



**HAL**  
open science

# Régulation épigénétique de la croissance foetale : implication du gène soumis à empreinte parentale DLK1 (14q32) dans la croissance foetale

Aurélie Pham

► **To cite this version:**

Aurélie Pham. Régulation épigénétique de la croissance foetale : implication du gène soumis à empreinte parentale DLK1 (14q32) dans la croissance foetale. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS573 . tel-04549154

**HAL Id: tel-04549154**

**<https://theses.hal.science/tel-04549154>**

Submitted on 17 Apr 2024

**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.

Sorbonne Université  
École doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED 394)  
Unité INSERM U398. Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA).  
Équipe Netchine « système des IGFs et croissance fœtale et postnatale »

**Régulation épigénétique de la croissance fœtale :**

Implication du gène soumis à empreinte parentale *DLK1* (14q32) dans la croissance fœtale

Par Aurélie PHAM

Thèse de doctorat de physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Dirigée par Irène NETCHINE et Delphine MITANCHEZ

Présentée et soutenue publiquement le 17 Mars 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Béatrice DUBERN, PU-PH, présidente de jury

Pr. Pascale CHAVATTE-PALMER, DR1, rapporteur

Pr. Pascal BOILEAU, PU-PH, rapporteur

Pr. Agnès LINGLART, PU-PH, examinatrice

Pr. Daniel VAIMAN, DR1, examinateur

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	4
TABLES DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....	8
LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
CONTEXTE .....	12
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	15
<b>I. PHYSIOLOGIE DE L'EMPREINTE PARENTALE.....</b>	<b>16</b>
<b>I.1. Mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes.....</b>	<b>16</b>
I.1.1. Méthylation de l'ADN .....	16
I.1.2. Modifications post-traductionnelles des histones .....	17
I.1.3. ARNs non codants .....	17
I.1.4. Empreinte parentale.....	18
<b>I.2. Mécanismes de contrôle de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale.....</b>	<b>20</b>
I.2.1. Regroupement des gènes soumis à empreinte parentale dans des régions chromosomiques .....	20
I.2.2. Méthylation différentielle des centres d'empreinte parentale.....	20
I.2.3. Régulation en cis et en trans par les longs ARNs non codants .....	21
I.2.4. Conformation chromatiniennne et domaines d'association topologique (TADs).....	23
<b>I.3. Mise en place et maintien de l'empreinte parentale .....</b>	<b>26</b>
<b>II. SYNDROMES LIÉS A DES ANOMALIES DE L'EMPREINTE PARENTALE .....</b>	<b>30</b>
<b>II.1. Syndromes liés à des anomalies de l'empreinte parentale responsables d'un retard de croissance intra-utérin.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2. Mécanismes moléculaires à l'origine des maladies de l'empreinte parentale .....</b>	<b>33</b>
<b>II.3. Syndrome de Silver-Russell .....</b>	<b>34</b>
II.3.1. Manifestations cliniques du syndrome de Silver-Russell.....	34
II.3.2. Région soumise à empreinte parentale 11p15.....	36
II.3.2.1. Domaine télomérique <i>IGF2/H19</i> .....	37
II.3.2.1.1. Centre d'empreinte parental <i>H19/IGF2:IG-DMR</i> .....	37
II.3.2.1.2. <i>IGF-II</i> et système des IGFs.....	37
II.3.2.1.3. <i>H19</i> .....	41
II.3.2.2. Domaine centromérique <i>CDKN1C/KCNQ1OT1</i> .....	42
II.3.3. Anomalies moléculaires à l'origine du syndrome de Silver-Russell .....	43
<b>II.4. Syndrome de Temple .....</b>	<b>46</b>
II.4.1. Manifestations cliniques du syndrome de Temple.....	46
II.4.2. Région soumise à empreinte parentale 14q32.....	47
II.4.2.1. Régions différenciellement méthylées.....	47
II.4.2.2. Gènes codant pour des protéines ( <i>DLK1, DIO3, RTL1</i> ).....	48
II.4.2.3. ARNs non codants .....	49
II.4.2.4. Interactions au sein des TADs.....	50
II.4.3. Anomalies moléculaires à l'origine du syndrome de Temple .....	51
<b>II.5. Chevauchement clinique et moléculaire des patients présentant un syndrome de Silver-Russell et de Temple.....</b>	<b>52</b>
<b>III. ROLE DE DLK1 DANS LA CROISSANCE FŒTALE.....</b>	<b>54</b>
<b>III.1. Gène et protéine DLK1 .....</b>	<b>54</b>
<b>III.2. Voies de signalisation.....</b>	<b>55</b>
<b>III.3. Expression spatio-temporelle de <i>DLK1</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>III.4. Modèles murins d'inactivation de <i>Dlk1</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>III.5. Mutations de <i>DLK1</i> identifiées en pathologie humaine.....</b>	<b>58</b>
<b>III.6. Rôles de DLK1 .....</b>	<b>59</b>
III.6.1. Régulation de la différenciation cellulaire .....	59
III.6.2. Échanges foeto-placentaires et adaptation métabolique à la gestation.....	59
III.6.3. Régulation de la croissance.....	61
<b>IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL EXPERIMENTAL.....</b>	<b>63</b>
<b>APPROCHE TRANSLATIONNELLE, PREMIERE PARTIE : DLK1 CIRCULANT DANS LE SANG MATERNEL PENDANT LA GESTATION EST-IL UN BIOMARQUEUR DE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN ? .....</b>	<b>64</b>
<b>I. CONTEXTE CLINIQUE ET SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>65</b>
<b>I.1. Définitions et épidémiologie .....</b>	<b>65</b>
<b>I.2. Dépistage du retard de croissance intra-utérin .....</b>	<b>66</b>

I.3.	Insuffisance placentaire .....	67
I.4.	Biomarqueurs de retard de croissance intra-utérin par insuffisance placentaire .....	70
I.5.	Concentrations sériques maternelles de DLK1 pendant la gestation.....	71
II.	ÉTUDES PRELIMINAIRES .....	72
II.1.	Choix de la technique de mesure .....	72
II.2.	Mise au point de la technique de mesure.....	73
II.3.	Choix du facteur de dilution .....	75
II.4.	Choix du type d'échantillon.....	76
II.5.	Évolution des concentrations de DLK1 au cours de la gestation.....	77
II.6.	La cohorte EDEN.....	78
II.7.	Définition des nouveau-nés PAG et choix des témoins.....	79
II.8.	Définition des cas de RCIU par insuffisance placentaire vasculaire.....	81
III.	ARTICLE ORIGINAL ACCEPTE POUR PUBLICATION PAR LE JOURNAL ' <i>FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY, SECTION PEDIATRIC ENDOCRINOLOGY</i> ', SOUS PRESSE : LOW MATERNAL DLK1 LEVELS AT 26 WEEKS IS ASSOCIATED WITH SMALL FOR GESTATIONAL AGE AT BIRTH. ....	83
IV.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	84
<b>APPROCHE TRANSLATIONNELLE, DEUXIEME PARTIE : <i>DLK1</i> : UN GENE CANDIDAT DE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN ?.....</b>		<b>86</b>
I.	CONTEXTE CLINIQUE ET SCIENTIFIQUE .....	87
II.	ARTICLE ORIGINAL PUBLIÉ DANS LE JOURNAL ' <i>EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS</i> ': SCREENING FOR <i>DLK1</i> MUTATIONS IN PATIENTS BORN SMALL FOR GESTATIONAL AGE WITH SILVER-RUSSELL SYNDROME PHENOTYPE. ....	90
III.	ARTICLE ORIGINAL EN COURS DE RELECTURE PAR LES DIFFERENTS PARTENAIRES EUROPEENS : GENES TO BE EVALUATED WHEN USING NGS BASED TECHNOLOGIES IN SILVER-RUSSELL SYNDROME AND ITS DIFFERENTIAL DIAGNOSES : A JOINT STRATEGY .....	91
IV.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	92
<b>APPROCHE FONDAMENTALE : RECHERCHE D'UN MODELE D'ETUDE DU RESEAU DE GENES SOUMIS A EMPREINTE PARENTALE.....</b>		<b>94</b>
I.	ÉTUDE DU RESEAU DE GENES SOUMIS A EMPREINTE PARENTALE .....	95
II.	CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES COMME MODELE CELLULAIRE D'ETUDE DU RESEAU DE GENES SOUMIS A EMPREINTE PARENTALE .....	96
II.1.	Historique des cellules souches pluripotentes induites.....	96
II.2.	Les iPSCs comme modèles d'étude des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale.....	97
II.3.	Article original en cours de relecture par l'équipe iPSCs de ICAN : How to rescue methylation profile of imprinted control region in human induced pluripotent stem cells .....	100
II.4.	Conclusions .....	101
III.	ÉTUDE D'UN DEUXIEME MODELE CELLULAIRE : LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES MESENCHYMATEUSES DE LA PULPE DENTAIRE .....	104
III.1.	Article original soumis à ' <i>International Journal of Oral Science</i> ', accepté sous réserve de modifications mineures (resoumis) : From dental pulp stem cell to osteogenic differentiation : new insight in parental imprinting. ....	105
III.2.	Conclusions et perspectives.....	106
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES .....</b>		<b>107</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>114</b>
<b>ANNEXE.....</b>		<b>135</b>
ARTICLE DE REVUE PUBLIÉ EN 2 <sup>EME</sup> AUTEUR : DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF POSTNATAL FETAL GROWTH RESTRICTION.....		135
<b>RÉSUMÉ.....</b>		<b>136</b>

