation are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity and Exhibit Impaired Hepatic Energy Homeostasis. *EBioMedicine*, *27*, 138-150.
- Oh, J.-Y., Rhee, S., Silva, A. J., Lee, Y.-S., & Kim, H. K. (2017). Noonan syndrome-associated SHP2 mutation differentially modulates the expression of postsynaptic receptors according to developmental maturation. *Neuroscience Letters*, *649*, 41-47.
- Otero-Díaz, B., Rodríguez-Flores, M., Sánchez-Muñoz, V., Monraz-Preciado, F., Ordoñez-Ortega, S., Becerril-Elias, V., ... Antuna-Puente, B. (2018). Exercise Induces White Adipose Tissue Browning Across the Weight Spectrum in Humans. *Frontiers in Physiology*, *9*.
- Ouellet, V., Labbé, S. M., Blondin, D. P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., ... Carpentier, A. C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(2), 545-552.
- Pagani, M. R., Oishi, K., Gelb, B. D., & Zhong, Y. (2009). The Phosphatase SHP2 Regulates the Spacing Effect for Long-Term Memory Induction. *Cell*, *139*(1), 186-198.
- Pagnon, J., Matzaris, M., Stark, R., Meex, R. C. R., Macaulay, S. L., Brown, W., ... Watt, M. J. (2012). Identification and Functional Characterization of Protein Kinase A Phosphorylation Sites in the Major Lipolytic Protein, Adipose Triglyceride Lipase. *Endocrinology*, *153*(9), 4278-4289.
- Pandey, R., Saxena, M., & Kapur, R. (2017). Role of SHP2 in hematopoiesis and leukemogenesis. *Current Opinion in Hematology*, *24*(4), 307-313.
- Pierpont, M. E., & Digilio, M. C. (2018). Cardiovascular disease in Noonan syndrome: *Current Opinion in Pediatrics*, *30*(5), 601-608.
- Pirzgalska, R. M., Seixas, E., Seidman, J. S., Link, V. M., Sánchez, N. M., Mahú, I., ... Domingos, A. I. (2017). Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. *Nature Medicine*, *23*(11), 1309-1318.
- Pisani, D. F., Barquissau, V., Chambard, J.-C., Beuzelin, D., Ghandour, R. A., Giroud, M., ... Amri, E.-Z. (2018). Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes. *Molecular Metabolism*, *7*, 35-44.

- Pisani, D. F., Ghandour, R. A., Beranger, G. E., Le Faouder, P., Chambard, J.-C., Giroud, M., ... Amri, E.-Z. (2014). The ω 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Molecular Metabolism*, 3(9), 834-847.
- Poekes, L., Gillard, J., Farrell, G. C., Horsmans, Y., & Leclercq, I. A. (2019). Activation of brown adipose tissue enhances the efficacy of caloric restriction for treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Laboratory Investigation*, 99(1), 4.
- Poulsen, L. la C., Siersbæk, M., & Mandrup, S. (2012). PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(6), 631-639.
- Prieto, J., León, M., Ponsoda, X., Sendra, R., Bort, R., Ferrer-Lorente, R., ... Torres, J. (2016). Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nature Communications*, 7, 11124.
- Princen, F., Bard, E., Sheikh, F., Zhang, S. S., Wang, J., Zago, W. M., ... Feng, G.-S. (2009). Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Muscle Leads to Dilated Cardiomyopathy, Insulin Resistance, and Premature Death. *Molecular and Cellular Biology*, 29(2).
- Rani, D. S., Dhandapany, P. S., Nallari, P., Govindaraj, P., Singh, L., & Thangaraj, K. (2010). Mitochondrial DNA haplogroup 'R' is associated with Noonan syndrome of South India. *Mitochondrion*, 10(2), 166-173.
- Ricquier, D., & Kader, J.-C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73(3), 577-583.
- Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F., & Cowan, C. A. (2011). Rapid Cellular Turnover in Adipose Tissue. *PLOS ONE*, 6(3), e17637.
- Rinaldo, P., Matern, D., & Bennett, M. J. (2002). Fatty Acid Oxidation Disorders. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 477-502.
- Roberts, A. E., Araki, T., Swanson, K. D., Montgomery, K. T., Schiripo, T. A., Joshi, V. A., ... Kucherlapati, R. S. (2007). Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 39(1), 70-74.
- Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(12), 885-896.

- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, *14*(11), 1293-1307.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, *15*(6), 659-667.
- Rynders, C. A., Blanc, S., DeJong, N., Bessesen, D. H., & Bergouignan, A. (2018). Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility. *The Journal of Physiology*, *596*(8), 1319-1330.
- Salvi, M., Stringaro, A., Brunati, A. M., Agostinelli, E., Arancia, G., Clari, G., & Toninello, A. (2004). Tyrosine phosphatase activity in mitochondria: presence of Shp-2 phosphatase in mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *61*(18), 2393-2404.
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960-976.
- Schaffer, J. E. (2002). Fatty acid transport: the roads taken. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *282*(2), E239-E246.
- Schiattarella, G. G., Boccella, N., Paolillo, R., Cattaneo, F., Trimarco, V., Franzone, A., ... Perrino, C. (2018). Loss of Akap1 Exacerbates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Frontiers in Physiology*, *9*.
- Schlame, M., & Ren, M. (2006). Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Letters*, *580*(23), 5450-5455.
- Schrader, M., Costello, J., Godinho, L. F., & Islinger, M. (2015). Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(4), 681-702.
- Schreiber, R., Diwoky, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsiriroj, N., Abdellatif, M., ... Zechner, R. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, *26*(5), 753-763.e7.
- Schuhmacher, A. J., Guerra, C., Sauzeau, V., Cañamero, M., Bustelo, X. R., & Barbacid, M. (2008). A mouse model for Costello syndrome reveals an Ang II-mediated hypertensive condition. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(6), 2169-2179.
- Schwalie, P. C., Dong, H., Zachara, M., Russeil, J., Alpern, D., Akchiche, N., ... Deplancke, B. (2018). A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature*, *559*(7712), 103.

- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., ... Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(1), 96-105.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M. I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J. P., Sala, D., ... Zorzano, A. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(14), 5523-5528.
- Serra-Nédélec, A. D. R., Edouard, T., Tréguer, K., Tajan, M., Araki, T., Dance, M., ... Yart, A. (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*(11), 4257-4262.
- Shabalina, I., Wiklund, C., Bengtsson, T., Jacobsson, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2002). Uncoupling protein-1: involvement in a novel pathway for β -adrenergic, cAMP-mediated intestinal relaxation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *283*(5), G1107-G1116.
- Shapira, S. N., & Seale, P. (2019). Transcriptional Control of Brown and Beige Fat Development and Function. *Obesity*, *27*(1), 13-21.
- Shi, H., & Clegg, DJ. (2009). Sex Differences in the Regulation of Body Weight. *Physiology & behavior*, *97*(2), 199-204.
- Sidossis, L. S., Porter, C., Saraf, M. K., Børsheim, E., Radhakrishnan, R. S., Chao, T., ... Herndon, D. N. (2015). Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metabolism*, *22*(2), 219-227.
- Singh, R., Parveen, M., Basgen, J. M., Fazel, S., Meshesha, M. F., Thames, E. C., ... Pervin, S. (2016). Increased expression of Beige/Brown adipose markers from host and breast cancer cells influence xenograft formation in mice. *Molecular cancer research : MCR*, *14*(1), 78-92.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., ... Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, *453*(7196), 783-787.
- Stevenson, D. A., Allen, S., Tidyman, W. E., Carey, J. C., Viskochil, D. H., Stevens, A., ... Rauen, K. A. (2012). Peripheral muscle weakness in RASopathies. *Muscle & Nerve*, *46*(3), 394-399.

- Su, S., Guntur, A. R., Nguyen, D. C., Fakory, S. S., Doucette, C. C., Leech, C., ... Brown, A. C. (2018). A Renewable Source of Human Beige Adipocytes for Development of Therapies to Treat Metabolic Syndrome. *Cell Reports*, 25(11), 3215-3228.e9.
- Sullivan, K., El-Hoss, J., Quinlan, K. G. R., Deo, N., Garton, F., Seto, J. T. C., ... Schindeler, A. (2014). NF1 is a critical regulator of muscle development and metabolism. *Human Molecular Genetics*, 23(5), 1250-1259.
- Summers, M. A., Rupasinghe, T., Vasiljevski, E. R., Evesson, F. J., Mikulec, K., Peacock, L., ... Schindeler, A. (2018). Dietary intervention rescues myopathy associated with neurofibromatosis type 1. *Human Molecular Genetics*, 27(4), 577-588.
- Sun, X., Ren, Y., Gunawan, S., Teng, P., Chen, Z., Lawrence, H. R., ... Wu, J. (2018). Selective inhibition of leukemia-associated SHP2 E69K mutant by the allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Leukemia*, 32(5), 1246.
- Tajan, M., Batut, A., Cadoudal, T., Deleruyelle, S., Le Gonidec, S., Saint Laurent, C., ... Yart, A. (2014). LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), E4494-E4503.
- 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(10), 509-525.
- Tajan, M., Paccoud, R., Branka, S., Edouard, T., & Yart, A. (2018). The Rasopathy family: Consequences of germline activation of the RAS/MAPK pathway. *Endocrine Reviews*.
- Takeuchi, K., & Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(6), E1195-E1209.
- Tao, J., Zheng, L., Meng, M., Li, Y., & Lu, Z. (2016). Shp2 suppresses the adipogenic differentiation of preadipocyte 3T3-L1 cells at an early stage. *Cell Death Discovery*, 2, 16051.
- Tanaka, T., Nishimura, A., Nishiyama, K., Goto, T., Numaga-Tomita, T., & Nishida, M. (2019). Mitochondrial dynamics in exercise physiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*.

- Tartaglia, M., Gelb, B. D., & Zenker, M. (2011). Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(1), 161-179.
- Tartaglia, M., Martinelli, S., Stella, L., Bocchinfuso, G., Flex, E., Cordeddu, V., ... Gelb, B. D. (2006). Diversity and Functional Consequences of Germline and Somatic PTPN11 Mutations in Human Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 78(2), 279-290.
- Tartaglia, M., Mehler, E. L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H. G., Kremer, H., ... Gelb, B. D. (2001). Mutations in *PTPN11*, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 29(4), 465-468.
- Tartaglia, M., Pennacchio, L. A., Zhao, C., Yadav, K. K., Fodale, V., Sarkozy, A., ... Gelb, B. D. (2007). Gain-of-function *SOS1* mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 39(1), 75-79.
- Tchernof, A., Bélanger, C., Morisset, A.-S., Richard, C., Mailloux, J., Laberge, P., & Dupont, P. (2006). Regional Differences in Adipose Tissue Metabolism in Women: Minor Effect of Obesity and Body Fat Distribution. *Diabetes*, 55(5), 1353-1360.
- Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M. A., Fadini, G. P., Albiero, M., Favaro, G., ... Sandri, M. (2017). Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metabolism*, 25(6), 1374-1389.e6.
- Thompson Legault, J., Strittmatter, L., Tardif, J., Sharma, R., Tremblay-Vaillancourt, V., Aubut, C., ... Des Rosiers, C. (2015). A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Reports*, 13(5), 981-989.
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays In Biochemistry*, 62(3), 341-360.
- Tiraby, C., & Langin, D. (2005). PGC-1 α , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme. *médecine/sciences*, 21(1), 49-54.
- Tong, J. J., Schriener, S. E., McCleary, D., Day, B. J., & Wallace, D. C. (2007). Life extension through neurofibromin mitochondrial regulation and antioxidant therapy for neurofibromatosis-1 in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 39(4), 476-485.

- Tsuneki, H., Wada, T., & Sasaoka, T. (2012). Role of orexin in the central regulation of glucose and energy homeostasis [Review]. *Endocrine Journal*, 59(5), 365-374.
- Uehara, T., Suzuki, K., Yamanaka, H., Kizaki, T., Sakurai, T., Ishibashi, Y., ... Ohno, H. (2007). SHP-2 positively regulates adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 19(6), 895-900.
- University of Alberta, Fillmore, N., Abo Alrob, O., University of Alberta, & Lopaschuk, G. D. (2011). *Fatty Acid beta-Oxidation*.
- Urosevic, J., Sauzeau, V., Soto-Montenegro, M. L., Reig, S., Desco, M., Wright, E. M. B., ... Barbacid, M. (2011). Constitutive activation of B-Raf in the mouse germ line provides a model for human cardio-facio-cutaneous syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 5015-5020.
- Vaitkus, J. A., & Celi, F. S. (2017). The role of adipose tissue in cancer-associated cachexia. *Experimental Biology and Medicine*, 242(5), 473-481.
- Vance, J. E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), 595-609.
- Wahrenberg, H., Lönnqvist, F., & Arner, P. (1989). Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 84(2), 458-467.
- Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, 19(10), 1338-1344.
- Wang, W., Meng, X., Yang, C., Fang, D., Wang, X., An, J., ... Gao, Y. (2017). Brown adipose tissue activation in a rat model of Parkinson's disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313(6), E731-E736.
- Wang, Y.-P., & Lei, Q.-Y. (2018). Metabolite sensing and signaling in cell metabolism. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 30.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519-530.
- Weyer, C., Snitker, S., Rising, R., Bogardus, C., & Ravussin, E. (1999). Determinants of energy expenditure and fuel utilization in man: effects of body composition, age, sex, ethnicity and glucose tolerance in 916 subjects. *International Journal of Obesity and Related*

- Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 23(7), 715-722.
- White, U. A., & Tchoukalova, Y. D. (2014). Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 377-392.
- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., ... Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell*, 149(4), 871-885.
- Wiedemann, N., Stiller, S. B., & Pfanner, N. (2013). Activation and Degradation of Mitofusins: Two Pathways Regulate Mitochondrial Fusion by Reversible Ubiquitylation. *Molecular Cell*, 49(3), 423-425.
- Wikstrom, J. D., Mahdaviani, K., Liesa, M., Sereda, S. B., Si, Y., Las, G., ... Shirihai, O. S. (2014). Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *The EMBO Journal*, n/a-n/a.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., ... Spiegelman, B. M. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, 150(2), 366-376.
- Wu, X., Yin, J., Simpson, J., Kim, K.-H., Gu, S., Hong, J. H., ... Araki, T. (2012). Increased BRAF Heterodimerization Is the Common Pathogenic Mechanism for Noonan Syndrome-Associated RAF1 Mutants. *Molecular and Cellular Biology*, 32(19), 3872-3890.
- Xu, E., Schwab, M., & Marette, A. (2014). Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 15(1), 79-97.
- Xue, R., Lynes, M. D., Dreyfuss, J. M., Shamsi, F., Schulz, T. J., Zhang, H., ... Tseng, Y.-H. (2015). Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., ... Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine*, 7(8), 941.
- Yan, M., Audet-Walsh, É., Manteghi, S., Dufour, C. R., Walker, B., Baba, M., ... Pause, A. (2016). Chronic AMPK activation via loss of FLCN induces functional beige adipose tissue through PGC-1 α /ERR α . *Genes & Development*, 30(9), 1034-1046.

- Young, P., Arch, J. R. S., & Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*, *167*(1), 10-14.
- Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(8), 2653-2658.
- Yu, T., Sheu, S.-S., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, *79*(2), 341-351.
- Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., & Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research*, *50*(1), 3-21.
- Zhang, E. E., Chapeau, E., Hagihara, K., & Feng, G.-S. (2004). Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(45), 16064-16069.
- Zhang, W., Chan, R. J., Chen, H., Yang, Z., He, Y., Zhang, X., ... Shou, W. (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*(33), 22353-22363.
- 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*(36), 25727-25738.
- Zhou, Y., & Rui, L. (2013). Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of Medicine*, *7*(2), 207-222.
- Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Gokce, N., & Walsh, K. (2017). Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *4*.

Annexe 1

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

Mylène 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, 31432, Toulouse, France; and ²Endocrine, Bone Diseases, and Genetics Unit, Children's Hospital, Toulouse University Hospital, 31059, Toulouse, France

ABSTRACT Noonan syndrome [NS; Mendelian Inheritance in Men (MIM) #163950] and related syndromes [Noonan syndrome with multiple lentigines (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: 676 – 700, 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

ESSENTIAL POINTS

- Noonan syndrome and related genetic diseases constitute one of the largest groups of developmental disorders and are associated, with variable penetrance and severity, with distinctive congenital defects (*i.e.*, facial features, cardiopathies, growth and skeletal abnormalities), developmental delay/mental retardation, and tumor predisposition
- In addition to congenital features, the recent identification of endocrine and metabolic dysfunctions pinpoints the need for an integrated view of the diseases rather than a symptom-directed exploration
- These diseases have been named RASopathies after the discovery of ~20 disease genes, almost all of which encode proteins belonging to or regulating the so-called RAS/MAPK signaling pathway
- Complementary functional analyses have demonstrated the role of RAS/MAPK hyperactivation in driving developmental abnormalities as well as endocrine and metabolic imbalances, although additional signaling dysregulations are also involved
- Despite genetic heterogeneity and complex phenotype/genotype correlations, the different syndromes seem to be characterized by the position of their causal genes within the RAS/MAPK pathway, with mutations hitting the backbone of the cascade associated with a more severe phenotype
- The identification of pathophysiological mechanisms provides insights into the development of specific therapeutic strategies, notably treatment aimed at reducing RAS/MAPK hyperactivation

and mortality of cardiac involvement justify complete cardiac exploration at diagnosis and during follow-up (7).

A cardinal feature of NS, which can lead to diagnosis, is *postnatal proportionate short stature*, reported in 80% of patients. Prenatal growth is classically normal, with birth weight and body length in the normal range. Growth failure usually occurs during early childhood and can result from feeding difficulties, justifying enteral nutrition in one-fifth of infants. During childhood, the mean height in both sexes follows the lower limit of the normal population [third percentile or -2 standard deviation score (SDS)] until the age of puberty, after which it declines further as a result of delayed puberty and attenuated pubertal growth spurts. The final adult height is around -2 SDS in both sexes (8–13). Some patients with NS display normal to elevated serum GH levels associated with low serum IGF-1 levels, suggesting postreceptor GH insensitivity, which has been proposed as an explanation for growth retardation (14).

In addition to growth retardation, low body mass index has been reported in patients with NS from childhood until adulthood. The prevalence of overweight and obesity is lower in patients with NS than in the general adult population (8, 12, 15, 16). This could be related to early feeding difficulties, possibly subsequent to impaired satiety control. However, one study reported changes in body composition affecting both adipose tissues and muscle mass despite normal caloric intake (16).

As mentioned previously, the onset of puberty is usually delayed in patients with NS, with a mean age at pubertal onset of 13.4 years for boys and 13.0 years for girls (17). Gonadal dysfunction with deficient spermatogenesis and impaired fertility has been reported in men with NS (18). This feature may be related to cryptorchidism, which is reported in up to 80% of

males with NS, as well as to Sertoli cell dysfunction (19, 20) and could explain the sex ratio distortion in familial cases (21).

Skeletal abnormalities such as pectus and scoliosis are frequent findings in patients with NS, as well as decreased bone mineral density (22, 23).

Mild to moderate *developmental delay/learning disability* is identified in more than half of patients with NS, notably social and communication difficulties, attention deficit, and language impairment (24). However, mental retardation (IQ < 70) is uncommon in patients who have NS, and their intelligence is within the normal range (25, 26).

Easy bruising and bleeding tendency can be present, and it is recommended that baseline coagulation screening be carried out, especially before any major surgery. Both coagulation factors and platelet defects have been suggested to explain this bleeding diathesis (27, 28). Whether related diseases share these defects is unknown to date.

Along with an eightfold increased cancer risk, NS is associated with *cancer predisposition*, notably childhood cancers (29). In particular, a higher incidence of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), with frequent neonatal manifestations, has been described in NS (30, 31) (Table 1).

Related syndromes: variations from the prototype

Noonan syndrome with multiple lentiginos (NS-ML), formerly named LEOPARD syndrome (according to the acronym, *l*entiginos, *E*CG conduction abnormalities, *o*cular hypertelorism, *p*ulmonic stenosis, *a*bnormal genitalia, *r*etardation of growth, and sensorineural *d*eafness), has an estimated prevalence of fewer than 1 per 100,000 live births. However, the phenotypic redundancy with other RASopathies can make the diagnosis more difficult (32). NS-ML is phenotypically very close to NS but has distinctive

Table 1. Clinical Features and Genetics of RASopathies

Disease	Epidemiology	Major Symptoms	Disease Gene
Noonan syndrome (NS) MIM #163950	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>
	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	Dysmorphism	<i>PTPN11</i> (90%), <i>RAF1</i> (5%), <i>BRAF</i>
	Autosomal dominant	HCM 80% Moderate short stature (50%) Skeletal abnormalities Mild intellectual disability (30%) Multiple lentigines Deafness (20%)	Unknown: 5%
Noonan-like syndrome disorder with loose anagen hair (NS-LAH) MIM #607721	≈100 reported cases	Dysmorphism	<i>SHOC2</i> , <i>PPP1CB</i>
	Autosomal dominant	Cardiac defects (mitral valve, septal defects) Short stature Hyperactive behavior Loose anagen hair	
Costello syndrome (CS) MIM #218040	1/400,000	Coarse facial features	<i>HRAS</i>
	Autosomal dominant	Congenital cardiac defects (HCM, arrhythmia) Failure to thrive, short stature Cutaneous defects (deep palmar and plantar creases) Papillomas Mental retardation Malignant risk (15%)	
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, MIM#162200	1/3000 Autosomal dominant Familial or <i>de novo</i>	Rarer congenital cardiopathies Multiple café au lait spots and freckling Neurofibromas/benign tumors Iris Lisch nodules Mild learning disabilities	<i>NF1</i> (>90%)
Legius syndrome (LS), MIM#611431	≈200 reported cases Autosomal dominant	Multiple café au lait spots without neurofibromas Mild learning disabilities	<i>SPRED1</i> (>90%)

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, lentiginous, ECG conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonic stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, and sensorineural deafness; MIM, Mendelian Inheritance in Men.