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les Professeurs Pascale Chavatte-Palmer et Pascal Boileau d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Merci également aux autres membres de mon jury, les Professeurs Béatrice Dubern, Agnès Linglart et Daniel Vaiman, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Un grand merci à l'ensemble de la team Netchine pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre équipe de recherche à la sortie de l'internat. Merci de m'avoir accompagnée, soutenue et guidée de mes sombres jours dans les sous-sols de Labrouste aux jours ensoleillés qui ont suivi à Kourilsky. Mes premiers mots seront pour toi Eloïse, une de mes plus belles rencontres durant ce parcours. Notre concerto à deux voix a été tellement bien accordé durant ces quatre dernières années que la partition se prolonge sans fausse note à l'hôpital. Travailler avec toi est un réel bonheur. Comment remercier Marie-Laure d'avoir rejoint l'équipe durant ma première année de thèse et d'avoir apporté un souffle nouveau à toute l'équipe. Merci pour ton aide au quotidien, pour ta rigueur, pour tout ce que tu m'as enseigné durant ces dernières années et pour tous ces bons moments partagés dans notre bureau du 6<sup>ème</sup> ! Merci et bon courage à Céline qui prend désormais soin des petites précieuses. Tout semble toujours facile en travaillant à tes côtés. Tu restes pour moi la magicienne qui technique en une heure ce que nous mettions trois jours à faire... Merci à Frédéric pour ton aide et tes précieux conseils tout au long de ce travail de recherche. Des remerciements du fond du cœur pour toi Laurence, qui m'a littéralement tenue la main et les pipettes pendant mes premiers mois de thèse. Merci à Yves pour ta gentillesse et ta disponibilité. Je mesure la chance que j'ai de pouvoir travailler à tes côtés et te remercie pour les échanges passionnants que nous avons pu avoir pendant ces dernières années. Merci à Cristina, Marilyne et Nathalie pour votre aide, votre bonne humeur et votre gentillesse. Merci à Virginie pour son aide, en particulier pour le relai pris pendant mon

congé maternité. Merci également à la team « souris », Laurent, Clémence, Maud, Patricia et Charlène pour nos échanges et vos conseils durant nos réunions d'équipe.

Mes derniers mots pour l'équipe de recherche seront pour Irène et Delphine, mes maîtres de thèse. Merci à vous deux d'avoir co-encadré ma thèse en duo.

Irène, merci de m'avoir fait confiance en m'accueillant au sein de ton équipe de recherche. Ces quatre années de doctorat à tes côtés ont été très enrichissantes sur le plan professionnel mais également le lieu de rencontre de grandes personnes dont tu fais partie. Ta façon de concevoir la recherche de manière translationnelle avec sans cesse de nouveaux projets plus ambitieux les uns que les autres est un vrai modèle pour ma vie professionnelle future.

Delphine, tu es ma source d'inspiration depuis notre rencontre il y a dix ans. Les mots ne suffisent pas pour te remercier de m'avoir guidée dans ma vie professionnelle, mais également dans ma vie personnelle, tout au long de ces années. Je sais que le compagnonnage ne s'arrête pas aujourd'hui. Cette thèse n'est pas un aboutissement mais la suite logique du chemin parcouru à tes côtés depuis notre entretien le jour des résultats des ECN. Malgré la distance qui nous sépare aujourd'hui, tu demeures mon maître et mon modèle dans le monde de la néonatalogie.

Mes remerciements se tournent désormais vers l'ensemble de l'équipe de néonatalogie de Trousseau. La « dream » team pour reprendre les mots de Laurence. Merci à la girl power pour votre soutien sans faille durant ces derniers mois. L'entraide et la solidarité qui existent dans l'équipe sont exceptionnelles, et je mesure la chance que j'ai de travailler parmi vous. Merci à Mohamed pour ton enseignement depuis le début de mon internat et pour la bonne humeur qui règne dans notre bureau, même quand les enfants ont décidé d'écourter nos nuits. Merci à toute l'équipe paramédicale du service. J'ai la chance de travailler avec certain(e)s d'entre vous

depuis presque dix ans, vous qui m'avez vu « grandir » (ou plutôt vieillir...). Merci pour nos pauses café réconfortantes entre deux entrées aux soins intensifs et deux paragraphes de thèses. Merci au duo de choc des Annes, avec qui il est tellement agréable et facile de travailler. J'espère ne pas vous décevoir et être à la hauteur des ambitions que vous me prêtez ! Merci à Jennifer, Sandra et Sandrine pour votre aide au quotidien, toujours dans la bonne humeur. Je ne peux pas remercier l'équipe de néonatalogie de Trousseau sans remercier par extension l'équipe de la Pitié. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à vos côtés durant ces années de thèse, une pensée particulière à mes amies Cécile, Amélie et Aude. Enfin, merci à toi Laurence pour ta confiance et pour les beaux projets que tu mènes d'une main de maître pour le service. J'admire l'humanité avec laquelle tu gères les deux équipes et je m'efforce de suivre les petits cailloux même si la barre est désormais haute ! Merci de m'avoir épaulée avec tant de bienveillance durant cette dernière année de thèse et cette première année de clinicat où il a fallu conjuguer clinique, enseignement, recherche et maternité ...

Je tiens également à remercier mes proches pour leur soutien depuis le début de mon parcours professionnel. Merci à Laura et Sophie, mes amies de toujours, pour les bons moments partagés ensemble, de quelques secondes d'évasion grâce à une photo des enfants à un week-end autour du feu. Merci à Marie, la collègue, l'amie, la marraine. La vie réserve parfois de bonnes surprises, et ta décision au choix de stage d'hiver 2016 en a été une très bonne. Merci aux plus belles rencontres de mon internat, Pauline, Sonia, Marie, Richard, Julien, Jérôme, Sandrine et Yohan pour vos encouragements et votre soutien. Un message particulier pour Antoine pour les quelques nuits précieuses qu'il a sauvé ces dernières semaines !

A Christine, merci de m'avoir accueillie au sein de ta famille, pour ton soutien et ton aide au quotidien. La relation que tu as avec tes fils est la preuve qu'il est possible d'allier une vie de mère et une brillante carrière médicale.

A mes parents et à mon frère, merci de m'encourager depuis toujours dans tout ce que j'ai entrepris et dans mes choix. Je mesure la chance que j'ai d'avoir votre soutien à chaque étape de ma vie. Merci à tous les grands parents de vous occuper si bien des enfants, ce qui m'a permis de vivre sereinement les moments de travail intense ces derniers mois.

A toi, EH, qui fut l'évidence. La passion avec laquelle tu abordes la vie est un moteur dans nos vies personnelles et professionnelles. J'admire le chirurgien, l'homme et le père que tu es. Merci de m'avoir fait vibrer avec tes histoires rocambolesques d'arrêt cardiaque, de canulation (et de décanulation...), de blocs plus fous les uns que les autres, pendant que ma pratique clinique était restreinte à quelques gardes par mois. Merci de m'avoir écoutée, supportée et épaulée durant ces dernières semaines. Ces quatre années de doctorat ne sont que le début de notre chemin commun.

Un tendre mot pour nos deux enfants, Alek et Solveig. Vous êtes les deux plus belles réussites de ces quatre années et faites ma fierté au quotidien. J'espère que vous excuserez mon absence ces dernières semaines, le jour où vous découvrirez que le travail de papa et maman ne s'arrête pas aux escaliers ! Même si nos vies professionnelles nous rendent parfois absents la nuit, le week-end ou pendant les vacances, sachez que rien n'est plus important que vous à nos yeux.



## TABLES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### FIGURES

	Page
Figure 1 : Phénomène d’empreinte parentale .....	18
Figure 2 : Organisation en réseau des gènes soumis à empreinte parentale chez la souris.....	22
Figure 3 : Représentation schématique en deux dimensions de la région télomérique de la région 11p15.....	24
Figure 4 : Représentation d’un domaine d’association topologique.....	25
Figure 5 : Niveau de méthylation du génome et des ICRs pendant la gamétogenèse et les stades embryonnaires préimplantatoires.....	27
Figure 6 : Photographies d’un patient présentant un syndrome de Silver-Russell.....	35
Figure 7 : Région soumise à empreinte parentale 11p15.....	36
Figure 8 : Poids relatif à la naissance des modèles murins d’invalidation des différents gènes du système des IGFs.....	39
Figure 9 : Mutations et anomalies épigénétiques de la région 11p15 associées au syndrome de Silver-Russell.....	44
Figure 10 : Représentation schématique des modifications au sein du TAD du centre d’empreinte <i>IGF2/H19</i> :IG-DMR en cas de perte de méthylation chez des patients avec un SRS.....	45
Figure 11 : Photographies de patients présentant un syndrome de Temple.....	46
Figure 12 : Région soumise à empreinte parentale 14q32.....	47
Figure 13 : Représentation schématique de l’organisation en sous-TADs de la région <i>Dlk1-Dio3</i> en fonction de l’allèle parental.....	51
Figure 14 : Étude des niveaux d’expression d’ <i>IGF2</i> et de <i>MEG8</i> dans les fibroblastes de témoins et de patients avec un SRS ou un TS par PCR quantitative. ....	53
Figure 15 : Étude des niveaux d’expression d’ <i>IGF2</i> dans des fibroblastes par PCR quantitative après surexpression transitoire de <i>MEG3</i> et/ou <i>MEG8</i> dans des fibroblastes sains ou après blocage de l’expression de <i>MEG3</i> et <i>MEG8</i> dans des fibroblastes sains par des ARNs interférents. ....	53
Figure 16 : Représentation schématique des formes transmembranaire et soluble de DLK1.....	54
Figure 17 : Représentation schématique des voies de signalisation de DLK1 .....	56
Figure 18 : Expression temporo-spatiale de <i>DLK1</i> . ....	57
Figure 19 : Représentation schématique du placenta.....	68
Figure 20 : Technique de mesure des concentrations de DLK1.....	73
Figure 21 : Effet « crochet ».....	74
Figure 22 : Effet « matrice » levé par l’ajout de détergent dans le tampon.....	75
Figure 23 : Effet de la dilution sur le dosage de DLK1 dans le sérum prélevé chez des femmes durant la gestation.....	76
Figure 24 : Reproductibilité des mesures des concentrations de DLK1 .....	77
Figure 25 : Évolution des concentrations sériques de DLK1 circulant en fonction du terme de gestation.....	78
Figure 26 : Évolution des concentrations sériques de DLK1 circulant chez des témoins en fonction de leur âge chronologique.....	80
Figure 27 : Mesure des concentrations de DLK1 circulant chez des témoins en fonction de l’IMC.....	81
Figure 28 : Évolution des concentrations de DLK1 circulant chez une femme au cours de la gestation entre 14 et 31 SA.....	85

Figure 29 : Exemple de reprogrammation d'une cellule différenciée (cellule épithéliale rénale) en iPSC puis redifférenciée en chondrocyte..... 97

**TABLEAUX**

	Page
Tableau 1 : Syndromes associés à une anomalie de l’empreinte parentale responsables d’un petit poids pour l’âge gestationnel.....	32
Tableau 2 : Score clinique de Netchine-Harbison.....	35

## LISTE DES ABREVIATIONS

3C : technique de capture de la conformation des chromosomes  
4C : technique de capture circulaire de la conformation des chromosomes  
ARNs : acides ribonucléiques  
ADAM17 : ADAM Metallopeptidase Domain 17 = TACE  
ADN : acide désoxyribonucléique  
Begain : brain enriched guanylate kinase associated  
Cas9 : CRISPR associated protein 9  
CBS : CTCF binding site  
CCPPRB : comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale  
CDKN1C: cyclin-dependent kinase inhibitor 1c  
CFR : cystein rich FGF receptor  
ChiP : immunoprécipitation de la chromatine  
CNGOF : collège national des gynécologues et obstétriciens français  
CNIL : commission nationale de l'informatique et des libertés  
COST : coopération européenne en sciences et technologies  
CRESS : centre de recherche en épidémiologie et statistiques  
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats  
CTCF: CCCTC-binding factor  
DIO3: iodothyronine deiodinase 3  
DLK1: delta like non-canonical notch ligand 1  
DMR : région différenciellement méthylée  
DNMT : ADN méthyltransférase  
DPSC : cellules souches mésenchymateuses pluripotentes issues de la pulpe dentaire (Dental Pulp Stem Cells)  
DS : déviation standard  
E : stade du développement embryonnaire murin (en jours, post-coïtal)  
EDEN : étude des déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'enfant  
EGF : epidermal growth factor  
EPF : estimation de poids fœtal  
FGF : fibroblast growth factor  
FISH : hybridation in situ en fluorescence  
Flt1 : récepteur membranaire du VEGF de type 1 pro-angiogénique  
GH : hormone de croissance  
GHr : hormone de croissance recombinante  
GRB10 : growth factor receptor-bound protein 10  
H19 : transcrit soumis à empreinte H19  
HCG : gonadotrophine chorionique humaine  
HMGA2 : high mobility group at-hook 2  
HRP : peroxydase de raifort  
ICAN : institut de cardiométabolisme et nutrition  
ICR : centre d'empreinte parentale  
IG : intergénique  
IG-DMR : région différenciellement méthylée intergénique  
IGF : insulin-like growth factor  
IGFBP-1 à 6 : insulin-like growth factor binding protein 1 à 6  
IGF-R : insulin-like growth factor receptor  
IMC : indice de masse corporelle  
iPSCs : cellules souches pluripotentes induites  
IPW : gène soumis à empreinte parentale associé au syndrome de Prader-Willi  
IR : récepteur de l'insuline  
IRS : insulin receptor substrate  
KAP1 : KRAB-associated protein-1  
Kb : kilobases  
KCNQ1 : potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 1  
KCNQ1OT1 : KCNQ1-overlapping transcript 1  
KRAB : Krüppel-associated box domain  
LncARNs : longs ARNs non codants  
MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MEG3 : maternally expressed 3 (long ARN non codant)

MEG8 : maternally expressed 8 (long ARN non codant)  
MLID : atteinte de plusieurs loci soumis à empreinte parentale (atteinte multiloci)  
MiARNs : micro-ARNs  
MTESR : milieu de culture spécifique des iPSCs  
NGS : séquençage nouvelle génération  
NLRP : famille des NLR, pyrin domain-containing  
ORCHAD : équipe de recherche sur les origines précoces de la santé et du développement de l'enfant  
P1 : passage numéro 1 (culture cellulaire)  
PA : périmètre abdominal  
PAG : petit poids pour l'âge gestationnel  
PAPPA : protéine plasmatique sérique A associée à la grossesse  
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique  
PC : périmètre crânien  
PEG : gènes soumis à empreinte parentale à expression paternelle  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PGC : cellules germinales primordiales  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PLAG1 : pleomorphic adenoma gene 1  
PIGF : facteur de croissance placentaire  
PIHit : paternally expressed IGF2/H19 intergenic transcript  
PWS : syndrome de Prader-Willi  
RCIU : retard de croissance intra-utérin  
SA : semaines d'aménorrhée  
SCMC : complexe subcortical maternel  
sFLT1 : fraction soluble du récepteur membranaire du VEGF de type 1 pro-angiogénique  
SHED : cellules souches de la pulpe dentaire (dents déciduales)  
Si : petit ARN interférent  
SLO : syndrome de Smith-Lemli-Opitz  
SnoARNs : petits ARNs nucléolaires  
SRS : syndrome de Silver-Russell  
RNA-seq : séquençage d'ARN, étude du transcriptome  
TACE : tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme = ADAM17  
TADs : domaines d'association topologique  
TCF1 : facteur de transcription 1  
TET1 : ten-eleven-translocation 1  
TMB : révélateur de peroxydase  
TNDM : diabète néonatal transitoire type 1  
TRIM28 : tripartite motif-containing 28  
TS : syndrome de Temple  
UPD : disomie uniparentale  
UTR : untranslated transcribed region  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
WES : séquençage d'exome complet  
WGS : séquençage de génome complet  
ZFP57 : protéine à doigt de zinc 57 de la famille des protéines KRAB