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 I 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 for explaining 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 (GTPase) 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 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 MAPK ERK kinases (MEK) which in turn activate the MAPK Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK). 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 consequence of early defects such as abnormal placentation 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 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 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 invalidation 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 invalidation 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).

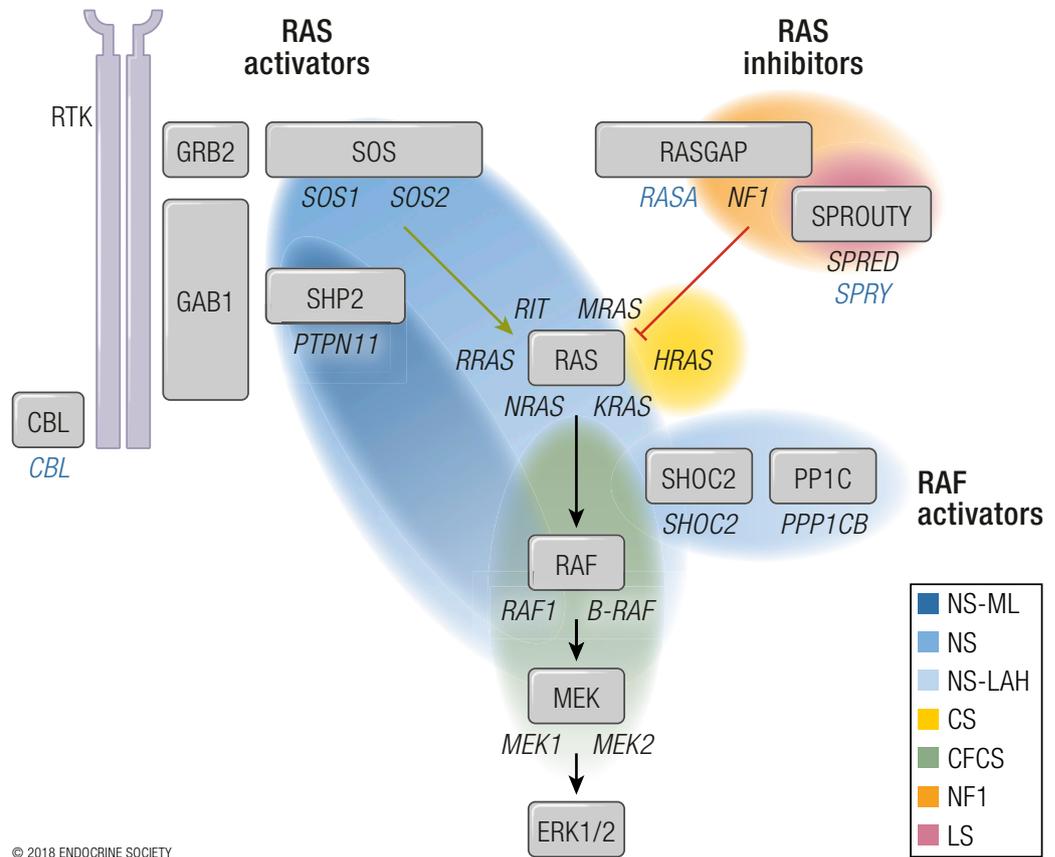
Germline mutations in the RAS/MAPK pathway, functional heterogeneity, allelism, and genotype/phenotype correlations

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*

"Patients with NS have distinctive facial features."

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 function/phenotype associations: In blue, NS and NS-like syndromes (NS-ML, NS-LAH) are caused mainly by mutations on RAS/RAF activators. In orange/pink, 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.



© 2018 ENDOCRINE SOCIETY

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 hyperactivate 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 Men #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 Y279C 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

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> ^{S2G}	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>Nf</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> ^{I24N}	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> ^{A462T, G465A, 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
CFCS	<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)
	<i>Ptpn11</i> ^{N308D}	KI	Germline	Cardiac defects, growth retardation, craniofacial defects, hematological problems in homozygous	Increased RAS/MAPK	(143)
	<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)
	<i>Ptpn11</i> ^{D61A}	Conditional KI	Neuronal	Obesity resistance (in female)	Increased p38	(70)
	<i>Ptpn11</i> ^{Q79R}	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)
			Endothelial	Cardiac defects	Increased RAS/MAPK	(146)
	<i>Sos1</i> ^{E846K}	Conditional KI	Germline	Cardiac defects, growth retardation, craniofacial defects, hematological problems in homozygous	Increased RAS/MAPK, Rac, and Stat3	(147)
	<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)	
<i>K-Ras</i> ^{V14I}	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
	<i>Ptfn11</i> ^{T468M}	KI	Germline	HCM, growth delay, dysmorphia, reduced adipogenesis, increased EE, improved insulin sensitivity	Increased RAS/MAPK and AKT/mTOR	(40)
	<i>Ptfn11</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)
CFCS	<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)
	<i>B-Raf</i> ^{L597V}	Conditional KI	Germline	Short stature, facial dysmorphia, HCM	Increased RAS/MAPK	(158)
	<i>B-Raf</i> ^{Q241R}	Conditional KI	Germline	Embryonic/neonatal lethality, heart defects, liver necrosis, edema, craniofacial abnormalities, lymphatic defects	Increased RAS/MAPK, decreased p38 and AKT	(159)
	<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)
	<i>Nf1</i> ^{-/-}	Conditional KO	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)
			Myeloid	JMML	PI3K/mTOR/AKT pathway	(168)
LS	<i>Spred1</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.

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

cardiomyocytes from patients with NS-ML and in tissues from mice expressing NS-ML-causing SHP2 mutants (*Ptpn11*^{Q510E}, *Ptpn11*^{T468M/+}) (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*^{V14I/+} NS mice also display RAS/MAPK hyperactivation in some tissues (150). Mutations of *RIT*, *RRAS*, *NRAS*, and *MRAS*, 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 CFCS-associated *BRAF* mutations are stronger than those causing NS or NS-ML (138, 157–159, 198, 199).

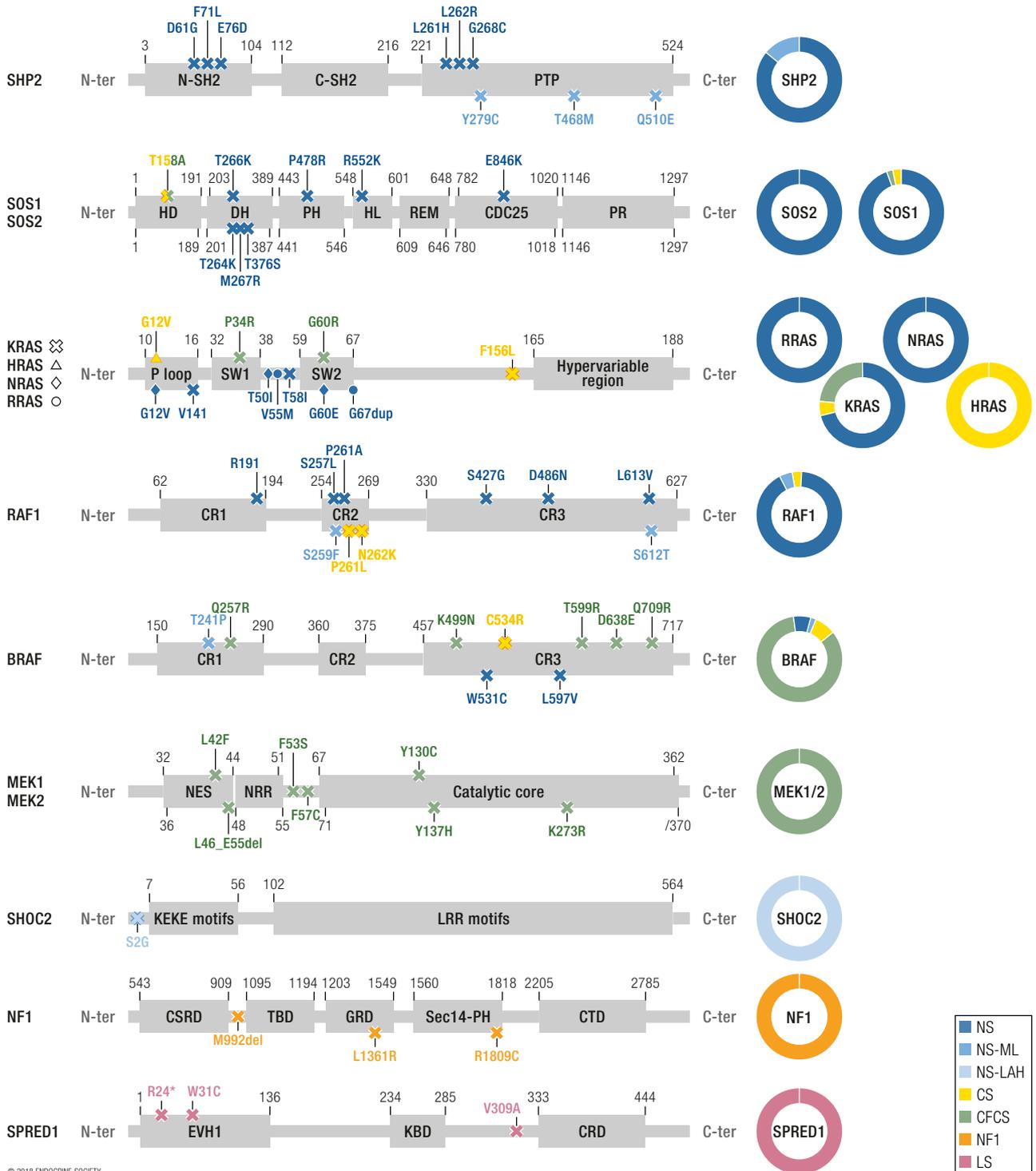
Mutations of *MEK1* and *MEK2* hit the negative regulatory region or the catalytic core domain of the kinases, resulting in increased kinase activity and gain-of-function effect on the RAS/MAPK pathway (106, 138, 160, 198, 200).

The NS-LAH-associated *SHOC2* mutation (S) 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 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/

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; blue, NS and NS-like syndromes (NS-ML, NS-LAH); yellow, CS; green, CFCS; orange, NF1; pink, LS]. 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 *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.



© 2018 ENDOCRINE SOCIETY

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 pro-inflammatory 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 CFCS-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*^{Q510E}) (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 effect (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*^{V14I/+} 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 HRAS-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 insights into new therapies to alleviate NS-ML-associated HCM (233). The fact that hyperactivation of both 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 lentiginos 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-D61G 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

"In patients who have Costello syndrome facial features are coarser than in patients with other RASopathies."

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 wildtype 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 non-specific 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 significant 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 non-autonomous 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, Wieczorek D, Zenker M. The face of Noonan syndrome: does phenotype predict genotype. *Am J Med Genet A.* 2010;**152A**(8):1960–1966.
- Prendiville TV, 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, Milanesi 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, Knupfer C, Enders H, Schmaltz 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 Burgt I, Noordam C. Impaired Sertoli cell function in males diagnosed with Noonan syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;**21**(11):1079–1084.
- Tartaglia M, Corceddu V, Chang H, Shaw A, Kalidas K, Crosby A, Patton MA, Sorcini M, van der Burgt 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, Alfieri 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.
- Pierpont El, 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.
- Roelofs RL, Janssen N, Wingbermuehle E, Kessels RP, Egger JJ. Intellectual development in Noonan syndrome: a longitudinal study. *Brain Behav.* 2016;**6**(7):e00479.
- Artoni A, Selicorni A, Passamonti SM, Lecchi A, Bucciarelli P, Cerutti M, Cianci P, Giannello F, Martinelli I. Hemostatic abnormalities in Noonan syndrome. *Pediatrics.* 2014;**133**(5):e1299–e1304.
- Sharland M, Patton MA, Talbot S, Chitolie 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, Kohlhasse J, Pauli S, Wildhardt G, Kutsche K, Auber B, Christmann A, Bachmann N, Mitter D, Cremer FW, Mayer K, Daumer-Haas C, Nevinsky-Stickel-Hinzpeter C, Oeffner F, Schlüter G, Gencik M, Überlacker B, Lisowski 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, Guellet 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 MJ, van Kessel AG, van Krieken JH, Kiemeneij 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, Calabrò R, Pizzuti A, Dallapiccola B. Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentiginos 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 lentiginos/LEOPARD syndrome presenting as sudden cardiac arrest. *Chest*. 1998; **113**(5):1415–1417.
36. Limongelli G, Sarkozy A, Pacileo G, Calabrò P, Digilio MC, Maddaloni V, Gagliardi G, Di Salvo G, Iacomino M, Marino B, Dallapiccola B, Calabrò 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, Calabrò 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, Martin-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, Batut A, Cadoudal T, Deleruyelle S, Le Gonidec S, Saint Laurent C, Vomscheid M, Wanecq E, Tréguer K, De Rocca Serra-Nédélec A, Vinel C, Marques M-A, Pozzo J, Kunduzova O, Salles J-P, Tauber M, Raynal P, Cavé H, Edouard T, Valet 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, Tartaglia 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 epidermal growth factor-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, Alamshebpour A, Kano Y, Raught B, Zhang ZY, Zadeh G, Oh H. 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, Valet P, Edouard T, Yart A. SHP2 sails from physiology to pathology. *Eur J Med Genet*. 2015; **58**(10):509–525.
55. Jang 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, Hatta T, Otani 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, Jeannotte 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, Vucak 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. Rahmouni 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, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; **6**(1): a009191.
72. Matsuo K, Delibegovic M, Matsuo I, 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 p62-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, Waquet A, Pagès G, Binétruy B, Le Marchand-Brustel Y, Burcelin R, Bost F, Tanti 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, Prot 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 diabetic 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, Sheikf F, Zhang SS, Wang J, Zago WM, Wu D, Trelles RD, Bailly-Maitre B, Kahn CR, Chen Y, Reed JC, Tong GG, 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 BC, 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, Bauer 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, Fesik 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. Macropinocytosis 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, Dipaola 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, Lyssiotis 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, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Colloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik JH, Lim C, Guimaraes 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. Pathogenetics 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, Petrangoli 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, Luttgen S, Aydin H, von Deimling F, Evers C, Hahn A, Hempel M, Issa U, Kahler AK, Lieb A, Villavicencio-Lorini P, Ballesta-Martinez MJ, Nampoothiri S, Ovens-Raeder 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. Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hosokaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima 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, Rossì 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, Favre L, Vlkova M, Seemanova E, Digilio C, Zenker M, Zampino G, Verloes A, Dallapiccola B, Roberts AE, Cavé H, Gelb BD, Neel BC, 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. Dentici ML, Sarkozy A, Pantaleoni F, Carta C, Lepri F, Ferese R, Cordeddu V, Martinelli S, Briuglia S, Digilio 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, Digilio MC, Martinelli S, Flex E, Lepri F, Bartholdi D, Kutsche K, Ferrero GB, Anichini C, Selicorni A, Rossi C, Tenconi R, Zenker M, Merlo B, Dallapiccola B, Iyengar R, Bazzicalupo P, Gelb BD, Tartaglia M. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation 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 CJ, 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):6852–6857.
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 YG, 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. Gotoh 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. Razzaque 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, Hurlay AD, Bentiari-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. Santoriello C, Deflorian C, Pezzimenti F, Kawakami K, Lanfrancone L, d'Adda di Fagnana 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, Estep AL, Marais R, Rauen KA, Patton EE. Kinase-activating and kinase-impaired cardiofacio-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 I 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, Ligon 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 Rep.* 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):e1006884.
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 *Sos1* 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 MJ, 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.* 2017;**8**:15518.
150. Hernández-Porras I, Fabbiano S, Schuhmacher AJ, Aicher A, Cañamero M, Cámara JA, Cussó L, Desco M, Heeschchen C, Mulero F, Bustelo XR, Guerra C, Barbacid M. K-RasV14I recapitulates Noonan syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;**111**(46):16395–16400.
151. Marin TM, Keith K, Davies B, Conner DA, Guha P, Kalaitzidis D, Wu X, Lauriol J, Wang B, Bauer M, Bronson R, Franchini KG, Neel BG, Kontaridis MI. 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 MI. Developmental SHP2 dysfunction underlies cardiac hypertrophy in Noonan syndrome with multiple lentigenes. *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, Jacques 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. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner 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, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards 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, Eleferiou 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 BG, 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, Lissewski 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 LI, 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 SIR-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, Lezoualc'h 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 3 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):2477–2482.
 177. Kontaridis MI, 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, Torrieri 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, Cordezzu V, Zampino G, Burgt Iv, Palleschi A, Petrucci TC, Sorcini M, Schoch C, Foa R, Emanuel PD, Gelb BD. Diverse driving 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 LJ, 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, Saitoh 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, Siguerro 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, Agueni M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, Abramowicz A, Cristian I, Budcarilli M, Naslavsky MS, Malaquias AC, Zatz M, Boscher 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. Tumurkhuu 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, Grimbergen LA, Overwater I, Vaart TV, Stedehouder 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. Schubert S, Bollag G, Lyubynska N, Nguyen H, Kratz CP, Zenker M, Niemyer CM, Molven A, Shannon K. Biochemical and functional characterization of germ line KRAS mutations. *Mol Cell Biol*. 2007;**27**(22):7765–7770.
 192. Schubert 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, Sistermans E, Rauch A, Niemyer 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, Mundios 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, Bocchinfuso G, Rossi C, Burkit-Wright EM, Farroiti 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, Niihori 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, Trinh QM, Peltekova VD, Reid JG, Tworog-Dube E, Morgan MB, Muzny DM, Stein L, McPherson JD, Roberts AE, Gibbs RA, Neel BG, 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, Backx PH, Neel BG, 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, Niihori 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, Wiczorek 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 C, Fodale V, Cecchetti S, Coppola S, Stipo S, Corceddu 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, Fraying 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, Tongard 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 pulmonary stenosis in patients carrying NF1 missense mutations affecting p.Arg1809: genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*. 2015;**36**(11):1052–1063.
 203. Arafeh R, Qutob N, Emmanuel R, Keren-Paz A, Madore J, Elkhaloun A, Wilmott 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. Lissewski C, Kant SG, 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, Scharin-Täng M, Safari R, Karlsson C, Bergo 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, Patton EE. Continual 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, Perin-Grandjean J, Beton N, Gennero I, Capilla F, Neel BG, 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, Ohno 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, Novitsch BC, 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 BK, 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'Hooge 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 CI, 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-Berreoets 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, Freudenberger 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, Rahrmann EP, Halfond 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, Abbadessa 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 I 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, Lauriol J, Thul J, Behnke-Hall K, Logeswaran T, Schänzer A, Bögürücü 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. Moteji 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, Dhandapani 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, Gorden 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 DI, 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 PC, 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. Giacomozi 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. Cotterill AM, McKenna WJ, Brady AF, Sharland M, Elsayi M, Yamada M, Camacho-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. Karoullia 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, Drosten M, Barbacid M, Caponigro G, Stuart D, Moebitz H, Solit DB, 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 HM, Fekkes P, Garcia-Fortanet 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, Lenoir F, Liu G, Liu S, Majumdar D, Meyer MJ, Palermo M, Perez L, Pu M, Price E, Quinn C, Shakya S, Shultz MD, Slisz J, Venkatesan K, Wang P, Warmuth M, Williams S, Yang G, 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, Rauen 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, Illaste A, Karakikes I, Sorourian M, Sheng J, Hajjar 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: This 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 programs 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, PhD, INSERM UMR 1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (I2MC), University of Toulouse Paul Sabatier, Avenue J Poulhes, 31432 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; ERK, MAPK extracellular signal-regulated kinases; GAP, GTPase-activating protein; GTP, guanosine triphosphate; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; iPSC, induced pluripotent stem cell; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; KI, knockin; LOF, loss-of-function; LS, Legius syndrome; MEK, MAPK ERK kinases; MIM, Mendelian Inheritance in Men; MPD, myeloproliferative disorder; NF1, type I neurofibromatosis; NS, Noonan syndrome; NS-LAH, Noonan-like syndrome with loose anagen hair; NS-ML, Noonan syndrome with multiple lentigines; 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.

Annexe 2

SHP2 plays a direct role in inflammation-triggered insulin resistance by switching macrophage identity.

Romain Paccoud¹, Thomas Edouard², Mylène Tajan¹, Alizée Dortignac¹, Ophélie Pereira¹, Maxime Branchereau¹, Julie Charpentier¹, Jean Personnaz¹, Sophie Branka¹, Simon Deleruyelle¹, Sophie Le Gonidec¹, Mickaël Canouil³, Nicolas Beton⁴, Jean-Pierre Salles², Maithé Tauber², Jacques Weill³, Philippe Froguel³, Benjamin G, Neel⁵, Toshiyuki Araki⁵, Christophe Heymes¹, Rémy Burcelin¹, Isabelle Castan¹, Philippe Valet¹, Cédric Dray¹, Jean-Philippe Pradère^{1,†}, Armelle Yart^{1, †, *}

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

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

³*Université de Lille, CNRS UMR8199 - European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Sabatier, Toulouse, France.*

⁴*Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan, INSERM UMR 1043, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.*

⁵*Laura and Isaac Perlmutter Cancer Center, NYU-Langone Medical Center, NY 10016, USA.*

* to whom correspondence should be addressed: armelle.yart@inserm.fr

† these authors jointly directed this work

Word count (main text, references and figure legends): 9900

Single sentence summary

Hyperactive SHP2 controls macrophage fate in metabolic tissues to promote inflammation-driven insulin resistance, pointing SHP2 as a new target in T2D

Abstract

Insulin resistance is a key event in type 2 diabetes onset, but its multifactorial origin makes it difficult to identify mechanisms to target. We report that Noonan syndrome (NS), a genetic disease caused by activating mutations of *PTPN11*, encoding SHP2, is associated with an unsuspected insulin resistance profile. Indeed, patients with NS exhibit insulin resistance as obese subjects despite opposite body mass index. A NS mouse model also displayed a comparable insulin resistance phenotype uncoupled from unbalanced lipid management. Bone marrow transplantation revealed this phenotype was borne by hematopoietic cells and further analysis revealed constitutive inflammation of metabolic tissues. Clodronate-mediated macrophage depletion both improved glucose tolerance and decreased this so-called metaflammation, highlighting a key role of macrophages. In-depth analysis of liver macrophages showed that activating SHP2 mutation promoted a pro-inflammatory phenotype and modified resident macrophage's identity. Treatment of obese/diabetic mice with the SHP2 inhibitor SHP099 improved their insulin sensitivity, reduced metaflammation and alleviated the macrophage phenotype. Taken together these results reveal that SHP2 hyperactivation directly promotes inflammation-triggered insulin resistance and that its inhibition could have therapeutic potential to target insulin resistance.

Keywords: SHP2, Noonan syndrome, insulin resistance, metaflammation, macrophage.

Introduction

With a prevalence of 422 millions of affected patients in 2014, type 2 diabetes (T2D) has reached epidemic proportions worldwide, in tight correlation with overweight/obesity, notably in Western but also in developing countries (1). T2D is a multifactorial disease, with many defects -the so-called ominous octet- contributing to hyperglycemia (2). While symptomatic glucose-lowering therapies (*e.g.*, metformin, thiazolidinediones) represent first line treatments, some of them can be associated with adverse effects, notably hypoglycemia, weight gain, liver toxicity and cardiovascular complications. A major challenge ahead is thus to develop therapeutic strategies that could target the causal mechanism(s) of the disease. In this setting, resistance of peripheral tissues to insulin action is a key event in diabetes onset, so therapeutic strategies aiming at restoring insulin sensitivity are highly relevant, with the prerequisite of understanding insulin resistance-promoting mechanisms.

Even though gene-targeting approaches have pinpointed key determinants of insulin resistance (*e.g.*, signalling defects downstream from insulin receptor, inflammation, lipotoxicity), most of these do not translate to human pathophysiology because of compensatory mechanisms or fail to yield therapeutics because of adverse effects. 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. As unique conditions caused by single genetic events, they can be highly valuable for assessing 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.

Noonan syndrome (NS) and NS with multiple lentiginos (NS-ML) are related genetic, autosomal dominant, diseases associated with cranio-facial features, cardiopathies, and growth retardation, as well as predisposition to myeloproliferative disorders (MPD; *i.e.*

juvenile myelomonocytic leukaemia, JMML). They are mainly caused by mutations of *PTPN11*, encoding the tyrosine phosphatase SHP2, that surprisingly result in opposite biochemical effects, as NS-associated mutations are hyperactivating while NS-ML-causing mutations are hypoactivating (3). We previously reported that a mouse model of NS-ML, carrying a hypoactive mutation of SHP2 frequently found in NS-ML patients, displays improved insulin sensitivity and resistance to obesity-induced diabetes, highlighting a global negative role of SHP2 in regulating insulin sensitivity (4). Conversely, 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/Insulin Receptor Substrate-1 (IRS1) association negatively correlates with insulin signaling activation in animal models of insulin resistance (5-9). Moreover, *PTPN11* has been identified as one 25 candidates for metabolic syndrome in human (10). However, whether and how SHP2 hyperactivation can, directly or indirectly, promote insulin resistance remains unknown.

To address this question, we used NS, associated with hyperactive SHP2, as a model system. In this study, we explored the metabolic status of NS, both in NS patients carrying mutations on *PTPN11*, and in a well-characterized mouse model of the disease, that ubiquitously expresses the D61G, hyperactive, mutant of SHP2 at the heterozygous state (SHP2^{D61G/+}) (11). Our data highlight 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 insulin sensitivity and reduces inflammation in obese/diabetic mice.

Results

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

To get initial insights into the metabolic impact of SHP2 hyperactivation, we analyzed clinical data of a cohort of 21 pediatric patients with NS and genetic confirmation of *PTPN11* mutations (referred to as NS-PTPN11). Patients with severe cardiopathy, MPD or growth hormone (GH) treatment were excluded (tables S1 and S2). Body mass index (BMI) was significantly lower in NS-PTPN11 patients when compared to age- and gender-matched healthy subjects (normal weight group), confirming previous results (12). Fasting glycemia and fasting insulinemia were in the normal range. When challenged by oral glucose tolerance test (OGTT), NS-PTPN11 patients displayed a similar rise in glycemia and insulinemia as normal weight subjects, but these parameters remained higher over time (tables 1 and S2). Moreover, normalized (expressed as percentage of fasting value) glycemia remained elevated after 2 hours and normalized 2-hour insulinemia also was increased in NS-PTPN11 patients (Fig. 1A and 1B, tables 1 and S1). Global analysis of the glycemia profile revealed a significant difference between NS-PTPN11 patients and age- and gender-matched normal weight subjects (Fig. 1A).

We compared the metabolic profiles of NS-PTPN11 patients and obese/insulin resistant subjects. Obese patients displayed normal fasting glycaemia (4.71 vs 4.83 mmol/L), but significantly higher fasting insulinemia (45.07 vs 98.8 mIU/L, $p < 0.001$), resulting in higher HOMA-IR and QUICKI (tables 1 and S2). Despite diametrically opposite BMI values in NS-PTPN11 and obese patients, 2-hour glycemia, 2-hour insulinemia, and normalized parameters, remained high in the 2 groups compared with normal weight subjects, and their glycemia curves were very similar (Fig. 1A, B, tables 1 and S2). Thus, these results reveal that NS-

PTPN11 patients present similar features of insulin resistance as obese subjects despite opposite BMI (Fig. 1C). Importantly, this profile was not observed in a small group of lean, BMI-matched subjects, who displayed elevated fasting glycemia but regulated their glycemia during OGTT as efficiently as normal weight individuals (tables 1 and S2).

We next assessed glucose homeostasis in SHP2^{D61G/+} mice (referred to as NS mice). WT and NS animals (10-12 weeks old) were first assayed for OGTT. NS animals displayed normal fasting glycemia but significant glucose intolerance compared with WT littermates (Fig. 1D) that was also seen in 20 week-old NS mice (fig. S1A). Fasting insulinemia and glucose-induced insulinemia were similar between both groups, as was insulin immunostaining of pancreas section (Fig. 1E, F). However, insulin tolerance test (ITT) revealed insulin intolerance in NS animals (Fig. 1G) and insulin-evoked AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation was markedly decreased in metabolic tissues from NS mice (Fig. 1H). We also assessed whole-body glucose utilization in conscious mice during a euglycemic hyperinsulinemic clamp. The glucose infusion rate (GIR) was reduced by half in NS mice compared with WT littermates (Fig. 1I), concomitant with decreased glucose uptake in muscle and impaired suppression of hepatic glucose production (HGP) by insulin, highlighting insulin resistance in metabolic tissues, notably the liver (Fig. 1J, K). Insulin response was normalized when using higher dose of insulin, reinforcing the notion of impaired insulin sensitivity (fig. S1B-D). Together, these results reveal that systemic expression of hyperactive SHP2 is associated to glucose intolerance and insulin resistance in mouse and human.

Hyperactive SHP2-associated glucose intolerance is not due to ectopic lipid deposits

It is well established that glucose intolerance/insulin resistance can arise from ectopic lipid deposits in metabolic tissues, resulting in lipotoxicity. Such situation classically occurs during obesity but also is seen in lipoatrophic or lipodystrophic diseases, because adipose tissue

storage capacities are outreached or insufficient, respectively. We 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 reduced significantly. Further analysis revealed that almost all patients have hypoleptinemia, in accordance with their reduced adiposity (table S2). SHP2^{D61G/+} mice displayed reduced body weight, as well as decreased absolute fat and lean masses, compared with their SHP2^{+/+} littermates (fig. S2A-D). Interestingly, while lean mass proportion was similar in both genotypes, the fat proportion was significantly reduced in NS animals, as was the weight of perigonadic fat pads and leptinemia, highlighting reduced adiposity (Fig. 2A-C). These 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 (fig. S3A-D). Importantly, high-fat fed NS and WT mice display similar glucose and insulin intolerance despite lower adiposity, although WT, but not NS mice, developed fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia (fig. S3E-H), which is reminiscent of the NS *vs* obese patients profile (Fig. 1C). Plasma triglycerides of NS mice were normal under standard diet or HFD (Fig. 2D and fig. S3I). By contrast, cholesterol and HDL levels were significantly lower in NS mice, and free fatty acids were similar in WT and NS animals, whatever the diet was (Fig. 2E-H and fig. S3I). Triglyceride quantification in metabolic tissues from NS mice showed normal or reduced lipid deposits in muscle and liver, respectively (Fig. 2I-K), a difference that widened upon HFD (fig. S3J, K). In concert, these data reveal that NS is associated with reduced adiposity, normal or lower-than-average plasma lipids and reduced ectopic lipid deposits, suggesting that insulin resistance triggered by hyperactive SHP2 is not caused by defects in lipid storage and subsequent lipotoxicity.

Glucose intolerance is only transiently reverted by chronic MEK inhibition

It is well known that a large part of SHP2 biological activity relies on its capability to promote RAS/ERK activation. Accordingly, work performed on patient cells or in mouse models has clearly demonstrated that NS-PTPN11-associated clinical traits, including cardiopathies, cranio-facial defects or growth retardation are causally linked to RAS/ERK hyperactivation (11, 13-18). We thus investigated whether ERK hyperactivation also promotes the metabolic phenotype found in the SHP2^{D61G/+} mice. Chronic treatment with the MEK inhibitor PD0325901 efficiently reduced ERK1/2 hyperphosphorylation in those animals (fig. S4A). After two weeks of treatment, glucose tolerance was improved in PD0325901-treated NS mice when compared to vehicle-injected animals (fig. S4B, C). However, this effect was lost after longer treatment, possibly hidden by a significant increase in body weight (fig. S4D-G). Together, these results suggest a minor contribution of RAS/ERK hyperactivation in the insulin resistance phenotype triggered by hyperactive SHP2.

The glucose intolerance phenotype is transferred with hematopoietic cells

SHP2 invalidation in different metabolic tissues (*e.g.*, muscle, liver) has revealed opposite effects on insulin sensitivity (19, 20). Insulin resistance can also result from low-grade inflammation, for instance in obesity and also in chronic inflammatory conditions (21, 22), and SHP2 has been shown to trigger a pro-inflammatory phenotype (23-25). To better understand how hyperactive SHP2 drives insulin resistance, we performed bone marrow transplantation (BMT) experiments to identify if the phenotype is of hematopoietic origin or not (Fig. 3A). Transplantation did not modify body weight and adiposity of chimeric mice (Fig. 3B, C). Repopulation of WT mice with NS BM (NS in WT, N>W) resulted in significant decrease of the glucose tolerance of WT mice when compared to WT reconstituted (W>W) animals without altering fasting glycemia (Fig. 3D, E). The difference between N>W

and W>W shrunk over time (Fig. 3F, G), possibly because of the significant body weight gain of the W>W animals ($33.2\pm 0.81\text{g}$ vs $36.1\pm 1.40\text{g}$, $p=0.01$). Conversely, transplantation of WT BM in NS mice (WT in NS, W>N) did not modify fasting glycemia but improved the glucose tolerance of NS mice over time (Fig. 3F, G), associated with higher insulin secretion (Fig. 3H). Taken together, these results suggest that SHP2^{D61G/+} hematopoietic cells were sufficient to promote glucose intolerance.

NS mice display a metaflammation phenotype

Given the role of the hematopoietic cells in NS-associated insulin resistance, we assessed the inflammatory status in metabolic tissues from SHP2^{D61G/+} mice. Gene expression analysis revealed a significant increase of several markers of immune cell (*Cd45*, *Cd8*), in particular macrophages (*F4/80-Emr-1*, *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*) (Fig. 4A). Plasma IL6 and TNF α followed a similar pattern, associated with higher circulating leucocytes and monocytes (Fig. 4B, C). Although the quantification of macrophages (CD45+, F4/80+ cells) in stromal fractions from WAT, muscle and liver by flow cytometry did not show an increase of macrophages infiltration, we observed a significantly higher proportion of pro-inflammatory macrophages (CD45+, F4/80+, CD11b+, CD11c+ cells) in the different metabolic tissues of NS mice (Fig. 4D-F). Together, these results show that systemic expression of hyperactive SHP2 drives a constitutive inflammation status of the metabolic tissues. Importantly, chronic treatment with PD0359201 did not modify the inflammatory profile of SHP2^{D61G/+} mice, as revealed by unchanged inflammation markers profile and stromal fraction infiltrates (fig. S4H, I). To establish a first link between inflammation and the insulin resistance phenotype in NS, we evaluated the inflammatory profile of N>W and W>N mice. Interestingly, N>W mice

displayed a significant raise of the inflammatory markers in the metabolic tissues, associated with an increase of circulating IL6 and TNF α levels (Fig. 4G, H), when compared to W>W mice. In contrast, W>N showed a significant decrease of their inflammatory phenotype (Fig. 4G, I). In concert, these results highlight a positive correlation between the inflammatory pattern and the glucose intolerance in SHP2^{D61G/+} mice, suggesting that hyperactive SHP2 mutation could cause insulin resistance by triggering metaflammation.

Macrophage depletion rescues glucose intolerance in SHP2^{D61G/+} mice

We thus evaluated the specific role of macrophages on NS-associated glucose intolerance. Macrophage depletion by clodronate treatment significantly improved glucose tolerance of NS mice (Fig. 5A) at least in part through an effect on fasting glycemia (Fig. 5B). Expression of inflammation markers was markedly reduced in the liver of clodronate-treated NS mice, and to a lesser extent in their adipose tissue but not in their muscle (Fig. 5C). Moreover, clodronate almost abolished F4/80+ and CD11c+ cells infiltration in the liver and strongly reduced it in the perigonadal WAT, but had no effect on CD11c+ cell infiltrate in muscle or in subcutaneous WAT (Fig. 5D). Consistent with this, insulin-evoked AKT Ser⁴⁷³ 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 (Fig. 5E, F). As perigonadal WAT has a limited contribution to whole-body glucose uptake (Fig. 1J), the improvement of glucose tolerance upon clodronate treatment might 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 glycemia. These results demonstrate that the metaflammation phenotype displayed by SHP2^{D61G/+} mice contributes to their glucose intolerance.

Hyperactive SHP2 shifts macrophage identity towards a pro-inflammatory profile

We next investigated the direct impact of hyperactive SHP2 on macrophage function. To this aim, bone marrow derived macrophages (BMDMs) were isolated from SHP2^{+/+} and SHP2^{D61G/+} mice. Expression of pro-inflammatory markers (*e.g.*, *Tnfa*, *Mcp1*) was significantly increased in BMDMs derived from NS mice (Fig. 6A), suggesting that hyperactive SHP2 curves macrophages towards a pro-inflammatory phenotype. Consistently, BMDMs derived from SHP2^{D61G/+} mice were pre-activated and more sensitive to LPS stimulation than WT BMDMs, as revealed by higher NFκB/p65 phosphorylation (Fig. 6B,C). Given the strong contribution of liver NS macrophages on insulin resistance, we next performed an in depth characterization of F4/80+ cells from liver stromal fraction, using single cell RNA sequencing. Among the differentially expressed genes, several markers of macrophage differentiation (*Egr1*, *Fosb*) were down-regulated in NS, and markers of Kupffer cells (KC) (*Clec4f*, *Vsig4*, *Fabp7*, *Timd4*) and of activated macrophages (*Fcna*, *Cd163*, *Cd51*) were upregulated (Fig. 6D). Interestingly, when clustering cells with similar pattern of gene expression (Fig. 6E), most of those upregulated genes were found in a NS-specific cluster of cells (cluster 6) that also express surface markers of recruited hepatic macrophages (*Clqa*, *Clqc*, *Apoc1*) (Fig. 6F-H). Importantly, we confirmed by RT-qPCR a strong upregulation of those genes in the livers of NS mice compared with WT animals, which reverted to the level of the WT mice upon clodronate treatment (Fig. 6I). Similarly, transplantation of WT bone marrow into NS mice damped down the hepatic expression of this subset of genes, and *vice versa*, although their overexpression in N>N mice was milder, possibly as a consequence of irradiation (Fig. 6J). Taken together, these results reveal expression of hyperactive SHP2 mutant changes hepatic macrophage identity, which should account for the associated inflammation and glucose intolerance profile.

Pharmacological inhibition of SHP2 improves insulin sensitivity and reduces metaflammation in obese/diabetic mice

Given the primary role of hyperactive 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, obese/diabetic mice were taken as a standard model of insulin resistance associated with 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 (46.5 ± 1.2 g vs 44 ± 0.9 g), fasted glycemia (240.1 ± 12.2 mg/dL vs 242.4 ± 12.6 mg/dL) and glucose intolerance profile (AUC: 2002.1 ± 109.8 AU vs 1977.1 ± 83.9 AU) prior to the treatment. Quite strikingly, SHP099 treatment significantly improved glucose tolerance, fasted glycemia, fasted insulinemia and insulin tolerance (Fig. 7A-E). Moreover, this treatment restored insulin-evoked AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation in liver and in muscle (Fig. 7F). Weight gain of SHP099-treated animals was slightly softened, linked with a significant reduction of liver weight (Fig. 7G, H). Importantly, SHP099-treated mice displayed reduced inflammation markers and macrophage infiltrates in metabolic tissues (Fig. 7I, J). SHP099 treatment had a similar effect on HFD-fed mice on a C57Bl6x129Sv mixed genetic background (fig. S5). Interestingly, SHP099 treatment also significantly decreased the hepatic expression of the NS-associated subset of genes (Fig. 7K). These results show that SHP2 inhibition improves glucose tolerance and insulin sensitivity, possibly by reducing the inflammatory load of the metabolic tissues.

Discussion

In this study, we documented for the first time, both in humans and in a mouse model, the metabolic impact of systemic SHP2 hyperactivation, using NS as a model system. In particular, we demonstrated that systemic SHP2 overactivation results in glucose intolerance and insulin resistance, suggesting that SHP2 has a global negative function on glucose metabolism. Consistently, we provided evidences that treatment with a selective SHP2 inhibitor reverses insulin resistance of obese/diabetic mice.

While our results are at odds with several tissue-restricted KO or KI highlighting a protective role of SHP2 towards insulin resistance, with the exception of liver-specific KO [for review, see (26)], they are consistent with previous results showing that a mouse model expressing a hypoactive mutant of SHP2 displays improved glucose tolerance and insulin sensitivity (4). Our data potentially reconciles these apparent discrepancies, as we provide strong evidence for a major role of the hematopoietic cells, notably macrophages, in directly promoting NS-associated inflammation-driven insulin resistance. Hence, the contribution of hematopoietic/myeloid SHP2 to glucose metabolism regulation has never been determined. Therefore, our finding that inflammation has a key role in NS-associated insulin resistance enables assessment of the relative contribution of SHP2 within different tissues, with a more prominent role of SHP2 in the macrophage in promoting insulin resistance.

We report that NS-PTPN11 is associated with reduced adiposity, but without obvious signs of ectopic lipid deposits or lipotoxicity, suggesting that the insulin resistance triggered by systemic expression of hyperactive SHP2 is not secondary to impaired lipid distribution. Such obesity-independent T2D/insulin resistance is somewhat reminiscent of chronic inflammatory conditions, such as autoimmune diseases or infection (21, 22). In accordance with this notion, our data identify an important role of SHP2 in promoting a pro-inflammatory phenotype in macrophages with profound consequences on immuno-metabolism.