## CONTEXTE

Selon l'enquête périnatale nationale française de 2016, 10,8% des nouveau-nés vivants avaient un poids de naissance inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile répondant à la définition du petit poids pour l'âge gestationnel (PAG). La notion de retard de croissance intra-utérin (RCIU) fait intervenir une dimension dynamique et pathologique de la croissance avec un infléchissement de la courbe d'estimation de poids fœtal. Le RCIU est une des causes principales de mortalité et de morbidité périnatales (Lees et al., 2020) et présente également des conséquences à long terme avec une augmentation du risque de développer des complications cardiovasculaires et métaboliques (hypertension artérielle, insulino-résistance, syndrome métabolique) à l'âge adulte (Kaijser et al., 2008; Newsome et al., 2003; Spence et al., 2012), ce qui justifie l'intérêt porté à la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine du RCIU. La croissance fœtale est finement régulée par de multiples facteurs, maternels, placentaires et fœtaux et enfin génétiques et épigénétiques et les causes de RCIU sont par conséquent nombreuses. La cause la plus fréquente est l'insuffisance placentaire, définie par l'incapacité du placenta à assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments au fœtus pour permettre sa croissance et son développement (Burton and Jauniaux, 2018; Ghidini, 1996). La croissance fœtale est en effet étroitement liée à la disponibilité des nutriments maternels et à leur passage transplacentaire vers le fœtus. Le système des IGFs (insulin-like growth factor) joue également un rôle essentiel dans la régulation de la croissance fœtale (Liu et al., 1993).

Les maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale, bien qu'étant des causes rares de RCIU, constituent un modèle d'étude de la régulation de la croissance fœtale. L'empreinte parentale est un mécanisme épigénétique à l'origine de l'expression mono-allélique de certains gènes en fonction de leur origine parentale (Barton et al., 1984; McGrath and Solter, 1984). Le syndrome de Silver-Russell (SRS) (Russell, 1954; Silver et al., 1953) et le syndrome de Temple

(TS) (Temple et al., 1991) sont deux maladies liées à des anomalies de l’empreinte parentale responsables d’un RCIU. Les anomalies moléculaires les plus fréquemment à l’origine de ces deux syndromes concernent respectivement les régions soumises à empreinte parentale 11p15 (locus *IGF2 (insulin-like growth factor)/H19*) (Netchine et al., 2007; Wakeling et al., 2017) et 14q32 (locus *DLK1 (delta like non-canonical notch ligand 1) /MEG3 (maternally expressed 3)*) (Temple et al., 1991). Bien que les anomalies moléculaires rencontrées chez les patients présentant un SRS et un TS concernent deux régions chromosomiques différentes, il existe un chevauchement clinique entre ces patients, comme cela a été montré précédemment par notre équipe de recherche (Geoffron et al., 2018). En effet, 76% des patients avec un TS présentent un score de Netchine-Harbison  $\geq 4/6$  et répondent donc à la définition clinique du SRS (Geoffron et al., 2018). Notre équipe de recherche a également montré lors de précédents travaux expérimentaux qu’il existe un chevauchement moléculaire entre les patients avec un SRS et un TS puisque les patients avec anomalies moléculaires de la région 14q32 sans anomalie moléculaire de la région 11p15 présentent une diminution d’expression d’*IGF2* dans les fibroblastes, comme les patients avec un SRS (Abi Habib et al., 2019). Par ailleurs, les patients avec un SRS présentent, comme les patients avec un TS, une surexpression dans les fibroblastes de certains ARNs (acides ribonucléiques) non codants exprimés à partir de l’allèle maternel de la région 14q32 (*MEG8* et certains miARNs) alors qu’ils ne présentent pas d’anomalie moléculaire de la région 14q32 (Abi Habib et al., 2019). Documenter le rôle dans la régulation de la croissance fœtale du gène soumis à empreinte parentale *DLK1*, exprimé à partir de l’allèle paternel de la région 14q32, est donc une approche intéressante pour aborder l’étude de la régulation épigénétique de la croissance fœtale. En effet, les voies de signalisation impliquées dans la transduction du signal de *DLK1* et le rôle de *DLK1* dans l’adipogenèse et dans la chondrogenèse donnent des arguments en faveur d’un rôle de *DLK1* dans la croissance fœtale (Traustadóttir et al., 2017). De plus, les modèles murins d’inactivation de *Dlk1*

présentent une restriction de croissance fœtale (Moon et al., 2002). Enfin, la diminution des concentrations sériques de DLK1 dans le sang maternel pendant la gestation humaine en cas de fœtus avec RCIU (Cleaton et al., 2016) et son rôle dans l'adaptation métabolique à la gestation donnent des arguments supplémentaires en faveur du rôle de DLK1 dans la croissance fœtale. Les récents travaux de notre équipe de recherche concernant le chevauchement clinique et moléculaire qui existe entre les patients présentant des anomalies moléculaires des régions soumises à empreinte parentale 11p15 (locus *IGF2/H19*) et 14q32 (locus *DLK1/MEG3*) et les arguments en faveur d'un rôle de DLK1 dans la régulation épigénétique de la croissance fœtale ont été à l'origine de ce travail de thèse à travers une approche translationnelle puis fondamentale.

## **ÉTAT DES CONNAISSANCES**



## **I. PHYSIOLOGIE DE L'EMPREINTE PARENTALE**

### **I.1. Mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes**

Conrad Waddington introduit pour la première fois en 1942 (Waddington, 1942) le concept de « paysage épigénétique » désignant les mécanismes modulant l'expression du génotype pour aboutir à un phénotype spécifique. Littéralement, le terme épigénétique désigne ce qui est « au-dessus de la génétique » et correspond à la modification de l'expression des gènes sans modification de la séquence de l'ADN (acide désoxyribonucléique). La régulation épigénétique de l'expression des gènes fait intervenir plusieurs mécanismes moléculaires, comme l'apposition d'un groupement méthyl sur l'ADN qui est la marque épigénétique la plus étudiée dans le génome des mammifères (Holliday and Pugh, 1975).

#### **I.1.1. Méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN correspond à l'apposition d'un groupement méthyl sur une cytosine au sein d'un dinucléotide cytosine-phospho-guanine (CpG), généralement dans des régions riches en dinucléotides CpG. La méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes est associée à un état compacté de la chromatine et diminue ainsi l'accès des facteurs de transcription au génome (Fujita et al., 2000). Par ailleurs, des protéines répressives de la transcription sont capables de lier l'ADN méthylé au niveau des promoteurs des gènes et d'inhiber leur transcription (Zhang and Pradhan, 2014). Enfin, la méthylation de l'ADN au niveau des régions intergéniques joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale (cf. I.1.4).

### **I.1.2. Modifications post-traductionnelles des histones**

Les nucléosomes, constitués d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones, constituent l'unité de base de la chromatine (Li, 2002). Le niveau de compaction de la chromatine modifie l'accessibilité de l'ADN et participe ainsi à la régulation des niveaux de transcription des gènes (Li, 2002). Les modifications post-traductionnelles au niveau de l'extrémité N-terminale des queues d'histones (méthylation, acétylation, phosphorylation et ubiquitinylation) forment un « code » histone qui modifie l'état de condensation de la chromatine (Jenuwein and Allis, 2001). Le niveau de condensation de la chromatine modifie l'accès à la séquence d'ADN des facteurs impliqués dans la régulation de la transcription des gènes (Zhang and Pradhan, 2014), et en conséquence régule leur niveau d'expression (Jenuwein and Allis, 2001). A titre d'exemple la marque H3K4me3 qui fait référence à la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est associée à un état actif de la transcription alors que la marque H3K9me3 qui fait référence à la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est associée à un état compacté de la chromatine et donc à une diminution des niveaux d'expression des gènes (Jenuwein and Allis, 2001).