Consistently, SHP2 deletion in the myeloid lineage results in an anti-inflammatory profile (M2 polarization), promoting pulmonary fibrosis or emphysema, impairing host immunity during bacterial infection, or triggering a IL10 anti-inflammatory response and protecting against colitis (23-25, 27, 28), although SHP2 reportedly plays anti-inflammatory function (29, 30). Moreover, treatment with SHP2 inhibitors reduced inflammatory response associated to *Haemophilus influenzae* infection, systemic lupus erythematosus or endotoxemia (25, 31, 32) and a compound with anti-inflammatory properties was recently identified as a SHP2 inhibitor (33). However, the selectivity of several of these compounds is debated (34). Furthermore, *in vitro* experiments revealed that expression of hyperactive, NS- or leukemia-associated, SHP2 mutants triggers a M1 phenotype, while expression of a hypoactive mutant of SHP2 is associated with a M2 pattern (23, 35).

A key question raised by these findings is to understand how hyperactive SHP2 promotes such a pro-inflammatory phenotype, and subsequent insulin resistance. As evidenced by *in vitro* studies, hyperactive SHP2 can certainly drive cell autonomous mechanisms, ranging from enhanced M1 polarization to increased sensitivity to pro-inflammatory signals. In addition, the NS-associated pro-inflammatory phenotype can arise from unbalanced monocyte homeostasis, resulting either from monocytosis and/or decreased drainage, two NS features (11, 36-39). Adding further complexity, such monocytes/macrophages dysfunctions can also be triggered by the microenvironment, notably through enhanced chemo-attractive properties (27, 40). Supporting a mixed model, while we demonstrate a key role of macrophages in NS-associated glucose intolerance, the metabolic phenotype is only partly reverted in chimeric mice, implying a contribution of the non-hematopoietic cells. Beside inflammation, since SHP2 can downregulate insulin-evoked PI3K signaling (19, 41), NS-causing SHP2 mutant might directly promote insulin

resistance of metabolic tissues. However, at least in the liver, the macrophage defect certainly prevails, since clodronate treatment restores hepatic insulin signaling.

Our data unravel an unexpected condition of inflammation driven-insulin resistance caused by a single genetic event, uncoupled from standard associated events (*e.g.*, obesity, lipotoxicity), and with relevance in humans, thereby providing an invaluable model to decipher new molecular determinants of immunometabolism regulation. With this perspective, analysis of hepatic macrophages, which strongly contribute to the phenotype, identified a specific subpopulation harboring markers of KC, macrophage activation and infiltrated monocytes/macrophages. Whether and how hyperactive SHP2 curves the gene expression program of KC to a pro-inflammatory pattern or triggers the recruitment of monocytes-derived macrophages that acquire KC identity remains to be determined. Interestingly, SHP2 is known to control the self-renewal potential of different progenitors, notably hematopoietic stem cells, and to favor the myeloid lineage (42, 43). A NS-specific subset of hepatic macrophages overexpresses several markers of the core signature of resident cells (*Ctsd*, *Sepp1*, *Fcgr3*, *Cd164*, *Ctsl*) as well as *bona fide* markers of yolk sac (YS)-derived KC, suggesting an effect of hyperactive SHP2 on the ontogeny of those cells. However, expression of hyperactive SHP2 in yolk sac erythromyeloid progenitors did not alter tissue macrophage population, although neither the impact of this mutant on inflammation nor on metabolism was explored in this model (40). In favor of the second hypothesis, this particular cluster of cells also display markers of recruited hepatic macrophages, and the expression of some of the YS-derived KC markers can also raise during the transition of BM cells to KC (44). Interestingly, it has been recently proposed in the context of myeloproliferation that hyperactive SHP2 in the hematopoietic niche can promote recruitment of inflammatory macrophages, which in turn trigger the proliferation of myeloid progenitors (27). A similar mechanism could occur in metabolic tissues, such as the liver, leading to resident macrophage

hyperproliferation. Regardless of the precise origin of these cells, our data suggest that this specific population could play an important role in inflammation-driven insulin resistance, since improvement of glucose tolerance upon clodronate treatment or BMT comes along with normalized expression of those genes.

The direct link between SHP2 hyperactivation and inflammation driven-insulin resistance also provides important insights into the field of chronic metabolic diseases. In particular, from the fact that acquired hyperactivation of SHP2 restricted to hematopoietic cells in N>W BMT is sufficient to trigger insulin resistance, we inferred that obesity-associated insulin resistance can result from SHP2 hyperactivation in macrophages, through mechanisms that remain to be established. Thus, our data reveals that systemic inhibition of SHP2 can efficiently improve insulin sensitivity in preclinical models of T2D, possibly in part by reducing metaflammation. Comfortingly, the insulin-sensitizing effect of SHP099 was similar or greater than metformin or thiazolidinedione (TZD), although differences in preclinical models, administration route and treatment duration are as many variables making the comparison difficult (45, 46), suggesting that SHP2 inhibition could represent a therapeutic benefit. Hence, several reports have recently documented the safety of SHP099, at least in acute or short-term treatments (47-51). Interestingly, we observed some of the genes found in the NS-specific cluster of macrophages were also upregulated in hepatic macrophages of obese/diabetic mice, in accordance with previous results (52), and that treatment with SHP099 normalized their expression while alleviating the insulin resistance of those mice. Altogether, these data suggest that in a context of metabolic disorder, SHP2 could trigger metaflammation, possibly through the mobilization of this particular macrophage subpopulation, and subsequent insulin resistance.

Finally, the characterization of this metabolic phenotype in NS-PTPN11 also raises important questions regarding the pathophysiology of NS and related syndromes. NS is a

genetically heterogeneous disease, and is closely related to other disorders, the so-called RASopathies (*e.g.*, NS-ML, Costello syndrome), that are caused by mutations hitting genes encoding actors or regulators of the RAS/ERK pathway (3). Since hyperactive (NS-associated), and hypoactive (NS-ML-associated), SHP2 mutations seem to drive mirror glycemic phenotypes (4), one may argue that the glucose intolerance could represent a specific feature of *PTPN11*-associated NS. However, given the effect, albeit transient, of MEK inhibitor, one cannot exclude that glucose intolerance will be found in other RASopathies. Indeed, preliminary OGTT results on few non-*PTPN11* patients with RASopathies revealed a similar glucose intolerance profile (unpublished data). While additional experiments are required to address these questions, the identification of this metabolic phenotype may justify specific follow up, at least in NS-*PTPN11* patients, since the glucose intolerance can evolve to diabetes and participate, with other metabolic defects, to the worsening of some traits of the disease, notably cardiopathies.

The present study has several limitations. First, the cohort of patients, while being substantial considering that NS is a rare condition, remains too restricted to assess gender/age specificities or perform genotype /phenotype correlations. Whether NS patients are at risk of developing T2D in adulthood also remains to be established. Then, while our study in the NS mouse model provides strong evidences for a role of SHP2 hyperactivation in macrophage in triggering insulin resistance (BMT experiments, clodronate treatment, specific macrophage defects), we cannot rule out that an autonomous defect in parenchymal cells of metabolic tissues also contributes to insulin resistance. Moreover, regarding the parallel with insulin resistance in chronic metabolic diseases, although we show that SHP2 inhibition efficiently alleviates insulin resistance in diet-induced obesity model, whether and how SHP2 is hyperactivated in the macrophages of obese/diabetic mouse model is unknown. Last, the successful translation to human pathophysiology will require to document in preclinical

models potential adverse effects of chronic SHP099 administration and benchmark such treatment to other clinically established anti-diabetic agents.

Materials and Methods

Study design

This study was designed to determine whether and how SHP2 hyperactivation drives an insulin resistance phenotype, using NS, a genetic disease caused by SHP2 hyperactivation, as a model system. This objective was addressed by determining the metabolic profile of NS patients carrying *PTPN11* mutations and of a well-established NS mouse model and by identifying the cause of insulin resistance. From the obtained data, we hypothesized that NS-associated insulin resistance could be driven by sustained inflammation of the metabolic tissues and macrophage defects. To test this, we performed interventional experiments in the NS mouse model (bone marrow transplantation, macrophage depletion) and in depth analysis of resident macrophages. From these results, we hypothesized that similar mechanisms may occur in the context of DT2, and that SHP2 inhibition may alleviate insulin resistance in obese/diabetic mice. Our objective was thus to evaluate the preclinical efficacy of SHP099, a small bioavailable specific inhibitor of SHP2.

Human data included metabolic parameters and auxological data from NS patients, with genetic confirmation, who were age- and gender-matched with normal weighted, obese or lean subjects. For the metabolic phenotyping of NS mice and for interventional experiments, animal sample sizes were calculated on the basis of previous animal studies (4, 53). Control and NS mice from the same litter were randomly selected for experiments. For the SHP099 study, a pilot experiment (5 animals per group) was performed to assess the toxicity of SHP099 chronic treatment. HFD mice were then randomly assigned to SHP099 or vehicle groups. Growth retardation of NS mice prevented blinding to the genotypes during mouse handling, but investigators were blind to genotypes at tissue/cell analysis and histological assessment, and to treatment at tissue collection, cell analysis and metabolic assays. All data were included, except if predefined endpoints were reached (e.g., weight loss >20%,

persistent signs of pain). Experimental replicates were variable for each experiment and are detailed in the figure legend.

Patients: All molecular analyses were performed at the Department of Genetics of Robert-Debré Hospital (H.Cavé, A. Verloes), Paris, France. The data collection and functional exploration for NS patients were performed in the Endocrinology, Bone diseases and Genetics unit from the Children Hospital of Toulouse, France (table S1). 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 (54). 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 (55). 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 (56). 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 and QUICKI index were calculated using the following formula:

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

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

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). The mouse model carrying the point mutation D61G on SHP2 (referred to as SHP2^{D61G/+} or NS mouse) has been previously described (11). 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 following manufacturer's instructions. For oral glucose tolerance test or insulin tolerance test, after 6 hours 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). Plasma leptin (Quantikine; R&D Systems) and insulin (Mercodia) were determined by ELISA in the fasted state or at indicated times. Il6 and TNF α were measured by ELISA (Quantikine; R&D Systems) or Luminex (Milliplex; Merck Millipore). 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 mg/kg/d PD0325901 or vehicle as a control for 1 month. For treatment with SHP099 (Selleckchem), animals were high fat fed (HFD 60%, Research diet) during 12 weeks with daily gavage with 50 mg/kg/d SHP099 or vehicle as a control during the 2 last 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 tibias 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 (ClodronateLiposomes) (100 mg/kg) every three days for 10 days. At day 10, glucose tolerance test was performed.

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 cells were harvested on day 7. For LPS stimulation, cells were overnight fasted, then treated for indicated time with LPS (1 ng/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 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 600 g for 10 min, stromal cells were separated in 30% percoll and pellets 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.

Single cell RNA sequencing: F4/80+ 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 150-8-150 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). This gene-expression matrix was further filtered in Seurat 2.0 and cells with less than 100 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. In total 284,897,143 reads were mapped and 1856 cells were detected with a sequencing saturation of 92.8%. After normalization, these cells were clustered using the Seurat workflow based on dimensionality reduction by a PCA of the 2976 most variable genes. The first 10 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.

Statistical analysis: For analysis of patient data, NS patients were matched with three lean (male and female: BMI Z-score<-1), normal weight (male: -1< BMI Z-score <1.3, female: -1<Z-BMI<1.2) or obese (male: BMI Z-score >2.288, female: BMI Z-score >2.192) patients from the OBE cohort. Matching was performed on Gender, using exact matching and on Age, using the “nearest neighbours” method from the R package “MatchIt”. Two by two comparisons were performed using Student’s t-Test. Longitudinal analyses were performed using a linear mixed model (R package “lmer”) approach to account for the correlation

between repeated measures over time. Time was included as an orthogonal polynomials of degree two and Age, Z-BMI, Sex and patient's group were included as fixed effect covariates. Intercept was included as fixed and random effect. All mouse data were analysed with Graphpad Prism and 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 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Supplementary Materials

Supplementary Materials and Methods

Fig. S1: Glucose metabolic parameters of NS mice.

Fig. S2: Metabolic parameters of NS mice

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

Fig. S4: MEK inhibition only transiently improves glucose intolerance without effect on metaflammation

Fig. S5: Metabolic parameters of obese/diabetic B6/129 mice before and after SHP099 treatment.

Table S1: Genetic confirmation of NS patients.

Table S2: Metabolic parameters of NS patients and lean, normal weight and obese individuals.

Table S3: Primers sequence.

References

1. NCD-RisC, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* **387**, 1513-1530 (2016).
2. Y. Zheng, S. H. Ley, F. B. Hu, Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature reviews* **14**, 88-98 (2018).
3. M. Tajan, R. Paccoud, S. Branka, T. Edouard, A. Yart, The RASopathy Family: Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway. *Endocrine reviews* **39**, 676-700 (2018).
4. M. Tajan, A. Batut, T. Cadoudal, S. Deleruyelle, S. Le Gonidec, C. Saint Laurent, M. Vomscheid, E. Wanecq, K. Treguer, A. De Rocca Serra-Nédélec, C. Vinel, M.-A. Marques, J. Pozzo, O. Kunduzova, J.-P. Salles, M. Tauber, P. Raynal, H. Cavé, T. Edouard, P. Valet, A. Yart, 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 (2014).
5. M. H. Lima, M. Ueno, A. C. Thirone, E. M. Rocha, C. R. Carvalho, M. J. Saad, Regulation of IRS-1/SHP2 interaction and AKT phosphorylation in animal models of insulin resistance. *Endocrine* **18**, 1-12 (2002).
6. F. Ahmad, B. J. Goldstein, Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *The American journal of physiology* **268**, E932-940 (1995).
7. J. A. Bonini, J. Colca, C. Hofmann, Altered expression of insulin signaling components in streptozotocin-treated rats. *Biochemical and biophysical research communications* **212**, 933-938 (1995).

8. A. Bettaieb, K. Matsuo, I. Matsuo, N. Nagata, S. Chahed, S. Liu, F. G. Haj, Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism: clinical and experimental* **286**, 9225-9235 (2011).
9. N. Nagata, K. Matsuo, A. Bettaieb, J. Bakke, I. Matsuo, J. Graham, Y. Xi, S. Liu, A. Tomilov, N. Tomilova, S. Gray, D. Y. Jung, J. J. Ramsey, J. K. Kim, G. Cortopassi, P. J. Havel, F. G. Haj, Hepatic SRC homology phosphatase 2 regulates energy balance in mice. *Endocrinology* **153**, 3158-3169 (2012).
10. A. T. Kraja, D. I. Chasman, K. E. North, A. P. Reiner, L. R. Yanek, T. O. Kilpelainen, J. A. Smith, A. Dehghan, J. Dupuis, A. D. Johnson, M. F. Feitosa, F. Tekola-Ayele, A. Y. Chu, I. M. Nolte, Z. Dastani, A. Morris, S. A. Pendergrass, Y. V. Sun, M. D. Ritchie, A. Vaez, H. Lin, S. Ligthart, L. Marullo, R. Rohde, Y. Shao, M. A. Ziegler, H. K. Im, R. B. Schnabel, T. Jorgensen, M. E. Jorgensen, T. Hansen, O. Pedersen, R. P. Stolk, H. Snieder, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, O. H. Franco, M. A. Ikram, J. B. Richards, C. Rotimi, J. G. Wilson, L. Lange, S. K. Ganesh, M. Nalls, L. J. Rasmussen-Torvik, J. S. Pankow, J. Coresh, W. Tang, W. H. Linda Kao, E. Boerwinkle, A. C. Morrison, P. M. Ridker, D. M. Becker, J. I. Rotter, S. L. Kardina, R. J. Loos, M. G. Larson, Y. H. Hsu, M. A. Province, R. Tracy, B. F. Voight, D. Vaidya, C. J. O'Donnell, E. J. Benjamin, B. Z. Alizadeh, I. Prokopenko, J. B. Meigs, I. B. Borecki, Pleiotropic genes for metabolic syndrome and inflammation. *Molecular genetics and metabolism* **112**, 317-338 (2014).
11. T. Araki, M. G. Mohi, F. A. Ismat, R. T. Bronson, I. R. Williams, J. L. Kutok, W. Yang, L. I. Pao, D. G. Gilliland, J. A. Epstein, B. G. Neel, Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nature medicine* **10**, 849-857 (2004).

12. C. Cessans, V. Ehlinger, C. Arnaud, A. Yart, Y. Capri, P. Barat, B. Cammas, D. Lacombe, R. Coutant, A. David, S. Baron, J. Weill, B. Leheup, M. Nicolino, J. P. Salles, A. Verloes, M. Tauber, H. Cave, T. Edouard, Growth patterns of patients with Noonan syndrome: correlation with age and genotype. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **174**, 641-650 (2016).
13. T. Araki, G. Chan, S. Newbigging, L. Morikawa, R. T. Bronson, B. G. Neel, 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 (2009).
14. A. De Rocca Serra-Nedelec, T. Edouard, K. Treguer, M. Tajan, T. Araki, M. Dance, M. Mus, A. Montagner, M. Tauber, J. P. Salles, P. Valet, B. G. Neel, P. Raynal, A. Yart, 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 (2012).
15. T. Nakamura, J. Gulick, R. Pratt, J. Robbins, 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 (2009).
16. T. Nakamura, M. Colbert, M. Krenz, J. D. Molkentin, H. S. Hahn, G. W. Dorn, 2nd, J. Robbins, Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *J. Clin. Invest.* **117**, 2123-2132 (2007).
17. Y. S. Lee, D. Ehninger, M. Zhou, J. Y. Oh, M. Kang, C. Kwak, H. H. Ryu, D. Butz, T. Araki, Y. Cai, J. Balaji, Y. Sano, C. I. Nam, H. K. Kim, B. K. Kaang, C. Burger, B. G. Neel, A. J. Silva, Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nature neuroscience* **17**, 1736-1743 (2014).

18. M. Tajan, J. Pernin-Grandjean, N. Beton, I. Gennero, F. Capilla, B. G. Neel, T. Araki, P. Valet, M. Tauber, J. P. Salles, A. Yart, T. Edouard, Noonan syndrome-causing SHP2 mutants impair ERK-dependent chondrocyte differentiation during endochondral bone growth. *Human molecular genetics* **27**, 2276-2289 (2018).
19. K. Matsuo, M. Delibegovic, I. Matsuo, N. Nagata, S. Liu, A. Bettaieb, Y. Xi, K. Araki, W. Yang, B. B. Kahn, B. G. Neel, F. G. Haj, Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J. Biol. Chem.* **285**, 39750-39758 (2010).
20. F. Princen, E. Bard, F. Sheikh, S. S. Zhang, J. Wang, W. M. Zago, D. Wu, R. Diaz Trelles, B. Bailly-Maitre, C. R. Kahn, Y. Chen, J. C. Reed, G. G. Tong, M. Mercola, J. Chen, G. S. Feng, Deletion of Shp2 Tyrosine Phosphatase in Muscle Leads to Dilated Cardiomyopathy, Insulin Resistance and Premature Death. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 378-388 (2009).
21. K. E. Wellen, G. S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1111-1119 (2005).
22. G. Bahtiyar, J. J. Shin, A. Aytaman, J. R. Sowers, S. I. McFarlane, Association of diabetes and hepatitis C infection: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Current diabetes reports* **4**, 194-198 (2004).
23. B. Tao, W. Jin, J. Xu, Z. Liang, J. Yao, Y. Zhang, K. Wang, H. Cheng, X. Zhang, Y. Ke, Myeloid-specific disruption of tyrosine phosphatase Shp2 promotes alternative activation of macrophages and predisposes mice to pulmonary fibrosis. *J Immunol* **193**, 2801-2811 (2014).
24. J. Xu, B. Tao, X. Guo, S. Zhou, Y. Li, Y. Zhang, Z. Zhou, H. Cheng, X. Zhang, Y. Ke, 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 (2017).
25. L. Zhao, J. Xia, T. Li, H. Zhou, W. Ouyang, Z. Hong, Y. Ke, J. Qian, F. Xu, Shp2 Deficiency Impairs the Inflammatory Response Against *Haemophilus influenzae* by Regulating Macrophage Polarization. *The Journal of infectious diseases* **214**, 625-633 (2016).
 26. M. Tajan, A. de Rocca Serra, P. Valet, T. Edouard, A. Yart, SHP2 sails from physiology to pathology. *European journal of medical genetics* **58**, 509-525 (2015).
 27. L. Dong, W. M. Yu, H. Zheng, M. L. Loh, S. T. Bunting, M. Pauly, G. Huang, M. Zhou, H. E. Broxmeyer, D. T. Scadden, C. K. Qu, Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature* **539**, 304-308 (2016).
 28. P. Xiao, H. Zhang, Y. Zhang, M. Zheng, R. Liu, Y. Zhao, X. Zhang, H. Cheng, Q. Cao, Y. Ke, Phosphatase Shp2 exacerbates intestinal inflammation by disrupting macrophage responsiveness to interleukin-10. *The Journal of experimental medicine* **216**, 337-349 (2019).
 29. H. An, W. Zhao, J. Hou, Y. Zhang, Y. Xie, Y. Zheng, H. Xu, C. Qian, J. Zhou, Y. Yu, S. Liu, G. Feng, X. Cao, SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* **25**, 919-928 (2006).
 30. W. Guo, W. Liu, Z. Chen, Y. Gu, S. Peng, L. Shen, Y. Shen, X. Wang, G. S. Feng, Y. Sun, Q. Xu, Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation via ANT1-dependent mitochondrial homeostasis. *Nature communications* **8**, 2168 (2017).

31. A. Y. Hsu, T. Gurol, T. J. P. Sobreira, S. Zhang, N. Moore, C. Cai, Z. Y. Zhang, Q. Deng, Development and Characterization of an Endotoxemia Model in Zebra Fish. *Frontiers in immunology* **9**, 607 (2018).
32. J. Wang, M. Mizui, L. F. Zeng, R. Bronson, M. Finnell, C. Terhorst, V. C. Kyttaris, G. C. Tsokos, Z. Y. Zhang, M. I. Kontaridis, Inhibition of SHP2 ameliorates the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation* **126**, 2077-2092 (2016).
33. C. Chen, F. Liang, B. Chen, Z. Sun, T. Xue, R. Yang, D. Luo, Identification of demethylcisterol A3 as a selective inhibitor of protein tyrosine phosphatase Shp2. *European journal of pharmacology* **795**, 124-133 (2017).
34. R. Tsutsumi, H. Ran, B. G. Neel, Off-target inhibition by active site-targeting SHP2 inhibitors. *FEBS open bio* **8**, 1405-1411 (2018).
35. X. J. Li, C. B. Goodwin, S. C. Nabinger, B. M. Richine, Z. Yang, H. Hanenberg, H. Ohnishi, T. Matozaki, G. S. Feng, R. J. Chan, Protein-tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates macrophage oxidative burst. *The Journal of biological chemistry* **290**, 3894-3909 (2015).
36. G. Chan, D. Kalaitzidis, T. Usenko, J. L. Kutok, W. Yang, M. G. Mohi, B. G. Neel, Leukemogenic Ptpn11 causes fatal myeloproliferative disorder via cell-autonomous effects on multiple stages of hematopoiesis. *Blood* **113**, 4414-4424 (2009).
37. D. Xu, S. Wang, W. M. Yu, G. Chan, T. Araki, K. D. Bunting, B. G. Neel, C. K. Qu, 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 (2010).
38. D. Xu, X. Liu, W. M. Yu, H. J. Meyerson, C. Guo, S. L. Gerson, C. K. Qu, 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 (2011).
39. S. Joyce, K. Gordon, G. Brice, P. Ostergaard, R. Nagaraja, J. Short, S. Moore, P. Mortimer, S. Mansour, The lymphatic phenotype in Noonan and Cardiofaciocutaneous syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* **24**, 690-696 (2016).
 40. S. P. Tarnawsky, M. Yoshimoto, L. Deng, R. J. Chan, M. C. Yoder, Yolk sac erythromyeloid progenitors expressing gain of function PTPN11 have functional features of JMML but are not sufficient to cause disease in mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **246**, 1001-1014 (2017).
 41. S. Q. Zhang, W. G. Tsiaras, T. Araki, G. Wen, L. Minichiello, R. Klein, B. G. Neel, Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4062-4072 (2002).
 42. G. Chan, L. S. Cheung, W. Yang, M. Milyavsky, A. D. Sanders, S. Gu, W. X. Hong, A. X. Liu, X. Wang, M. Barbara, T. Sharma, J. Gavin, J. L. Kutok, N. N. Iscove, K. M. Shannon, J. E. Dick, B. G. Neel, B. S. Braun, Essential role for Ptpn11 in survival of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**, 4253-4261 (2011).
 43. H. H. Zhu, K. Ji, N. Alderson, Z. He, S. Li, W. Liu, D. E. Zhang, L. Li, G. S. Feng, Kit-Shp2-Kit signaling acts to maintain a functional hematopoietic stem and progenitor cell pool. *Blood* **117**, 5350-5361 (2011).
 44. L. Beattie, A. Sawtell, J. Mann, T. C. M. Frame, B. Teal, F. de Labastida Rivera, N. Brown, K. Walwyn-Brown, J. W. J. Moore, S. MacDonald, E. K. Lim, J. E. Dalton, C. R. Engwerda, K. P. MacDonald, P. M. Kaye, Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *Journal of hepatology* **65**, 758-768 (2016).

45. S. Choung, K. H. Joung, B. R. You, S. K. Park, H. J. Kim, B. J. Ku, Treatment with Lobeglitazone Attenuates Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice. *PPAR research* **2018**, 4292509 (2018).
46. S. L. Woo, H. Xu, H. Li, Y. Zhao, X. Hu, J. Zhao, X. Guo, T. Guo, R. Botchlett, T. Qi, Y. Pei, J. Zheng, Y. Xu, X. An, L. Chen, L. Chen, Q. Li, X. Xiao, Y. Huo, C. Wu, Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PloS one* **9**, e91111 (2014).
47. Y. N. Chen, M. J. LaMarche, H. M. Chan, P. Fekkes, J. Garcia-Fortanet, M. G. Acker, B. Antonakos, C. H. Chen, Z. Chen, V. G. Cooke, J. R. Dobson, Z. Deng, F. Fei, B. Firestone, M. Fodor, C. Fridrich, H. Gao, D. Grunenfelder, H. X. Hao, J. Jacob, S. Ho, K. Hsiao, Z. B. Kang, R. Karki, M. Kato, J. Larrow, L. R. La Bonte, F. Lenoir, G. Liu, S. Liu, D. Majumdar, M. J. Meyer, M. Palermo, L. Perez, M. Pu, E. Price, C. Quinn, S. Shakya, M. D. Shultz, J. Slisz, K. Venkatesan, P. Wang, M. Warmuth, S. Williams, G. Yang, J. Yuan, J. H. Zhang, P. Zhu, T. Ramsey, N. J. Keen, W. R. Sellers, T. Stams, P. D. Fortin, Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* **535**, 148-152 (2016).
48. L. Dardaei, H. Q. Wang, M. Singh, P. Fordjour, K. X. Shaw, S. Yoda, G. Kerr, K. Yu, J. Liang, Y. Cao, Y. Chen, M. S. Lawrence, A. Langenbucher, J. F. Gainor, L. Friboulet, I. Dagogo-Jack, D. T. Myers, E. Labrot, D. Ruddy, M. Parks, D. Lee, R. H. DiCecca, S. Moody, H. Hao, M. Mohseni, M. LaMarche, J. Williams, K. Hoffmaster, G. Caponigro, A. T. Shaw, A. N. Hata, C. H. Benes, F. Li, J. A. Engelman, SHP2 inhibition restores sensitivity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors. *Nature medicine* **24**, 512-517 (2018).
49. J. Garcia Fortanet, C. H. Chen, Y. N. Chen, Z. Chen, Z. Deng, B. Firestone, P. Fekkes, M. Fodor, P. D. Fortin, C. Fridrich, D. Grunenfelder, S. Ho, Z. B. Kang, R. Karki, M.

- Kato, N. Keen, L. R. LaBonte, J. Larrow, F. Lenoir, G. Liu, S. Liu, F. Lombardo, D. Majumdar, M. J. Meyer, M. Palermo, L. Perez, M. Pu, T. Ramsey, W. R. Sellers, M. D. Shultz, T. Stams, C. Towler, P. Wang, S. L. Williams, J. H. Zhang, M. J. LaMarche, Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* **59**, 7773-7782 (2016).
50. E. Kostallari, P. Hirsova, A. Prasnicka, V. K. Verma, U. Yaqoob, N. Wongjarupong, L. R. Roberts, V. H. Shah, Hepatic stellate cell-derived PDGFRalpha-enriched extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2. *Hepatology* **68**, 333-348 (2018).
51. X. Sun, Y. Ren, S. Gunawan, P. Teng, Z. Chen, H. R. Lawrence, J. Cai, N. J. Lawrence, J. Wu, Selective inhibition of leukemia-associated SHP2(E69K) mutant by the allosteric SHP2 inhibitor SHP099. *Leukemia* **32**, 1246-1249 (2018).
52. H. Morinaga, R. Mayoral, J. Heinrichsdorff, O. Osborn, N. Franck, N. Hah, E. Walenta, G. Bandyopadhyay, A. R. Pessentheiner, T. J. Chi, H. Chung, J. G. Bogner-Strauss, R. M. Evans, J. M. Olefsky, D. Y. Oh, Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes* **64**, 1120-1130 (2015).
53. P. Li, S. Liu, M. Lu, G. Bandyopadhyay, D. Oh, T. Imamura, A. M. F. Johnson, D. Sears, Z. Shen, B. Cui, L. Kong, S. Hou, X. Liang, S. Iovino, S. M. Watkins, W. Ying, O. Osborn, J. Wollam, M. Brenner, J. M. Olefsky, Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance. *Cell* **167**, 973-984 e912 (2016).
54. A. Morandi, A. Bonnefond, S. Lobbens, L. Yengo, E. Miraglia Del Giudice, A. Grandone, C. Levy-Marchal, J. Weill, C. Maffei, P. Froguel, 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 (2016).
55. M. F. Rolland-Cachera, T. J. Cole, M. Sempe, J. Tichet, C. Rossignol, A. Charraud, Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *European journal of clinical nutrition* **45**, 13-21 (1991).
56. I. M. van der Sluis, M. A. de Ridder, A. M. Boot, E. P. Krenning, S. M. de Muinck Keizer-Schrama, 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 (2002).
57. C. Dray, C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buleon, P. D. Cani, C. Attane, C. Guigne, C. Carpene, R. Burcelin, I. Castan-Laurell, P. Valet, Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell metabolism* **8**, 437-445 (2008).
58. S. Kamohara, R. Burcelin, J. L. Halaas, J. M. Friedman, M. J. Charron, Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**, 374-377 (1997).

Acknowledgments: We thank the NS patients and their families who participated in this study. We thank all past and present members of the Adipolab for technical and scientific support, in particular M. Vomscheid and N. Cottura. We are thankful to E. Gautier and R. Ricci for precious advices. 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. **Funding:** 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. RP is supported by a scholarship from Région Midi-Pyrénées-INSERM n°15050341. **Author contributions :** Conceptualization, RP, TE, M Tajan, JPP and AY; Methodology, RP, JPP and AY; Validation, TE, JPP and AY; Formal Analysis, RP and MC; Investigation, RP, AD, OP, MB, JC, JP, SB, SD, SLG and NB; Resources, TE, JPS, M Tauber, JW, PF, BGN, TA, CH, RB and PV ; Writing-Original Draft, RP and AY; Writing-Review and editing, TE, M Tajan, MC, BGN, TA, RB, IC, CD and JPP; Supervision, JPP and AY; Funding Acquisition, TE, PV, JPP and AY. **Competing interests:** The authors declare no competing interests.

Figures

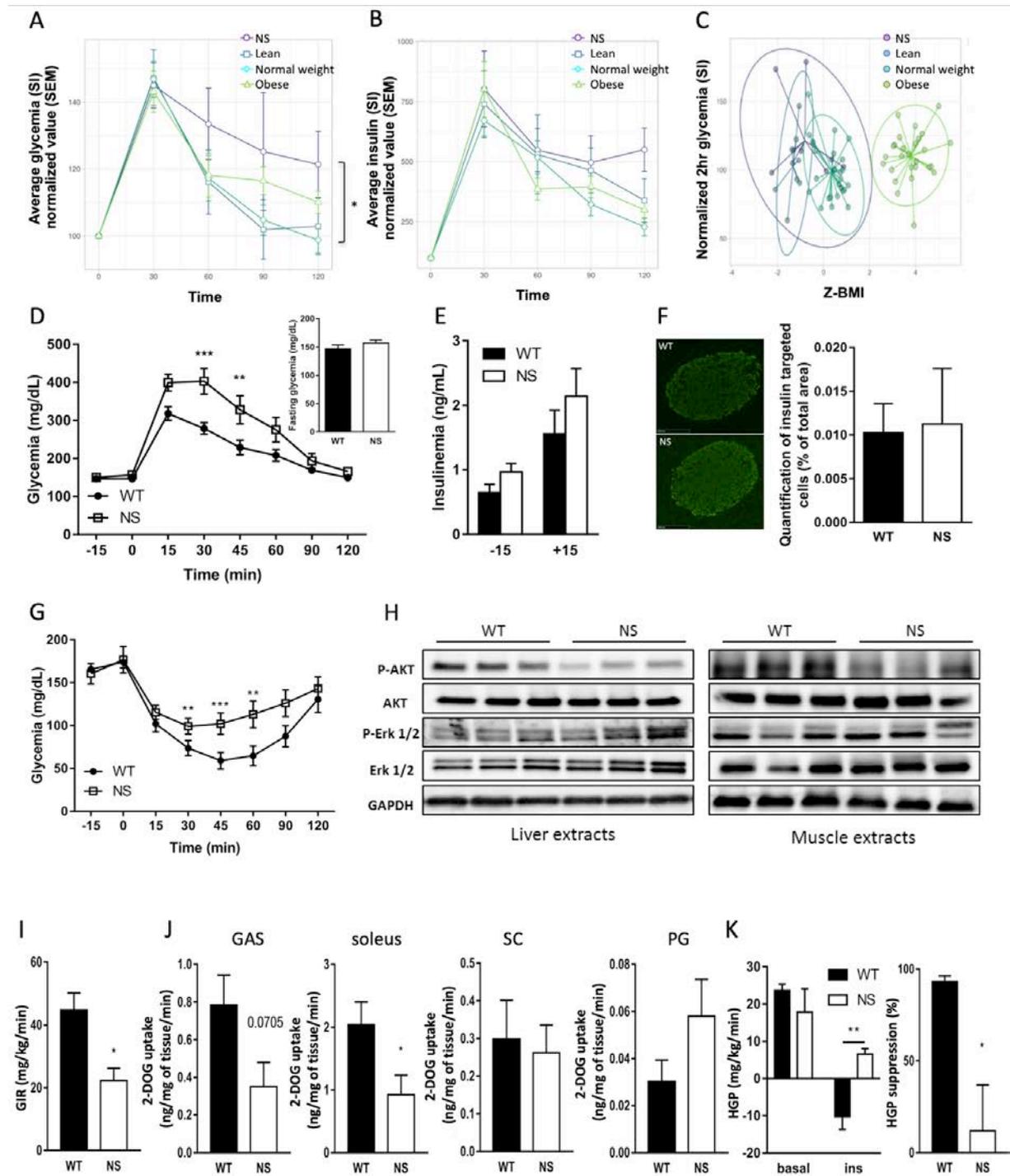


Figure 1: Systemic SHP2 hyperactivation is associated with glucose intolerance and insulin resistance

Fig. 1: Systemic SHP2 hyperactivation is associated with glucose intolerance and insulin resistance

(A-C) NS-PTPN11 patients and age and gender-matched normal weight, obese and lean 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= 9-27 in each group, mixed model, *p<0.05 for NS vs normal weight.

(D-G) Phenotyping of NS, SHP2^{D61G/+} mice. (D) OGTT on 10-12 week-old WT and NS animals. (E) Fasting (-15) and Glucose-induced (+15) insulinemia during OGTT. (F) Insulin immunofluorescence on pancreas section. (G) ITT on 10-12 weeks WT and NS animals.

(H) Immunoblotting on hepatic and muscle tissue after insulin injection (10 min) in 6 hr fasted WT and NS mice (20 weeks old).

Values are expressed as mean \pm SEM, n=9-12 in each group, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 2-way ANOVA with Bonferroni post test or unpaired Student t-test when necessary.

(I-K) 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 muscles, and in subcutaneous (SC) and perigonadal (PG) adipose tissues (J). Whole body glucose turnover was determined in basal and hyperinsulinemic euglycemic states and hepatic glucose production was calculated (K). Values are expressed as mean \pm SEM, n=3-8 in each group, *p<0.05, **p<0.01, unpaired Student t-test.

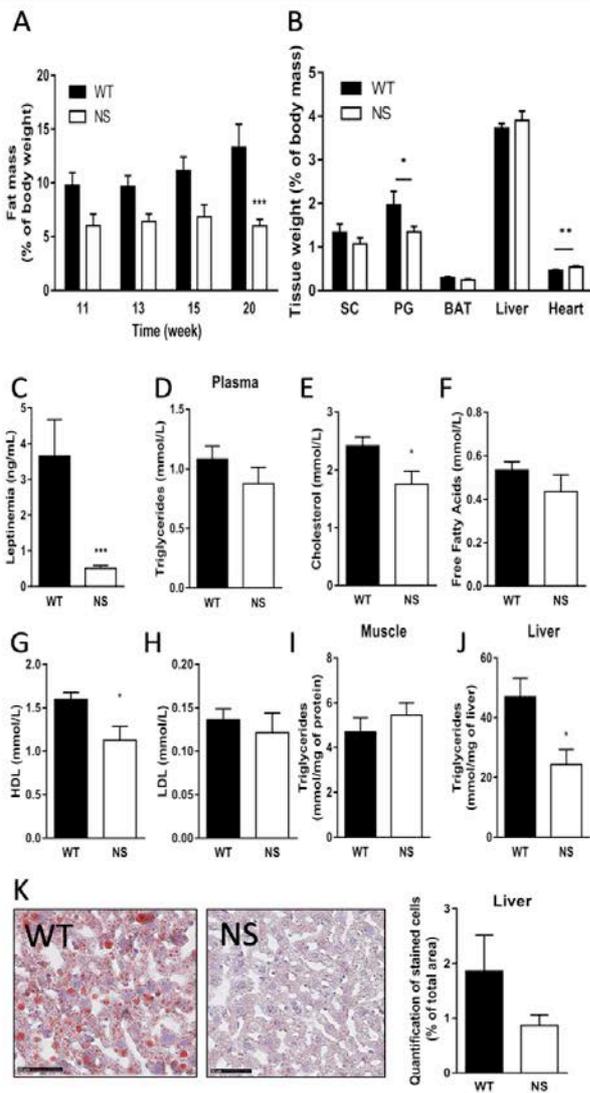


Figure 2: Hyperactive SHP2-associated insulin resistance is not related to ectopic lipid deposits

Fig. 2: Hyperactive SHP2 -associated insulin resistance is not related ectopic lipid deposits

(A) The proportion of fat mass of WT and NS mice has been measured with EchoMRI at different ages.

(B-G) Overnight fasted animals (20 weeks old) were euthanized and the following analyses were performed.

(B) Weight of different tissues.

(C) Leptinemia determined by ELISA.

(D-H) Lipid plasmatic profile: (D) Triglycerides, (E) Cholesterol, (F) Free fatty acids, (G) HDL and (H) LDL were determined.

(I,J) Triglycerides quantification (I) in muscle, and (J) liver.

(K) Red oil O staining on liver sections and quantification.

Values are expressed as mean \pm SEM n= 8-12 in each group *p<005, **p<001, ***p<0.001, unpaired Student t-test or Mann & Whitney test when variances were unequal.

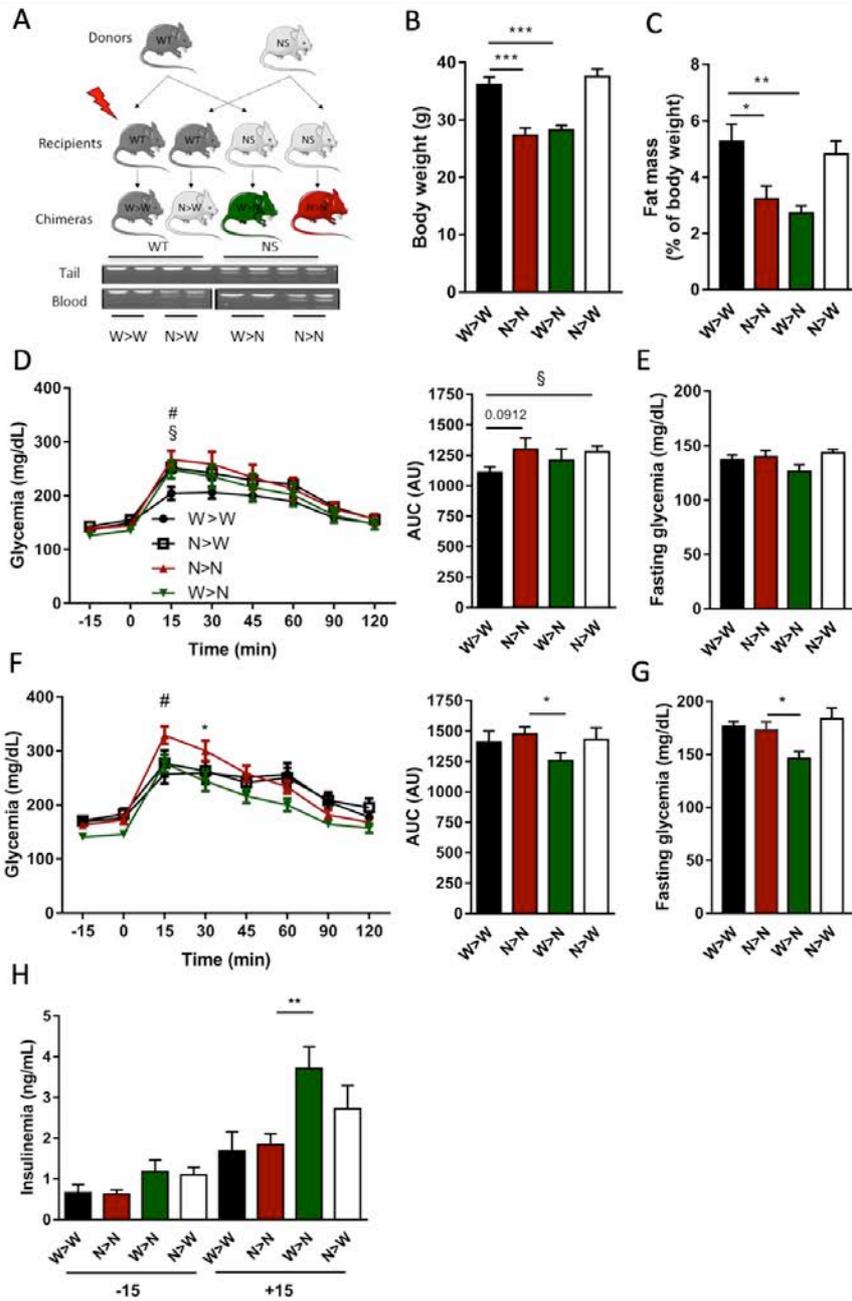


Figure 3: The glucose intolerance is transferred with hematopoietic cells.