### **I.1.3. ARNs non codants**

Les ARNs non codants sont des transcrits qui ne codent pas pour des protéines. Ils ont un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes. Les ARNs non codants peuvent empêcher l'accessibilité des facteurs de transcription aux promoteurs des gènes, bloquer des sites d'épissage alternatif ou agir de manière post-transcriptionnelle (Lee, 2012; Ransohoff et al., 2018). Les ARNs non codants participent au remodelage de la chromatine en ciblant les complexes modificateurs de la chromatine (Lee, 2012). Parmi les ARNs non codants, les microARNs (miARNs) sont des molécules de 19 à 24 nucléotides qui effectuent une régulation post-transcriptionnelle des gènes en favorisant la dégradation des ARNs messagers ou en inhibant la traduction des ARNs messagers en protéines (Bartel, 2009; Guo et al., 2010). Les

longs ARNs non-codants (lncARNs) sont des molécules de plus de 200 nucléotides. Les lncARNs ont un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes (cf. I.2.3), dans les mécanismes d'empreinte parentale (cf. I.1.4) et dans l'inactivation du chromosome X (Ransohoff et al., 2018). Les petits ARNs nucléolaires (snoARN) sont impliqués dans la modification post-transcriptionnelle d'ARNs non codants. Ils pourraient également être les précurseurs de miARNs (Ender et al., 2008; Scott and Ono, 2011).

#### I.1.4. Empreinte parentale

L'empreinte parentale est un mécanisme épigénétique qui permet l'expression mono-allélique de certains gènes en fonction de leur origine parentale (Fig.1) (Barton et al., 1984; McGrath and Solter, 1984). A l'heure actuelle, environ 150 gènes ont été identifiés comme soumis à empreinte parentale chez l'humain selon la base de données « geneimprint » ([www.geneimprint.com](http://www.geneimprint.com)).

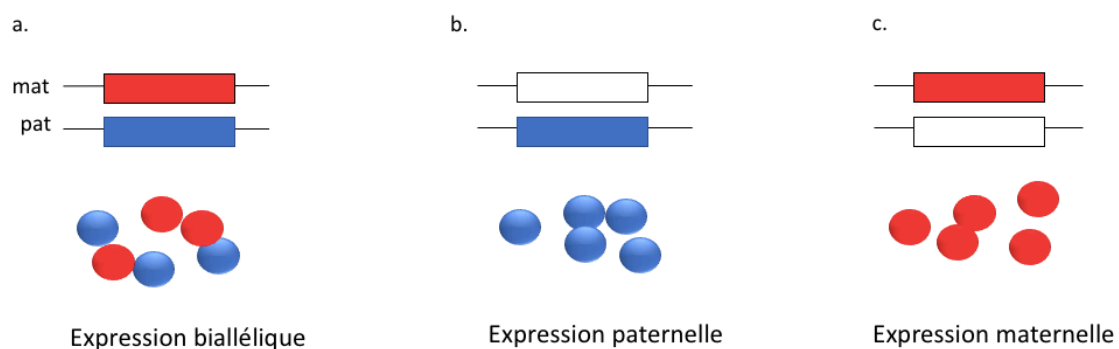


Figure 1 : Phénomène d'empreinte parentale. a. Les gènes qui ne sont pas soumis à empreinte parentale sont exprimés à partir des deux allèles, l'expression est dite biallélique. b. Gène soumis à empreinte parentale exprimé uniquement à partir de l'allèle paternel. c. Gène soumis à empreinte parentale exprimé uniquement à partir de l'allèle maternel. Ronds rouges : transcrits d'origine maternelle, ronds bleus : transcrits d'origine paternelle.

Le concept d'empreinte parentale a émergé à la fin des années 1980 suite à la démonstration de non-équivalence des génomes paternel et maternel (Barton et al., 1984; McGrath and Solter, 1984). Des expériences de transferts nucléaires dans des œufs de souris fécondés ont montré que la contribution des génomes mâle et femelle était indispensable pour la formation et le développement d'un embryon et des annexes embryonnaires, et que l'obtention d'un génome diploïde avec contribution uniquement maternelle ou paternelle n'aboutissait pas au développement normal de l'embryon (Barton et al., 1984; McGrath and Solter, 1984). Chez l'humain, la survenue de mûles hydatiformes, résultant de la fécondation d'un ovocyte sans noyau par un spermatozoïde avec duplication des chromosomes mâles illustre la nécessité d'un génome avec double contribution maternelle et paternelle pour former un embryon et ses annexes (Lindor et al., 1992). Des expériences de croisement de souris présentant des remaniements chromosomiques (translocations robertsoniennes 11;13 ou 2;11) ont permis de démontrer que le phénotype des souris variait en termes de croissance et de développement selon l'origine parentale de la disomie uniparentale du chromosome 11 murin obtenue suite à ces croisements (Cattanach and Kirk, 1985). Ces expériences ont permis d'établir une première carte des régions génomiques soumises à empreinte parentale. Les premiers gènes soumis à empreinte parentale ont ensuite été identifiés dans les années 90 suite à des expériences d'inactivation de gènes. Les travaux de Thomas M. DeChiara sur des modèles murins d'inactivation d'*Igf2* ont mis en évidence l'expression mono-allélique de ce gène à partir de l'allèle paternel (DeChiara et al., 1990). La transmission maternelle d'une inactivation de *Igf2* n'avait pas de retentissement sur la taille et le poids de naissance des souriceaux alors que l'inactivation de l'allèle paternel d'*Igf2* conduisait à des souriceaux avec un déficit de poids de 40% (DeChiara et al., 1990, 1991).

Selon la théorie du conflit parental, les gènes exprimés pendant la gestation à partir de l'allèle maternel viseraient à préserver les ressources maternelles aux dépens de la croissance fœtale et

placentaire alors que les gènes à expression paternelle favoriseraient l'apport énergétique au fœtus et la croissance fœto-placentaire aux dépens de la mère (Haig, 1997; Iwasa, 1998; Moore and Haig, 1991; Moore and Reik, 1996).

## **I.2. Mécanismes de contrôle de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale**

### **I.2.1. Regroupement des gènes soumis à empreinte parentale dans des régions chromosomiques**

Les gènes soumis à empreinte parentale sont regroupés dans une quarantaine de grandes régions chromosomiques riches en îlots CpG (Mackay and Temple, 2017). Une même région chromosomique peut comporter des gènes soumis à empreinte parentale exprimés à partir de l'allèle maternel et/ou de l'allèle paternel (Mackay and Temple, 2017). Certains gènes peuvent avoir une expression biallélique dans certains tissus et mono-allélique dans d'autres, le phénomène d'empreinte parentale n'étant pas nécessairement ubiquitaire (Buiting et al., 2008; Hayward et al., 1998; Kishino et al., 1997; Mackay and Temple, 2017). A titre d'exemple, le gène *Igf2* est soumis à empreinte parentale de manière quasi ubiquitaire durant la vie fœtale chez la souris, (DeChiara et al., 1991) à l'exception du système nerveux central où *Igf2* a une expression biallélique dans les leptoméniges et dans les plexus choroïdes (DeChiara et al., 1991; Hu et al., 1995; Pham et al., 1998). Chez l'humain, *IGF2* a également une expression biallélique dans le cerveau pendant la vie fœtale (Pham et al., 1998).

### **I.2.2. Méthylation différentielle des centres d'empreinte parentale**

Un des mécanismes les plus étudiés de régulation de l'expression mono-allélique des gènes soumis à empreinte parentale est la méthylation différentielle de dinucléotides CpG au sein de régions d'ADN appelées centres d'empreinte parentale (ICR ou « imprinting control region »)

ou régions différentiellement méthylées (DMR ou « differentially methylated region ») primaires, qui contrôlent en cis l'expression mono-allélique de l'ensemble des gènes soumis à empreinte d'un domaine (Lopes et al., 2003). La plupart des ICRs sont méthylés sur l'allèle maternel (Reik and Walter, 2001). Chez l'humain, seuls les ICRs *H19/IGF2:IG-DMR* en 11p15 et *MEG3/DLK1:IG-DMR* en 14q32 situés dans des régions intergéniques (IG) sont méthylés sur l'allèle paternel (Llères et al., 2019).