Fig. 3: The glucose intolerance 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.

Representative genotyping using DNA from blood or tail as templates.

(B, C) Body composition: (B) Body weight and (C) fat mass of the W>W, N>N, W>N and N>W mice at the end of the procedure.

(D, E) 5 weeks after BMT, (D) OGTT and (E) fasting glycemia were determined.

(F-H) 17 weeks after BMT, (F) OGTT, (G) fasting glycemia and (H) insulinemia were determined.

Values are expressed as mean \pm SEM, n=8-14 in each group, *p<0.05, **p<0.01 (N>N vs W>N), #p<0.05 (W>W vs N>N), §p<0.05 (W>W vs N>W) 2-way ANOVA with Bonferroni post test or unpaired Student t-test when necessary.

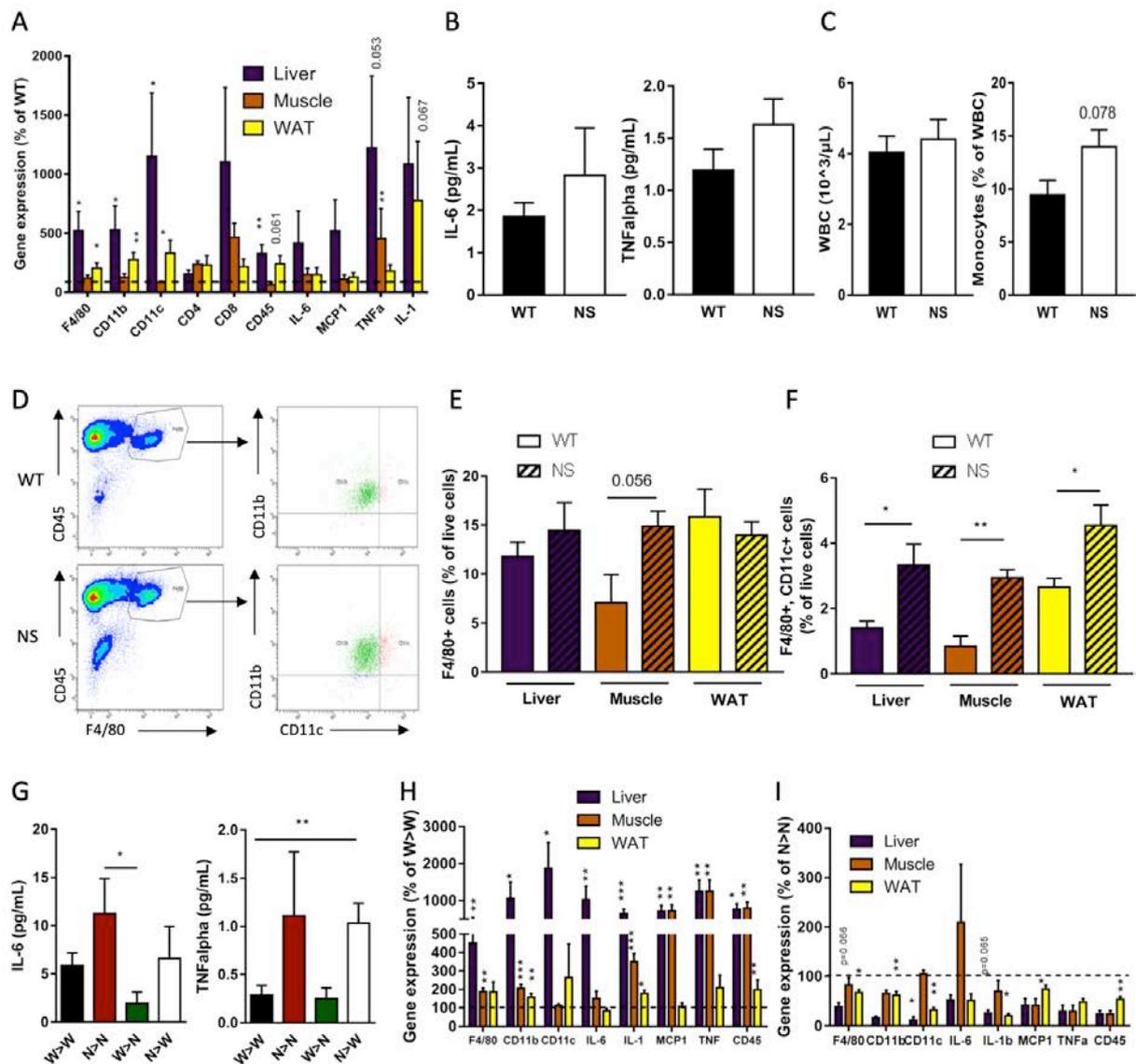


Figure 4: SHP2^{D61G/+} mice display a metaflammation phenotype

Fig. 4: SHP2^{D61G/+} mice display a metaflammation phenotype

(A) Expression of inflammation markers was quantified by RT-qPCR on liver, white adipose tissue and muscle from WT and NS mice (20 weeks old).

(B) Il-6 and TNFalpha plasma levels were determined by ELISA.

(C) White blood cells and monocytes were quantified by a blood analyzer.

(D) Representative pattern of flow cytometry analysis and quantification of F4/80+ and CD11c+ cells (defined as viable CD45+, F4/80+ and CD11b+) from WAT-derived stromal cells from WT and NS mice.

(E) Quantification of F4/80+ and (F) CD11c+ cells from liver, muscle and WAT from WT and NS animals

(G-I) Inflammatory profile in mice from BMT protocol. (G) IL-6 and TNFalpha plasma levels were measured by Luminex. Expression of inflammation markers was quantified by RT-qPCR on liver, WAT and muscle from (H) N>W and (I) W>N chimeric mice.

Values are expressed as mean \pm SEM n=7-10 in each group, *p<0.05, **p<0.01, unpaired Student t-test.

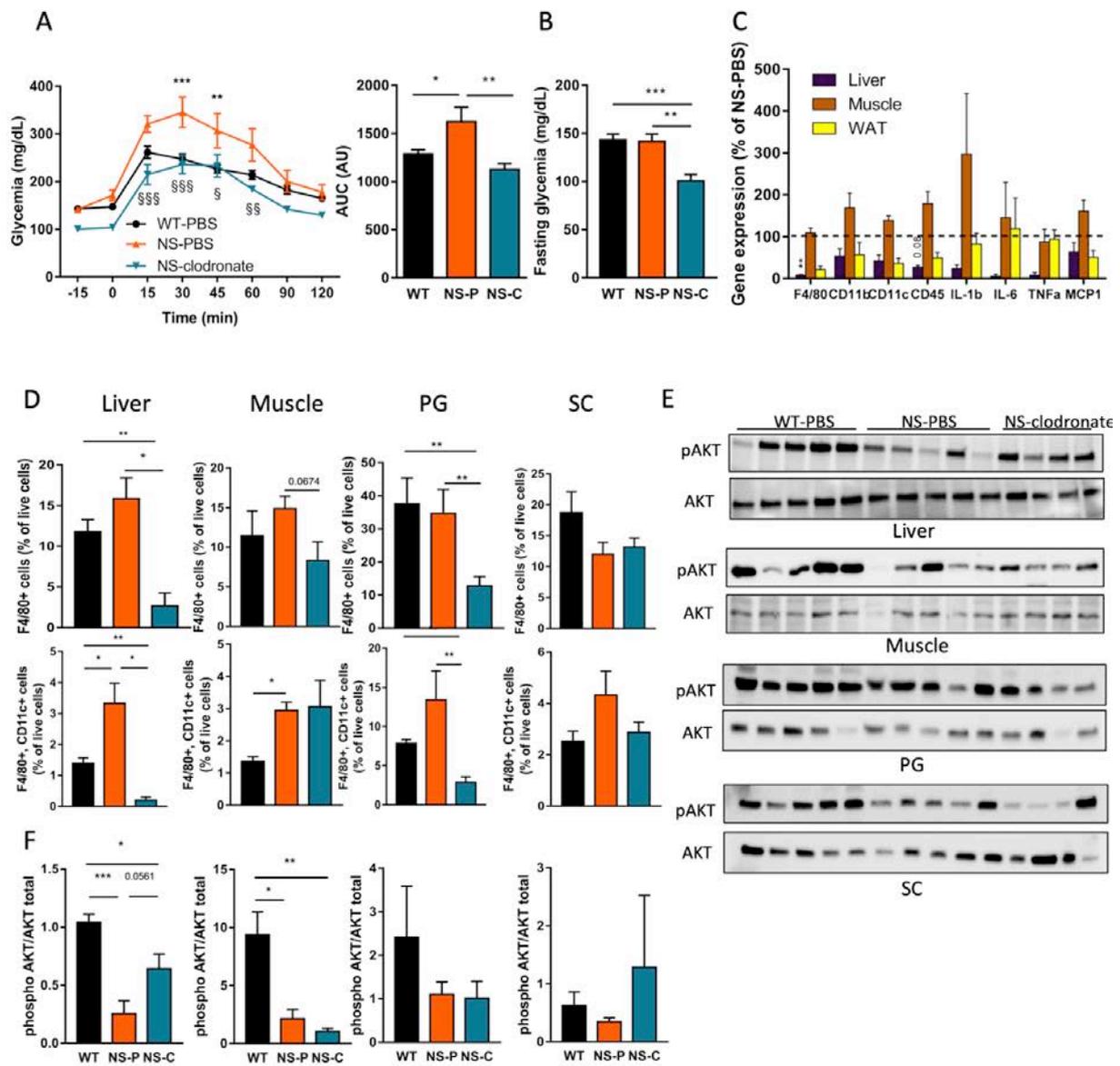


Figure 5: Macrophage depletion rescues glucose intolerance in SHP2^{D61G/+} mice

Fig. 5: Macrophage depletion rescues glucose intolerance in SHP2^{D61G/+} mice

NS mice were injected with clodronate or vehicle, then the following analyses were performed:

(A) OGTT. Values are expressed as mean \pm SEM, n=8-10 in each group, 2-way ANOVA with Bonferroni post test for glycemia curve, **p<0.01, ***p<0.001 for WT vs NS, §p<0.05, §§p<0.01, §§§p<0.001 for NS-vehicle vs NS-clodronate, unpaired Student t-test for AUC values (*p<0.05, **p<0.01).

(B) Fasting glycemia was measured. Values are expressed as mean \pm SEM, n=8-10 in each group, unpaired Student t-test (**p<0.01, ***p<0.001).

(C) Expression of inflammation markers was determined by RT-qPCR in tissues from clodronate-treated NS mice compared to PBS-injected NS animals. Values are expressed as mean \pm SEM, n=8-10 in each group Student t-test (**p<0.01).

(D) Quantification of F4/80+ and CD11c+ cells (defined as viable CD45+, F4/80+ or viable CD45+, F4/80+ and CD11b+) in stromal fractions and from liver, muscle and WAT 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, F) Insulin-evoked AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation in liver, muscle and WATs from WT and NS mice injected with vehicle or clodronate was determined by western blot (E) and quantified (F). 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.

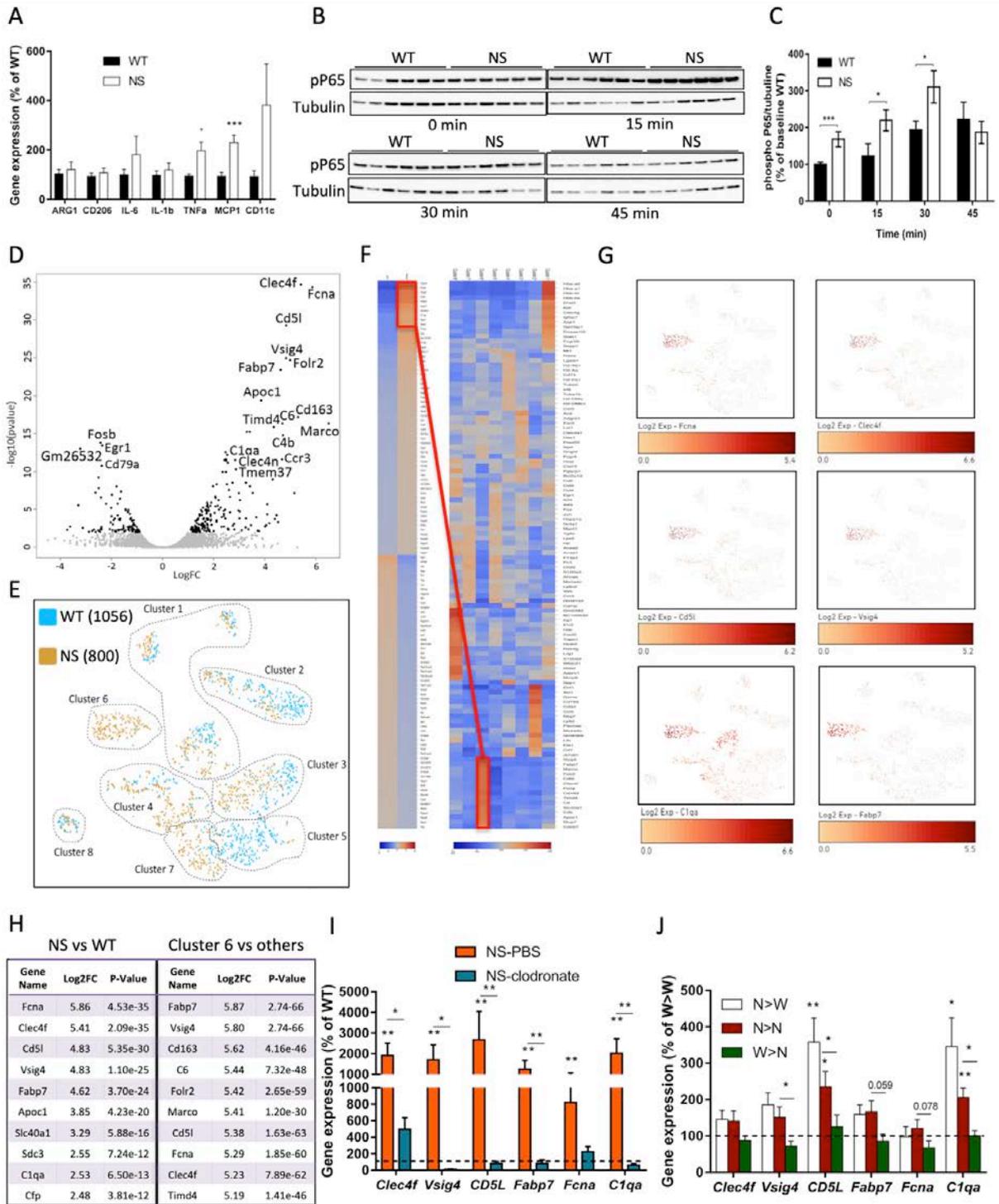


Figure 6: Hyperactive SHP2 mutant shifts macrophage identity towards a proinflammatory phenotype.

Fig. 6: Hyperactive SHP2 mutant shifts macrophage identity towards a proinflammatory phenotype

(A-C) BMDM were prepared from WT and NS mice. (A) Expression of inflammation markers was determined by RT-qPCR. (B) LPS-induced p65 phosphorylation were assessed by western blot. (C) Quantification of p65 phosphorylation. Values are expressed as mean \pm SEM, 2-way ANOVA with Bonferroni post test or unpaired Student t-test when necessary, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

(D-H) F4/80+ cells were isolated from liver stromal fractions from WT and NS mice then processed for single cell RNA sequencing. (D) Volcano plot, (E) t-SNE diagram, (F) Heatmap of differentially expressed genes in the entire population and in the different clusters, (G) distribution of selected up-regulated genes, (H) top 10 up-regulated genes in NS cells and cluster 6.

(I, J) Expression of top up-regulated markers in liver of (I) clodronate treated animals and (J) BMT animals. Values are expressed as mean \pm SEM, $n=4-5$ in clodronate, $n=8-14$ in BMT, unpaired Student t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

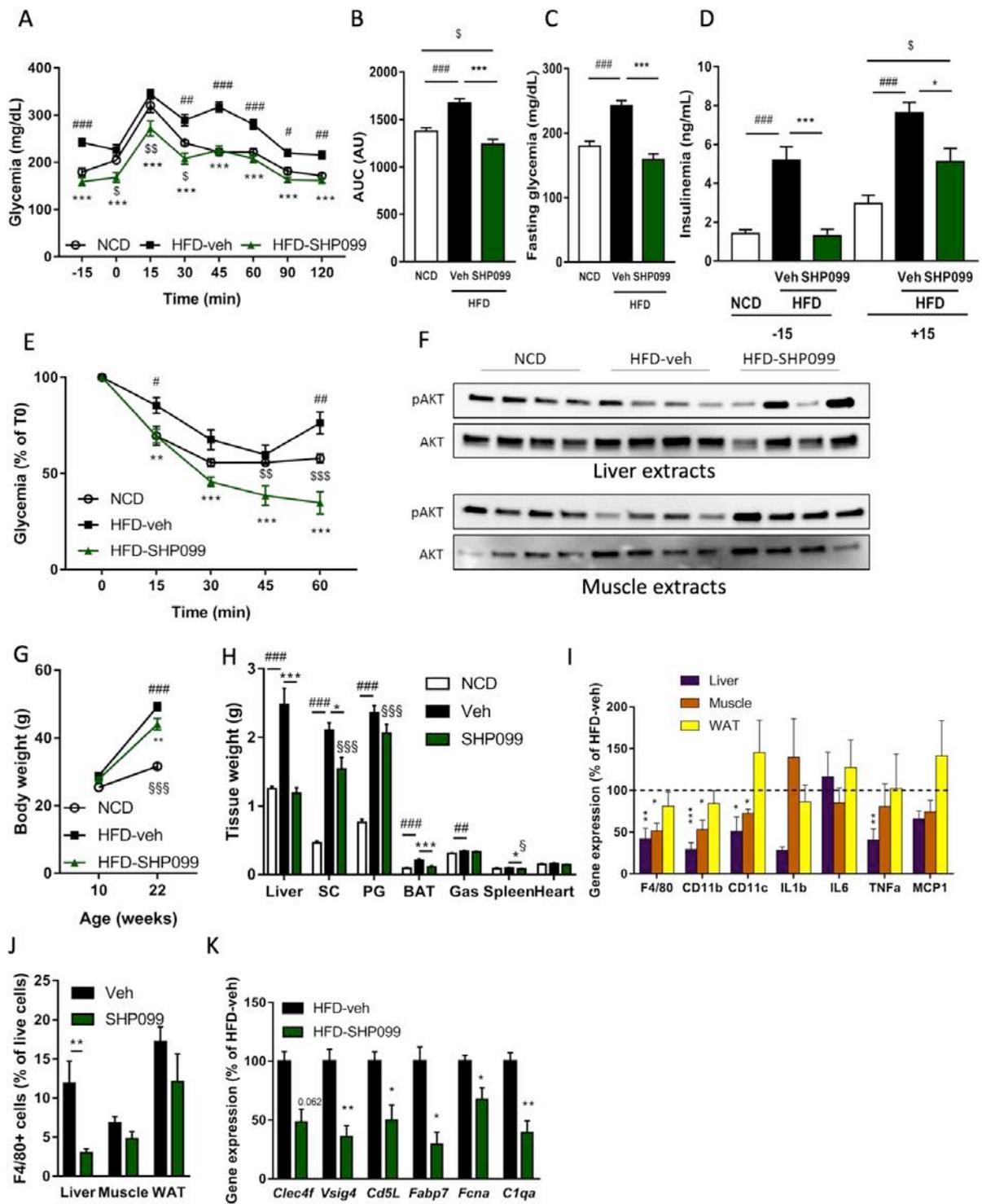


Figure 7: Pharmacological inhibition of SHP2 improves insulin sensitivity and reduced metaflammation in obese/diabetic mice.

Fig. 7: Pharmacological inhibition of SHP2 improves insulin sensitivity and reduced metaflammation in obese/diabetic mice

HFD fed C57B6 animals were treated by oral gavage with SHP099 or vehicle as a control during 2 weeks and the following analyses were performed.

(A-D) Post treatment OGTT with (A) glycemia curve and (B) AUC, (C) fasted glycemia, (D) fasted and glucose-induced insulinemia.

(E) Post treatment ITT.

(F) Insulin-evoked AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation in hepatic and muscle tissue.

(G) Body weight variation.