L'importance du processus de méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression mono-allélique des gènes soumis à empreinte parentale a été mise en évidence par des expériences murines de délétion de l'*ADN méthyltransférase 1 (Dnmt1)*, protéine responsable du maintien des marques de méthylation des ICRs lors des stades préimplantatoires du développement embryonnaire (Leonhardt et al., 1992). L'invalidation de *Dnmt1* entraîne une mortalité importante des embryons murins au 11<sup>ème</sup> jour après la fécondation (E11) et une relaxation de l'empreinte parentale avec une expression biallélique des gènes soumis à empreinte parentale comme par exemple *H19* (Li et al., 1993). Cependant, dans ces modèles murins d'invalidation de *Dnmt1*, quelques gènes gardent une expression mono-allélique. Le gène *Ascl2* exprimé à partir de l'allèle maternel du chromosome 7 murin (homologue du chromosome 11 humain) garde une expression mono-allélique alors que l'ICR de cette région perd sa méthylation différentielle en cas d'invalidation de *Dnmt1* (Caspary et al., 1998; Lewis et al., 2004). Bien que la méthylation différentielle des ICRs ait un rôle primordial dans la régulation de l'expression mono-allélique des gènes soumis à empreinte parentale, cette constatation suggère l'existence d'autres mécanismes de régulation.

### **I.2.3. Régulation en cis et en trans par les longs ARNs non codants**

Les lncARNs peuvent exercer une régulation positive sur l'expression en cis des gènes d'un domaine en recrutant des facteurs de transcription ou une régulation négative en recrutant des

répresseurs de la transcription comme par exemple la lysine méthyltransférase G9A responsable d'une diméthylation de la lysine 9 de l'histone 3, marque associée à un état compacté de la chromatine (Lewis et al., 2004; Patten et al., 2016).

Les lncARNs peuvent également exercer une régulation en trans sur des régions éloignées de leur domaine d'origine. Cette régulation en trans de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale illustre l'organisation de ces gènes en réseau. La première démonstration de l'organisation en réseau des gènes soumis à empreinte parentale avait été faite par une équipe française à l'aide d'un modèle murin avec invalidation paternelle de *Zac1*, homologue murin du gène soumis à empreinte parentale humain *PLAGL1*, impliqué dans le diabète néonatal transitoire (Varrault et al., 2006). Dans ce modèle murin, l'inactivation de *Zac1* induit des modifications d'expression d'autres gènes soumis à empreinte parentale comme *Igf2*, *Dlk1*, *Grb10* (*growth factor receptor-bound protein 10*), *Cdkn1c* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1C*), exprimés à partir de régions distantes de la région de *Zac1*. A l'aide d'un modèle murin de délétion d'*H19*, Gabory *et al.* ont montré que la perte d'expression du lncARN *H19* exprimé à partir de l'allèle maternel de la région 11p15 induit une surexpression à E14.5 de plusieurs autres gènes soumis à empreinte parentale parmi lesquels *Cdkn1c*, *Igf2*, *Dlk1*, *Rtl1*, *Gnas* et *Peg3* exprimés à partir de régions chromosomiques différentes (Gabory et al., 2009) (Fig.2).

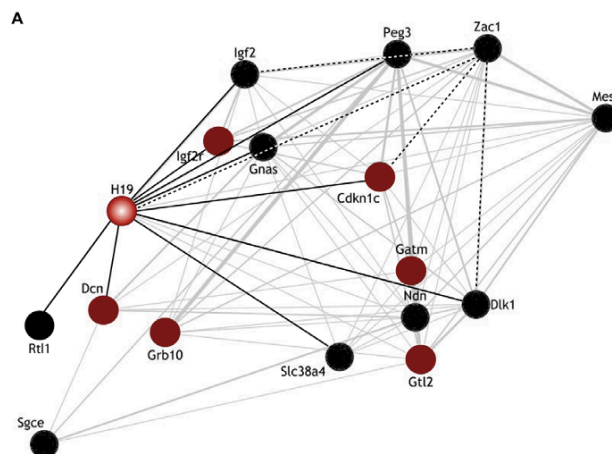


Figure 2 : Organisation en réseau des gènes soumis à empreinte parentale chez la souris. Les gènes à expression maternelle sont représentés en rouge, les gènes à expression paternelle en noir. D'après Gabory et al., 2009.

Chez l'humain, la surexpression ou l'inactivation d'ARNs non codants exprimés à partir de la région soumise à empreinte parentale 14q32 dans des fibroblastes *in vitro* induit une modification du niveau d'expression des gènes soumis à empreinte parentale de la région 11p15 (Abi Habib et al., 2019). Les travaux menés précédemment au sein de notre laboratoire ont en effet permis de mettre en évidence *in vitro* que l'expression d'*IGF2* à partir de la région 11p15 dans des fibroblastes de patients présentant une perte de méthylation en 14q32 est régulée en trans par la surexpression des lncARNs *MEG3* et *MEG8* exprimés à partir de l'allèle maternel de la région 14q32 (Abi Habib et al., 2019). L'équipe de Nissim Benvenisti a également mis en évidence *in vitro* chez l'humain dans des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) que la surexpression du lncARN IPW (imprinted gene in the Prader-Willi syndrome) exprimé à partir de la région soumise à empreinte 15q13 induit une diminution d'expression de gènes exprimés à partir de l'allèle maternel de la région 14q32 (Stelzer et al., 2014).

#### **I.2.4. Conformation chromatinienne et domaines d'association topologique (TADs)**

La régulation en trans de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale fait également intervenir des protéines insulatrices, dont le rôle est d'isoler les séquences activatrices (« *enhancer* ») des promoteurs des gènes, comme le facteur CCCCTC-binding factor (CTCF) (Hark et al., 2000) (Fig.3). Le facteur CTCF est une protéine à doigt de zinc qui se fixe à l'ADN sur des sites de fixation de CTCF appelés CBS (CTCF binding site) (Bell et al., 1999). A la fin des années 1990, Bell et Felsenfeld ont montré dans des modèles cellulaires murins et humains l'existence de sites de fixation de CTCF au sein de l'ICR *IGF2/H19:IG-DMR* en 11p15 (Bell and Felsenfeld, 1999). La méthylation de cet ICR sur l'allèle paternel empêche la fixation de CTCF sur ces CBS. La délétion des CBS au sein de l'ICR *IGF2/H19:IG-DMR* conduit à l'expression biallélique d'*IGF2* et à l'absence d'expression d'*H19* (Bell and Felsenfeld, 1999). *H19* et *IGF2* partagent des séquences activatrices (« *enhancer* ») communes, mais la fixation



de CTCF sur l'allèle maternel de cet ICR empêche l'action de cette séquence activatrice sur le promoteur du gène *IGF2* (Fig.3). Ainsi, en se fixant sur l'allèle maternel, CTCF est capable de constituer une barrière au sein de la région *IGF2/H19* et contrôle l'expression mono-allélique d'*IGF2* à partir de l'allèle paternel (Hark et al., 2000) (Fig.3).

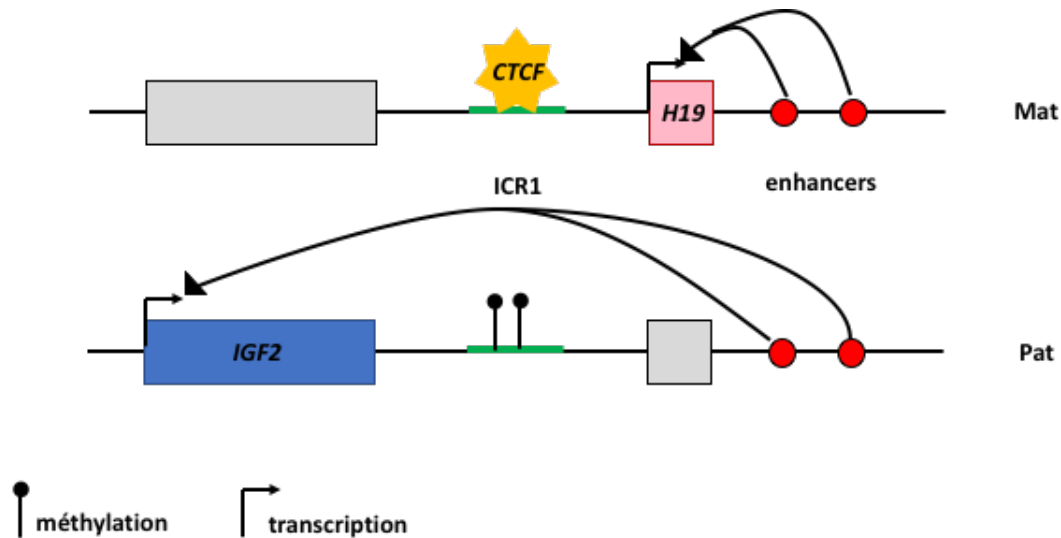


Figure 3 : Représentation schématique en deux dimensions de la région télomérique de la région 11p15. La fixation de CTCF sur l'allèle maternel (Mat) non méthylé de l'ICR empêche l'action des séquences activatrices (« enhancer ») sur le promoteur d'*IGF2*. *IGF2* est exprimé uniquement à partir de l'allèle paternel (Pat). ICR1 : centre d'empreinte *IGF2/H19:IG-DMR*, « enhancer » : séquence activatrice.

Plus récemment, en combinant des approches de génomique (capture de la conformation des chromosomes ou 3C et capture circulaire de la conformation des chromosomes ou 4C) et de microscopie à haute résolution (hybridation par fluorescence in situ tridimensionnelle ou ADN FISH) chez la souris et chez l'humain, des équipes ont fait évoluer ce modèle en deux dimensions en montrant le rôle de l'organisation tridimensionnelle du génome dans la régulation de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale (Bonev et al., 2017; Dixon et al., 2012). Les domaines d'association topologique (TADs) sont des unités structurales et fonctionnelles du génome dont la découverte a modifié la vision de la structure du génome et

de la régulation transcriptionnelle des gènes (Rao et al., 2014). Les TADs correspondent à des domaines chromatiniens au sein desquels il existe de nombreuses interactions entre des gènes exprimés à partir de régions distantes du génome (Dixon et al., 2012) et sont représentés sous forme de triangles par les matrices d'étude de la conformation tridimensionnelle du génome (Fig.4) (Llères et al., 2019).

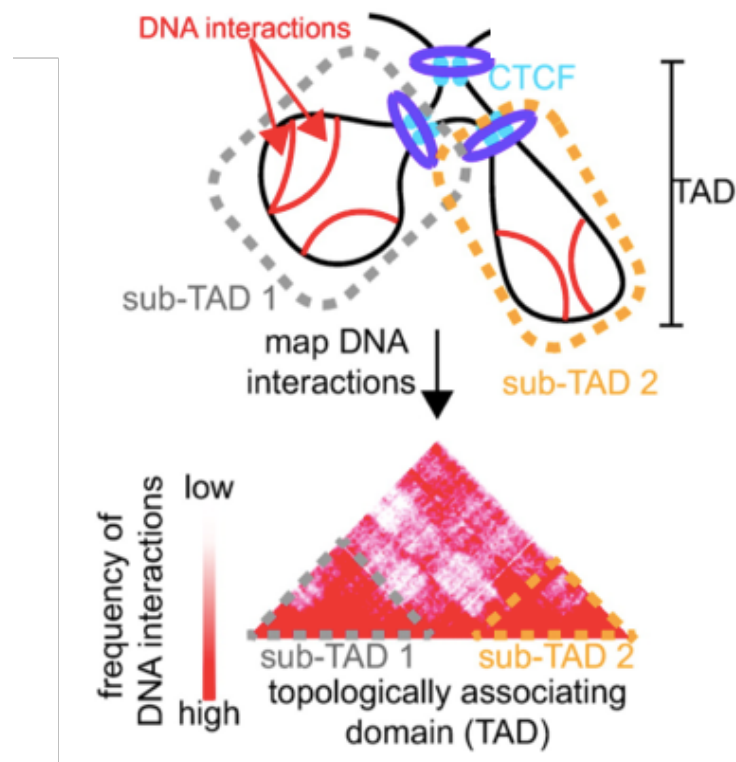


Figure 4 : Représentation d'un domaine d'association topologique (TAD), composé de plusieurs sous domaines (sub-TAD). L'intensité du signal rouge au sein de la représentation sous forme de triangle du TAD correspond à l'importance du nombre des interactions qui existent entre les gènes de la région. DNA : ADN. Low : faible, High : élevé. D'après (Paik et al., 2021).

Le facteur CTCF joue un rôle important dans cette organisation tridimensionnelle du génome (Fig.4) (Nora et al., 2017). Grâce à des modèles murins de déplétion de la protéine CTCF, Nora et al. ont montré que CTCF est nécessaire à la formation des boucles chromatiniennes qui permettent le rapprochement de deux régions distantes du génome et la mise en relation par

exemple d'un facteur de transcription avec un promoteur initialement distant (Nora et al., 2017). Le repliement sous forme de boucles tridimensionnelles des chromosomes grâce à la fixation de CTCF sur le génome conduit à la formation des TADs (Nora et al., 2017). Au sein des régions soumises à empreinte parentale, les interactions au sein des TADs sont identiques sur les allèles paternels et maternels, à l'exception des régions humaines 11p15 et 14q32 et leurs régions homologues murines (Rovina et al., 2020). Sur ces deux régions chromosomiques il existe des sites de fixation de CTCF. La fixation de CTCF sur l'allèle maternel non méthylé de la région *Igf2/H19* induit la formation d'une boucle chromatiniennne rapprochant le promoteur d'*H19* des séquences activatrices (« *enhancer* ») de la région, alors que l'absence de fixation de CTCF sur l'allèle paternel méthylé permet le rapprochement du promoteur d'*Igf2* des séquences activatrices (« *enhancer* ») (Kurukuti et al., 2006; Murrell et al., 2004). Chez l'humain, les délétions maternelles emportant les sites de fixation de CTCF augmentent l'expression d'*IGF2* et sont à l'origine d'un excès de croissance (syndrome de Beckwith Wiedemann) (De Crescenzo et al., 2011).

### **I.3. Mise en place et maintien de l'empreinte parentale**

L'établissement de la méthylation des ICRs a lieu durant la gamétogénèse au stade de cellules germinales primordiales (Smallwood and Kelsey, 2012). Les cellules germinales primordiales subissent une déméthylation puis une reméthylation de l'ADN en fonction du sexe de l'embryon (Hajkova et al., 2002). La méthylation est ensuite maintenue durant les divisions cellulaires jusqu'à la fécondation (Hajkova et al., 2002). Après la fécondation, le génome du zygote subit une nouvelle vague de déméthylation puis une reméthylation au stade de blastocyste avant l'implantation. Cette deuxième vague de déméthylation concerne l'ensemble du génome à l'exception des ICRs qui conservent leur niveau de méthylation (Smallwood and Kelsey, 2012) (Fig. 5). Par ailleurs, il existe des DMRs secondaires qui par définition acquièrent

ou perdent leur méthylation différentielle au cours du développement sous le contrôle des ICRs (Lopes et al., 2003).