(H) Tissue weight.

(I, J) Expression of inflammation markers was quantified by RT-qPCR on liver, WAT and muscle (H) and flow cytometry analysis of stromal fraction from liver, muscle and subcutaneous WAT (I).

(K) Expression of NS-associated markers in liver of obese/diabetic animals.

Values are expressed as mean \pm SEM n=5-8 in each group, 2-way ANOVA with Bonferroni post test for glycemia curve and unpaired Student t-test or Mann & Whitney test when variances were unequal. NCD vs HFD-veh: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; NCD vs HFD-SHP099: \$p<0.05, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001; HFD-veh vs HFD-SHP099: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Table 1: Metabolic parameters of NS patients compared to age- and gender- matched lean, normal weight and obese subjects (OGTT subgroups)

	NS	Normal weight	NS/norm.p	Obese	NS/obese.p	Lean	NS/lean.p
n	9	27	-	27	-	8	-
Male-Female (% of female)	6-4 (44.4)	18-12 (44.4)	1.000	18-12 (44.4)	1.000	4-4 (50.0)	1.000
Age (years) (mean (sd))	11 (3.62)	12.1 (2.67)	0.41	11.32 (3.05)	0.8	14.09 (3.42)	0.087
Z-BMI (mean (sd))	-0.82 (1.08)	0.35 (0.58)	0.012	3.81 (0.73)	<0.0001	-1.32 (0.36)	0.218
Fasted glycemia (SI) (mean (sd))	4.55 (0.60)	4.71 (0.51)	0.475	4.83 (0.39)	0.213	4.94 (0.53)	0.178
Fasted insulinemia (SI) (mean (sd))	48.27 (37.41)	45.07 (28.12)	0.827	98.8 (57.95)	0.009	58.08 (37.44)	0.608
2 hr glycemia (SI) (mean (sd))	5.47 (1.29)	4.6 (0.77)	0.086	5.32 (0.97)	0.757	5.05 (1.19)	0.498
2 hr insulinemia (SI) (mean (sd))	296.38 (136.70)	97.59 (113.16)	0.056	293.82 (297.78)	0.978	190.55 (188.96)	0.299
Normalized 2 hr glycemia (%) (mean (sd))	121.35 (31.59)	98.78 (20.42)	0.072	110.04 (17.67)	0.332	102.9 (25.48)	0.203
Normalized 2 hr insulinemia (%) (mean (sd))	550.33 (209.11)	229.64 (196.62)	0.047	300.19 (197.13)	0.091	339.06 (273.85)	0.177
HOMAIR (mean (sd))	1.51 (1.28)	1.39 (0.93)	0.804	3.1 (1.87)	0.014	1.92 (1.43)	0.553
QUICKI (mean (sd))	0.16 (0.02)	0.16 (0.02)	0.945	0.15 (0.01)	0.027	0.16 (0.02)	0.453

Supplementary Materials

Supplementary Materials and Methods

Patient genetic testing: DNA samples were obtained from peripheral leukocytes. Mutation screening was performed by direct bidirectional sequencing of exons and their flanking intron-exon boundaries. The entire coding regions of PTPN11 were tested. Primers and PCR conditions are available on request. The PCR products were sequenced (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and reaction products run on an automated capillary sequencer (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Sequences were aligned using Seqscape analysis software (Applied Biosystems) and compared with the reference sequences for genomic DNA and mRNA. GenBank accession numbers for genomic and mRNA reference sequences, respectively, are as follows: PTPN11 NC_000012 and NM_002834.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp : Hyperinsulinemic euglycemic clamp procedure was performed as previously described (57). Briefly, a catheter was indwelled into the femoral vein under anesthesia with an interscapular exit point. 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. A 3-hr hyperinsulinemic-euglycemic clamp was conducted in conscious mice with continuous infusion of human insulin at a rate of 18 or 1.5 mIU/kg/min, followed by infusion of 20% or 7.5% glucose at variable rates to maintain euglycemia. To determine the insulin -stimulated glucose utilization in tissues, a bolus of intravenous injection of 50 μ Ci 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 μ l 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 (58). To measure whole body glucose turnover in basal state, HPLC purified D-[3H]-glucose (Perkin Elmer; Boston, MA) was continuously infused in the femoral vein at a rate of 10 μ Ci/kg/min for 90 min. Under hyperinsulinemic conditions, insulin was infused at a rate of 1.5 mIU/kg/min and the tracer was infused at 10 μ Ci/kg/min to ensure a sufficient plasma D-[3H]-glucose enrichment. Plasma glucose concentrations and D-[3H]-glucose-specific activity were determined in 5 μ L of blood.

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 S3) and gene expression was normalized to 36B4, GAPDH, HPRT or Beta 2 microglobulin housekeeping genes.

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 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).

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, NPO_4 1 mM). Protein concentration was determined by the Bradford method (BioRad), then lysates aliquots were processed for immunoblotting through standard procedure.

Antibodies:

Phospho-AKT (S473) : CST 4060

AKT : CST 9272

Phospho-ERK1/2 (T202/Y204): CST 4370

ERK1/2 : CST 4695

GAPDH : CST 2118

Phospho-P65 (S536): CST 3033

Tubulin : sigma T5168

Anti-mouse IgG, HRP-linked : CST 7076

Anti-rabbit IgG, HRP-linked : CST 7074

Supplementary Figures

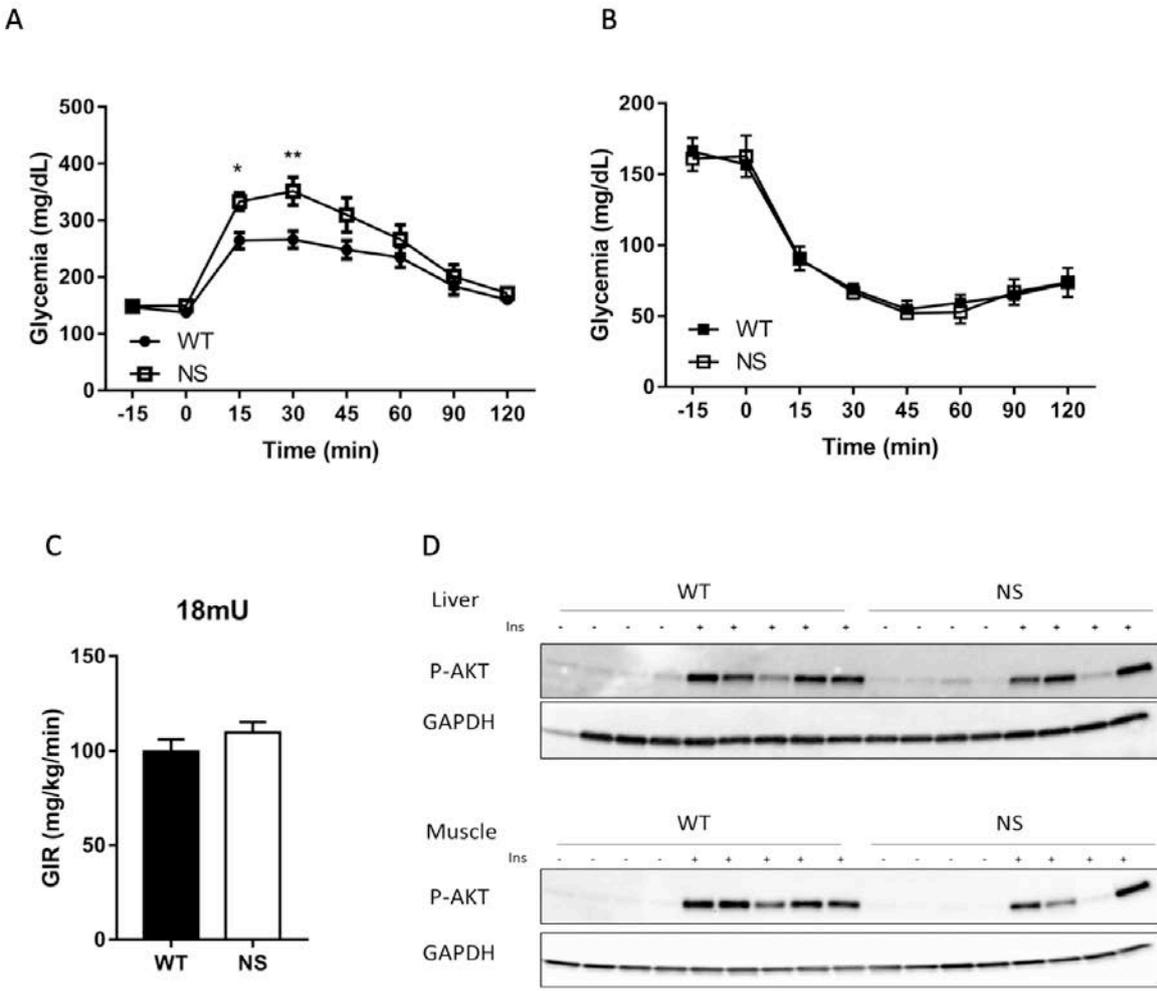


Figure S1: Glucose metabolic parameters of NS mice

Fig. S1: Glucose metabolic parameters of NS mice.

(A) OGTT on 20 week-old WT and NS animals.

(B) ITT at 0.75IU/kg of insulin.

Values are expressed as mean \pm SEM n=10-12 in each group, 2-way ANOVA with Bonferroni post test when 2-way ANOVA was significant, *p< 0.05, **p< 0.01.

(C) GIR during 18 mIU insulin hyperglycemic euglycemic clamp. Values are expressed as mean \pm SEM n=5-8 in each group, unpaired Student t-test.

(D) AKT Ser⁴⁷³ phosphorylation in metabolic tissues from NS and WT mice injected with 10 U/kg insulin.

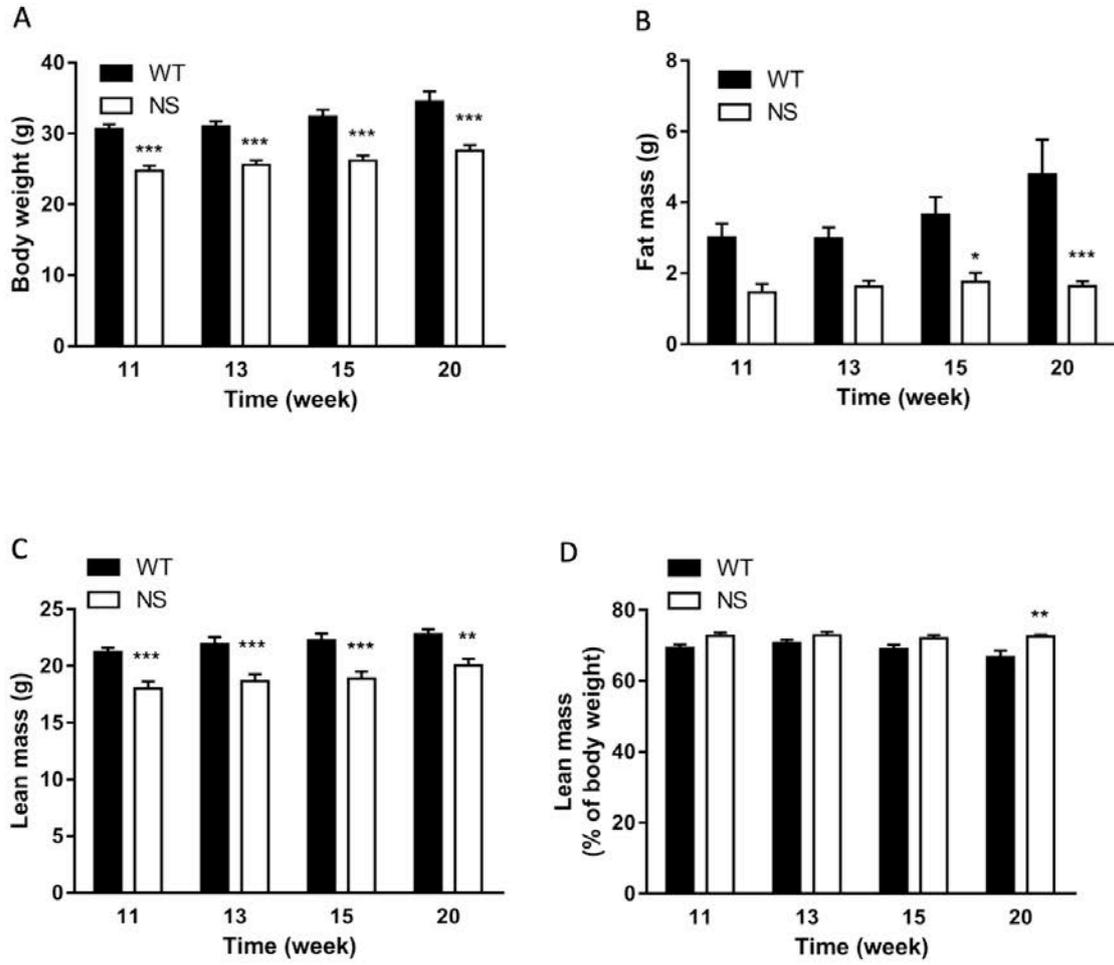


Figure S2: Metabolic parameters of NS mice

Fig. 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).

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.

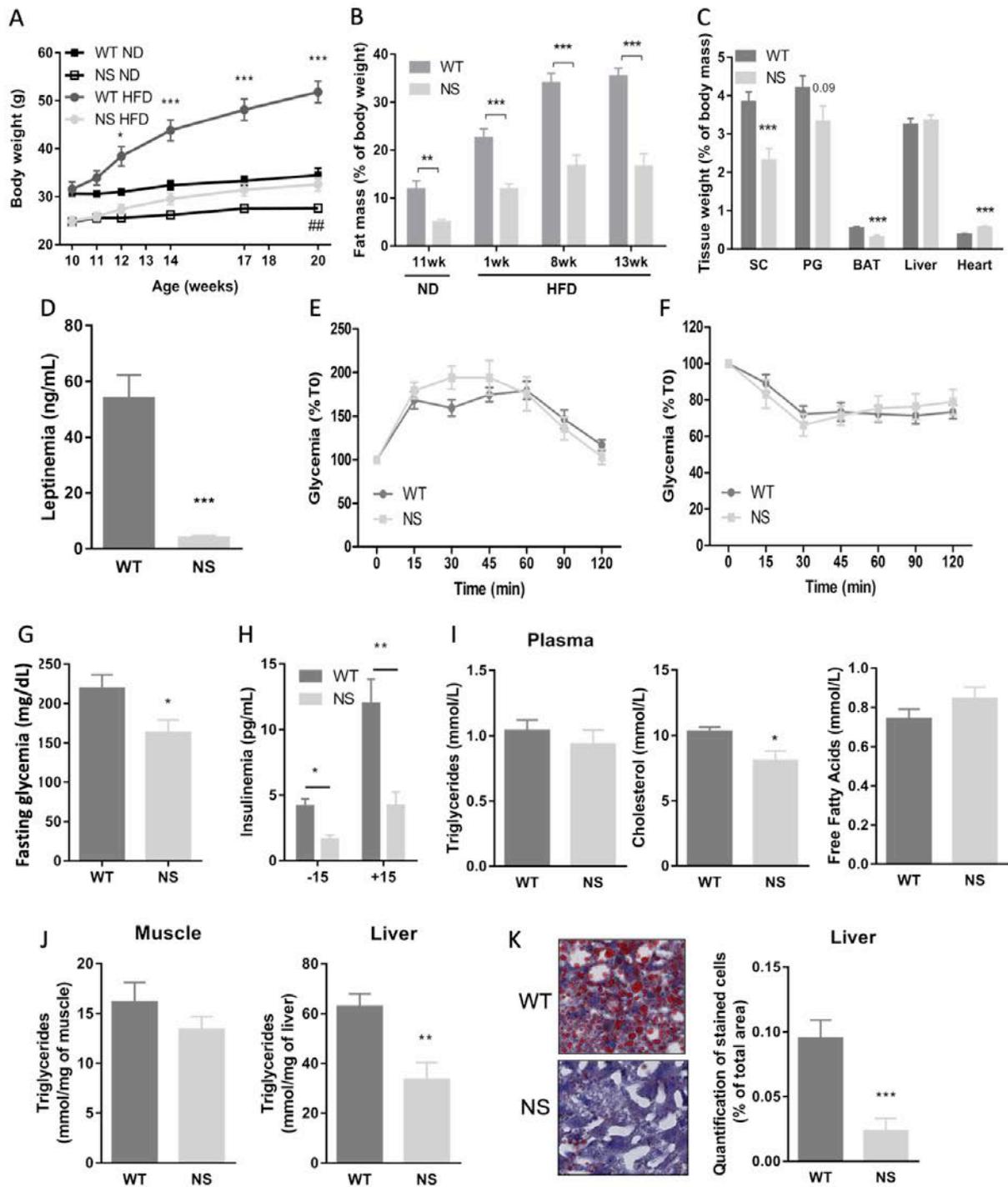


Figure S3: NS mice display similar glucose intolerance as WT animals during High Fat Diet despite being resistant to obesity

Fig. 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 (ND) and High Fat Diet (HFD).

Values are expressed as mean \pm SEM, n=9-12 for each group, *p< 0.05, ***p< 0.001 for WT versus NS under HFD, ##, p<0.01 for WT versus NS under ND, 2-way ANOVA with Bonferroni post test when 2-way ANOVA was significant.

(B) Proportion of fat mass of WT and NS animals at different times of ND and HFD.

(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), 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 staining on liver sections from high fat –fed WT and NS mice and quantification.

Values are expressed as mean \pm SEM, n=9-12 for each group, *p< 0.05, **p<0.01, ***p< 0.001 for WT versus NS, unpaired Student t-test.

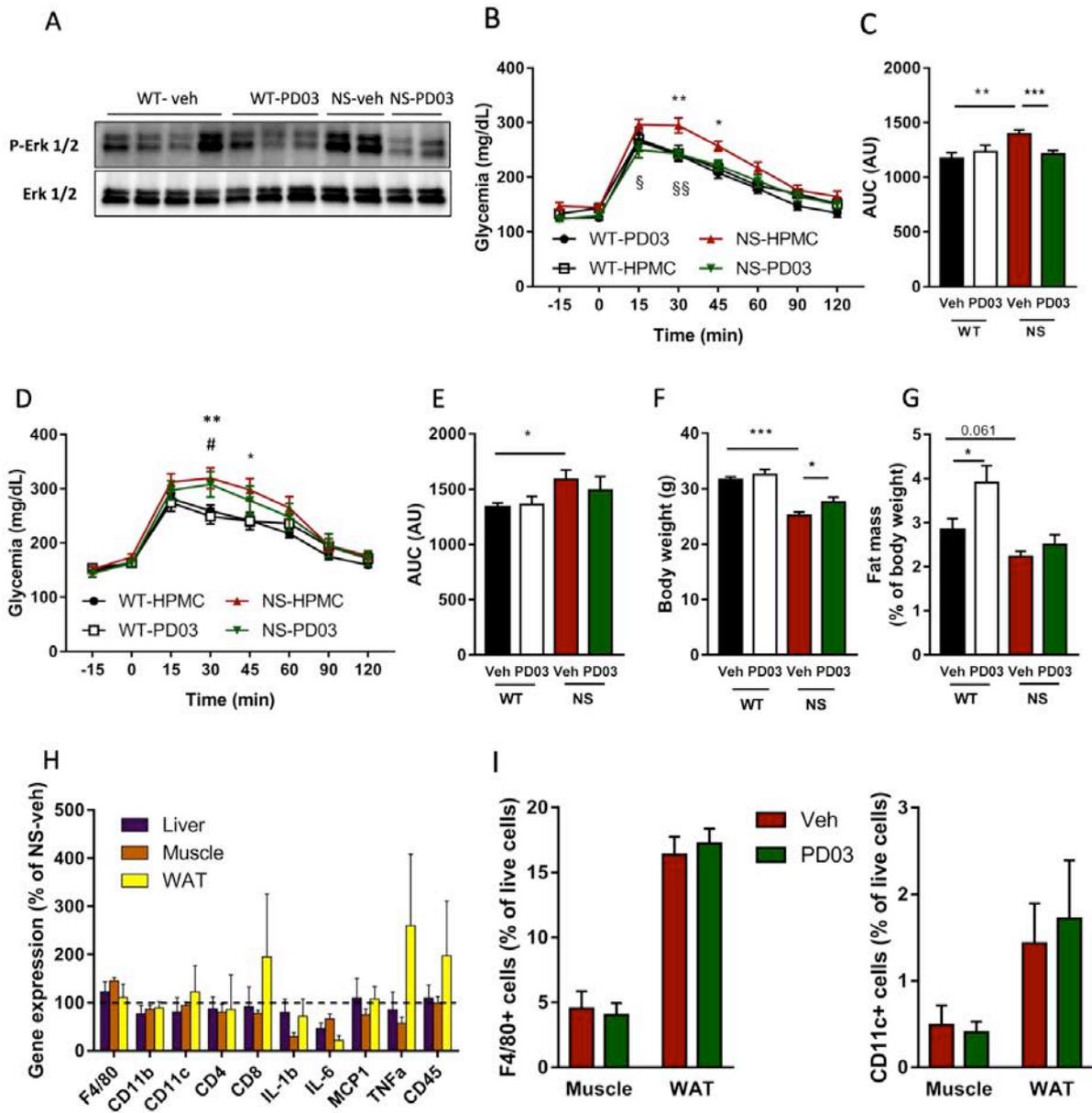


Figure S4 : MEK inhibition only transiently improves glucose intolerance without effect on metaflammation

Fig. S4: MEK inhibition only transiently improves glucose intolerance without effect on metaflammation

12 week old WT and NS mice have been treated during 4 weeks with a MEK inhibitor (PD0325901 1 mg/kg/d, injection i.p.) or vehicle (HPMC).

(A) Immunoblotting in liver extract from fasted animals 4 weeks after treatment.

(B) OGTT and (C) AUC 2 weeks after treatment start.

(D-I) Glucose tolerance, adiposity and inflammation 4 weeks after treatment start. (D) OGTT, (E) AUC, (F) body weight, (G) fat mass, (H) expression of inflammation markers quantified by RT-qPCR on liver, muscle and WAT and (I) flow cytometry analysis of stromal fraction from muscle and subcutaneous WAT. Values are expressed as mean \pm SEM n=13-15 in each group and n=4 for flow cytometry analyzes, 2- way ANOVA with Bonferroni post test for glycemia curve (*p< 0.05, **p< 0.01, WT-Veh vs NS-Veh; §, p<0.05 , NS-veh vs NS-PD03; #p< 0.05, WT-veh vs NS-PD03), unpaired Student t-test for AUC values (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

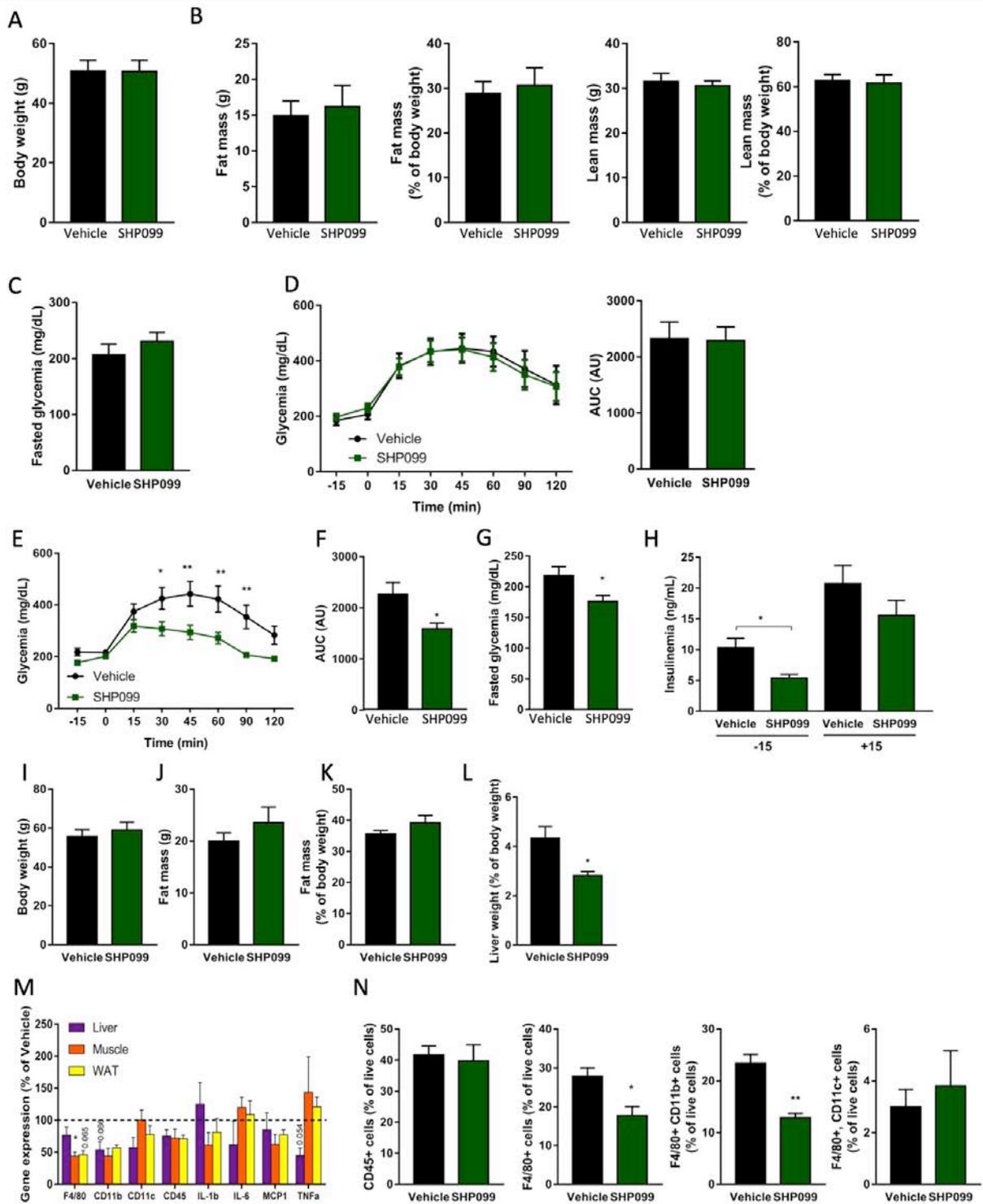


Figure S5: Effect of SHP099 treatment on HFD-fed B6x129Sv genetic background mice

Fig. S5: Metabolic parameters of obese/diabetic B6/129Sv mice before and after SHP099 treatment.

(A-D) 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) fasting glycemia, (D) OGTT.

(E-N) Glucose tolerance, adiposity and inflammation 2 weeks after treatment. (E) OGTT, (F) AUC, (G) fasting glycemia, (H) fasting and glucose-evoked insulinemia during OGTT, (I) body weight, (J) fat mass, (K) fat mass normalized with body weight, (L) tissues weight, (M) expression of inflammation markers quantified by RT-qPCR on liver, muscle and WAT and (N) flow cytometry analysis of stromal fraction from subcutaneous WAT.

Values are expressed as mean \pm SEM n=6 in each group, 2-way ANOVA with Bonferroni post test when 2-way ANOVA was significant for glycemia curve and unpaired Student t-test or Mann & Whitney test when variances were unequal, *p< 0.05 , **p< 0.01.

Supplementary tables

Table S1: Genetic confirmation of NS patients.

Patient ID	Gender (1: male; 2: female)	Age (year) at analysis	Gene	Mutation (DNA)	Mutation (protein)	OGTT
1	1	1,1	<i>PTPN11</i>	n.d	n.d	no
2	1	2,1	<i>PTPN11</i>	c.417 G>C	p.Glu139Asp	no
3	1	2,7	<i>PTPN11</i>	c.124 A>G	p.Thr42Ala	no
4	2	4,5	<i>PTPN11</i>	c.188 A>G	p.Tyr63Cys	no
5	1	4,6	<i>PTPN11</i>	c.184 T>G	p.Tyr62Asp	no
6	2	4,8	<i>PTPN11</i>	c.417 G>C	p.Glu139Asp	no
7	1	6,2	<i>PTPN11</i>	c.844 A>G	p.Ile282Val	yes
8	1	7,1	<i>PTPN11</i>	c.922 A>G	p.Asn308Asp	yes
9	2	8,3	<i>PTPN11</i>	c.844 A>G	p.Ile282Val	yes
10	1	10,5	<i>PTPN11</i>	c.234 A>G	p.Gly79Arg	yes
11	2	10,8	<i>PTPN11</i>	c.172 A>G	p.Asn58Asp	yes
12	1	11,3	<i>PTPN11</i>	c.922 A>G	p.Asn308Asp	excluded/ hypoglycemia
13	1	11,3	<i>PTPN11</i>	c.184 T>G	p.Tyr62Asp	yes
14	1	11,3	<i>PTPN11</i>	c.922 A>G	p.Asn308Asp	no
15	1	12,1	<i>PTPN11</i>	c.1300 G>A	p.Gly434Arg	yes
16	1	12,8	<i>PTPN11</i>	c.188 A>G	p.Tyr63Cys	no
17	1	14,0	<i>PTPN11</i>	c.922 A>G	p.Asn308Asp	no
18	2	15,1	<i>PTPN11</i>	c.417 G>C	p.Glu139Asp	yes
19	2	16,2	<i>PTPN11</i>	c.417 G>C	p.Glu139Asp	no
20	2	17,3	<i>PTPN11</i>	c.922 A>G	p.Asn308asp	yes
21	1	17,8	<i>PTPN11</i>	c.215 C>G	p.Ala72Gly	no

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

	NS	Normal weight	NS/norm.p	Obese	NS/obese.p	Lean	NS/lean.p
Basal parameters (whole cohort)							
<i>n</i>	21	63	-	63	-	15	-
<i>Male-Female (% of female)</i>	14-7 (33.3)	42-21 (33.3)	1	42-21 (33.3)	1	8-7 (46.7)	0.64
<i>Age (years) (mean (sd))</i>	9.61 (5.09)	11.99 (2.83)	0.05	10.92 (3.51)	0.29	11.81 (4.22)	0.17
<i>BMI (kg/cm²) (mean (sd))</i>	15.89 (1.93)	18.19 (2.10)	<0.0001	29.02 (6.59)	<0.0001	15.19 (1.76)	0.27
<i>Z-BMI (mean (sd))</i>	-0.93 (0.86)	0.37 (0.56)	<0.0001	4.26 (1.20)	<0.0001	-1.52 (0.44)	0.01
<i>Weight (kg)(mean (sd))</i>	25.96 (13.60)	41.13 (12.28)	<0.0001	67.50 (27.35)	<0.0001	34.40 (14.27)	0.08
<i>Height (cm) (mean (sd))</i>	122.72 (27.80)	148.47 (14.65)	0.0005	149.45 (17.59)	0.0003	146.60 (22.58)	0.008
<i>Fat mass (%) (mean (sd))</i>	0.19 (0.07)	0.23 (0.06)	0.053	0.40 (0.08)	<0.0001	0.22 (0.10)	0.48
<i>Fasted glycemia (SI) (mean (sd))</i>	4.49 (0.56)	4.76 (0.48)	0.054	4.87 (0.60)	0.02	4.85 (0.47)	0.04
<i>Fasted insulinemia (SI) (mean (sd))</i>	44.77 (29.87)	42.73 (26.12)	0.8	107.40 (83.93)	<0.0001	50.56 (30.35)	0.59
<i>HOMAIR (mean (sd))</i>	1.32 (0.97)	1.33 (0.89)	0.9	3.49 (3.35)	<0.0001	1.64 (1.14)	0.41
<i>QUICKI (mean (sd))</i>	0.17 (0.02)	0.17 (0.02)	0.84	0.15 (0.02)	0.0001	0.16 (0.02)	0.39
<i>Cholesterol (SI) (mean (sd))</i>	3.61 (0.64)	4.42 (0.88)	<0.0001	4.44 (0.80)	<0.0001	4.32 (1.18)	0.05
<i>Triglycerides (SI) (mean (sd))</i>	0.74 (0.45)	0.71 (0.34)	0.78	1.05 (0.52)	0.013	0.80 (0.25)	0.62
<i>HDL (SI) (mean (sd))</i>	1.24 (0.33)	1.57 (0.36)	0.0013	1.24 (0.30)	0.96	1.41 (0.35)	0.18
<i>LDL (SI) (mean (sd))</i>	1.95 (0.53)	-	-	-	-	-	-
<i>Leptin (SI) (mean (sd))</i>	2.04 (2.00)	7.90 (7.35)	0.0003	24.82 (11.14)	<0.0001	4.90 (0.99)	0.07
<i>Monocytes (SI) (mean (sd))-norm :0.2-1</i>	0.82 (0.35)						
<i>Lymphocytes (SI) (mean (sd))-norm : 1.5-7</i>	2.7 (1)						
<i>Leukocytes (SI) (mean (sd))-norm : 4.5-15</i>	7.9 (2.9)						
<i>Neutrophils (SI) (mean (sd))-norm :1.5-8.5</i>	4 (1.9)						
<i>Eosinophils (SI) (mean (sd))-norm :0.04-0.5</i>	0.32 (0.37)						
Basal and OGTT parameters (OGTT subgroup)							
<i>n</i>	9	27	-	27	-	8	-
<i>Male-Female (% of female)</i>	6-4 (44.4)	18-12 (44.4)	1.000	18-12 (44.4)	1.000	4-4 (50.0)	1.000
<i>Age (years) (mean (sd))</i>	11 (3.62)	12.1 (2.67)	0.41	11.32 (3.05)	0.8	14.09 (3.42)	0.087
<i>Weight (kg)(mean (sd))</i>	27.69 (11.12)	39.87 (9.98)	0.012	63.68 (23.64)	<0.0001	42.38 (12.09)	0.021
<i>Height (cm) (mean (sd))</i>	128.69 (20.57)	146.91 (11.06)	0.030	148.31 (15.08)	0.023	159.62 (17.81)	0.005
<i>BMI (kg/cm²) (mean (sd))</i>	15.94 (2.04)	18.17 (2.11)	0.014	27.93 (5.39)	<0.0001	16.24 (1.38)	0.721
<i>Z-BMI (mean (sd))</i>	-0.82 (1.08)	0.35 (0.58)	0.012	3.81 (0.73)	<0.0001	-1.32 (0.36)	0.218
<i>Glucose 0 (SI) (mean (sd))</i>	4.55 (0.60)	4.71 (0.51)	0.475	4.83 (0.39)	0.213	4.94 (0.53)	0.178
<i>Glucose 30 (SI) (mean (sd))</i>	6.55 (1.05)	6.90 (1.44)	0.456	6.93 (1.71)	0.451	7.28 (1.47)	0.273
<i>Glucose 60 (SI) (mean (sd))</i>	5.79 (1.45)	5.44 (1.39)	0.580	5.75 (1.95)	0.956	5.69 (1.25)	0.885
<i>Glucose 90 (SI) (mean (sd))</i>	5.58 (2.21)	4.88 (0.98)	0.479	5.64 (1.28)	0.954	5.01 (1.33)	0.591
<i>Glucose 120 (SI) (mean (sd))</i>	5.47 (1.29)	4.60 (0.77)	0.086	5.32 (0.97)	0.757	5.05 (1.19)	0.498
<i>Norm Glucose 0 (SI) (mean (sd))</i>	100.00 (0.00)	100.00 (0.00)	-	100.00 (0.00)	-	100.00 (0.00)	-

Norm Glucose 30 (SI) (mean (sd))	144.96 (21.51)	146.82 (28.31)	0.839	143.10 (32.13)	0.848	147.29 (25.14)	0.841
Norm Glucose 60 (SI) (mean (sd))	133.48 (30.46)	117.24 (36.11)	0.253	118.16 (34.57)	0.275	116.09 (28.99)	0.281
Norm Glucose 90 (SI) (mean (sd))	125.21 (47.18)	104.74 (23.99)	0.344	116.45 (22.12)	0.674	101.90 (26.73)	0.311
Norm Glucose 120 (SI) (mean (sd))	121.35 (31.59)	98.78 (20.42)	0.072	110.04 (17.67)	0.332	102.90 (25.48)	0.203
Insulin 0 (SI) (mean (sd))	48.27 (37.41)	45.07 (28.12)	0.827	98.80 (57.95)	0.009	58.08 (37.44)	0.608
Insulin 30 (SI) (mean (sd))	401.54 (224.24)	269.18 (158.51)	0.218	637.47 (431.00)	0.080	385.10 (253.36)	0.900
Insulin 60 (SI) (mean (sd))	255.11 (239.53)	195.62 (135.72)	0.579	411.63 (411.20)	0.236	236.65 (151.58)	0.873
Insulin 90 (SI) (mean (sd))	246.41 (198.02)	126.40 (137.12)	0.254	365.02 (292.27)	0.292	221.11 (151.22)	0.814
Insulin 120 (SI) (mean (sd))	296.38 (136.70)	97.59 (113.16)	0.056	293.82 (297.78)	0.978	190.55 (188.96)	0.299
Norm Insulin 0 (SI) (mean (sd))	100.00 (0.00)	100.00 (0.00)	1.000	100.00 (0.00)	1.000	100.00 (0.00)	-
Norm Insulin 30 (SI) (mean (sd))	802.74 (422.33)	671.28 (332.13)	0.500	801.45 (588.46)	0.995	739.39 (420.62)	0.786
Norm Insulin 60 (SI) (mean (sd))	548.17 (241.63)	517.86 (361.95)	0.807	386.16 (242.65)	0.179	530.48 (496.43)	0.932
Norm Insulin 90 (SI) (mean (sd))	496.77 (276.30)	323.21 (250.31)	0.245	396.27 (237.44)	0.479	463.78 (282.54)	0.840
Norm Insulin 120 (SI) (mean (sd))	550.33 (209.11)	229.64 (196.62)	0.047	300.19 (197.13)	0.091	339.06 (273.85)	0.177
HOMAIR (mean (sd))	1.51 (1.28)	1.39 (0.93)	0.804	3.10 (1.87)	0.014	1.92 (1.43)	0.553
QUICKI (mean (sd))	0.16 (0.02)	0.16 (0.02)	0.945	0.15 (0.01)	0.027	0.16 (0.02)	0.453
Adiposity (%) (mean (sd))	0.22 (0.07)	0.25 (0.07)	0.364	0.41 (0.06)	<0.0001	0.23 (0.11)	0.838
Cholesterol (SI) (mean (sd))	3.40 (0.54)	4.44 (1.05)	0.0007	4.29 (0.74)	0.0009	3.85 (0.70)	0.160
Triglycerides (SI) (mean (sd))	0.59 (0.24)	0.71 (0.33)	0.245	0.97 (0.42)	0.003	0.73 (0.25)	0.240
HDL (SI) (mean (sd))	1.30 (0.37)	1.59 (0.35)	0.066	1.18 (0.28)	0.389	1.28 (0.22)	0.902
LDL (SI) (mean (sd))	1.83 (0.51)	-	-	-	-	-	-
Leptin (SI) (mean (sd))	2.29 (1.65)	9.82 (9.66)	0.016	26.08 (11.26)	<0.0001	4.90 (0.99)	0.073
Monocytes (SI) (mean (sd))-norm :0.2-1	0.85 (0.28)	-	-	-	-	-	-
Lymphocytes (SI) (mean (sd))-norm : 1.5-7	2.54 (1)	-	-	-	-	-	-
Leukocytes (SI) (mean (sd))-norm : 4.5-15	8.33 (3.5)	-	-	-	-	-	-
Neutrophils (SI) (mean (sd))-norm : 1.5-8.5	4.4 (0.75)	-	-	-	-	-	-
Eosinophils (SI) (mean (sd))- norm : 0.04-0.5	0.41 (0.16)	-	-	-	-	-	-

Table S3: Primer sequence

F4/80 : F : TGACAACCAGACGGCTTGTG/R : GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT

CD11b : F : TCGGACGAGTTCCGGATTC/R : TGTATCTTGGGCTAGGGTTTC

CD11c : F : GATTTTCAGCATCCCAGATCCC/R : CCAGATCCACCAGTCCATCC

CD4 : F : AGGGAGAGTCAGCGGAGTTCT/R : CTCCCCACCCGTTTTCT

CD8 : F : TCTGTCGCTGAACCTGCTG/R : TGGAAAGATTCGGAGTTCGG

CD45 : F : ACATGCTGCCAATGGTTCTG/R : GTCCACATGACTCCTTTCTATG

IL-6 : F : GCCCACCAAGAACGATAGTCA/R : CAAGAAGGCAACTGGATGGAA

IL-1b : F : CAACCAACAAGTGATATTCTCGATG/R : GATCCACACTCTCCAGCTGCA

MCP1 : F : GCAGTTAACGCCCCACTCA/R : CCAGCCTACTCATTGGGATCA

TNFa : F : TGGGACAGTGACCTGGACTGT/R : TTCGGAAAGCCATTTGAGT

ARG1 : F : GGCAGTTGGAAGCATCTCTG/R : GTCAGTGTGAGCATCCACCC

CD206 : F : GCAATTCACGAGAGGCAGG/R : AAACAGGCAGGGAAGGGTC

Clec4f : F : ATTTGGGGCCCTGTTTCTCT/R : ATGAATGACAGGGTGGAGCA

Vsig4 : F : TGAGCCACAAAGTTCCAGGA/R : CTGTCATCCATCTGCAGGGT

CD51 : F : CTGTCTCACCCTCCATCGT/R : GGCCAGCATCAAGTTGAACA

Fabp7 : F : ACGTGACCAAACCAACTGTG/R : ATGTGCATTGTGTCCGGATC

Fcna : F : ACTGTGCTCTGTGACATGGA/R : CGTCCACTCGTCGTTGAAAA

C1qa : F : ATCGAAAAGGACCCCGCAAA/R : GGAATCCGCTGAAGATGCTG

36B4 : F : AGT CGGAGGAATCAGATGACGAT/R : GGCTGACTTGGTTGCTTTGG

GAPDH : F : TGCACCACCAACTGCTTAGC/R : GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Beta2 microglubulin : F : CACTGACCGGCCTGTATGC/R :

GGGTGGCGTGAGTATACTTGAATT

HPRT : F : TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC/R : GGCAAGAGAGGTCCACGAT