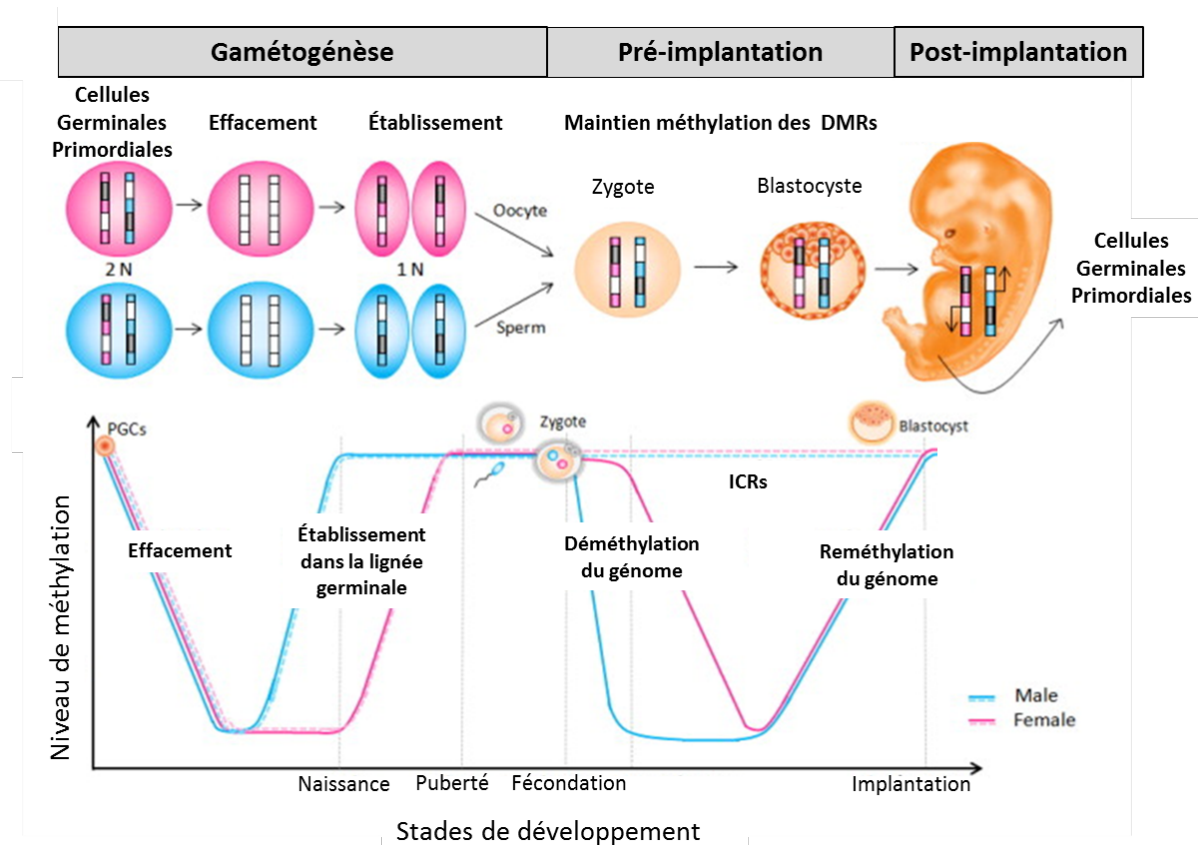


Figure 5 : Niveau de méthylation du génome et des ICRs pendant la gamétogénèse et les stades embryonnaires préimplantatoires. ICR : centre d’empreinte parentale. DMR : région différenciellement méthylée, PGC : cellule germinale primordiale. D’après Smallwood and Kelsey, 2012.

Les mécanismes à l’origine de la mise en place et du maintien de la méthylation de l’ADN des régions soumises à empreinte parentale sont mal connus. Les ADN méthyltransférases de la famille des *DNMT3* jouent un rôle important dans la méthylation *de novo* de l’ADN. L’étude de modèles murins d’inactivation des ADN méthyltransférases *Dnmt3a* et *Dnmt3b* a montré leur rôle central dans la méthylation *de novo* des ICRs (Okano et al., 1999). *Dnmt3l* agit comme cofacteurs de ces dernières (Bourc’his et al., 2001). Dans les ovocytes, seules les ADN méthyltransférases *Dnmt3a* and *Dnmt3l* sont impliquées dans la méthylation des centres d’empreinte, *Dnmt3b* n’étant exprimé que dans les gamètes mâles (Kaneda et al., 2004).

L'ADN méthyltransférase Dnmt1 est impliquée dans le maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires, particulièrement lors de la vague de déméthylation globale du génome dans les stades préimplantatoires (Hata et al., 2002). Bien que le rôle majeur des ADN méthyltransférases de la famille des Dnmt3 dans l'apposition et le maintien de la méthylation des ICRs soit bien établi, ces ADN méthyltransférases ne possèdent pas de domaine de liaison spécifique aux ICRs. La protéine *Zfp57*, protéine à doigts de zinc de la famille des protéines KRAB (Krüppel-associated box domain), se fixe sur le motif TGCCGC présent dans les ICRs (Hirasawa and Feil, 2008; Li et al., 2008) et forme un complexe avec son cofacteur Kap1 (KRAB-associated protein-1, également appelé Tripartite motif-containing 28 Trim28) (Zuo et al., 2012) qui permet le recrutement des ADN méthyltransférases de la famille Dnmt3. L'inactivation de *Zfp57* dans des cellules souches embryonnaires murines *in vitro* est responsable d'une perte de la méthylation différentielle de l'ensemble des ICRs avec une relaxation de l'empreinte parentale (Riso et al., 2016). En revanche, les modèles murins d'inactivation homozygote de *Zfp57* présentent une perte de la méthylation différentielle des ICRs seulement dans certaines régions soumises à empreinte et dans certains tissus (par exemple perte de méthylation en 15q11-q13 uniquement dans le cerveau, le foie et le placenta murin) (Li et al., 2008; Takahashi et al., 2015). Chez l'humain, des mutations de *ZFP57* ont été rapportées pour la première fois en 2008 chez des patients présentant un diabète néonatal transitoire par perte de méthylation de l'ICR de la région soumise à empreinte parentale 6q24 (Mackay et al., 2008). Ces patients présentaient des anomalies de méthylation à plusieurs loci soumis à empreinte parentale ou atteinte multiloci (cf II.2) (Mackay et al., 2008). Chez l'humain, les mutations perte de fonction de *ZFP57* n'ont un impact sur la méthylation que de quelques ICRs (Bak et al., 2016; Boonen et al., 2013; Court et al., 2013). L'absence de *ZFP57* dans les ovocytes humains suggère un rôle moins important de cette protéine par rapport à son orthologue murin (Okoe et al., 2014). Plus récemment, Takahashi *et al.* ont mis en évidence le

rôle de la protéine de la famille des protéines à doigt de zinc KRAB Znf445/ZNF445 dans la mise en place et le maintien après la fécondation de la méthylation des ICRs dans des cellules souches embryonnaires murines et humaines (Takahashi et al., 2019). Znf445, comme Zfp57, forme un complexe avec Kap1. Chez l'humain, Kagami *et al.* ont rapporté pour la première fois en 2021 une mutation de *ZNF445* chez un patient présentant un syndrome de Temple par perte de méthylation de l'ICR de la région soumise à empreinte 14q32, associée à une perte de méthylation d'autres régions soumises à empreinte parentale (11p15 et 20q13) (Kagami et al., 2021).

## **II. SYNDROMES LIÉS A DES ANOMALIES DE L'EMPREINTE PARENTALE**

Une dizaine de syndromes liés à des anomalies de l’empreinte parentale a été décrite en pathologie humaine (Mackay and Temple, 2017). Il existe fréquemment dans ces syndromes une restriction ou un excès de croissance fœtale (Mackay and Temple, 2017). Des atteintes d’une même région chromosomique soumise à empreinte parentale peuvent donner deux syndromes en miroir en fonction du type d’anomalie moléculaire (Mackay and Temple, 2017). A titre d’exemple, une perte de méthylation de l’ICR du domaine télomérique de la région soumise à empreinte parentale 11p15 (*H19/IGF2:IG-DMR*) est responsable d’un phénotype avec restriction de croissance fœtale (syndrome de Silver-Russell) (Gicquel et al., 2005; Russell, 1954; Silver et al., 1953) alors qu’un gain de méthylation de cet ICR induit un excès de croissance fœtale (syndrome de Beckwith-Wiedemann) (Brioude et al., 2018; Reik et al., 1995; Wiedemann, 1964). De même, une perte de méthylation de l’ICR de la région soumise à empreinte parentale 14q32 (*DLK1/MEG3:IG-DMR*) est responsable d’un phénotype avec restriction de croissance fœtale et placentaire (syndrome de Temple) (Temple et al., 1991) alors qu’un gain de méthylation de cet ICR est responsable du syndrome de Kagami-Ogata fréquemment associé à un excès de croissance fœtale et placentaire (Kagami et al., 2015). Nous nous concentrerons dans ce travail sur les syndromes avec restriction de croissance fœtale.

### **II.1. Syndromes liés à des anomalies de l’empreinte parentale responsables d’un retard de croissance intra-utérin**

Plusieurs syndromes liés à une anomalie moléculaire dans des régions chromosomiques soumises à empreinte parentale sont associés à une restriction de croissance fœtale (Tableau 1) (Finken et al., 2018; Russell, 1954; Silver et al., 1953; Temple et al., 1991). Le RCIU est constant dans le syndrome de Silver-Russell et inconstant dans d’autres syndromes (95% dans

la pseudopseudohypoparathyroïdie par mutation de l'allèle paternel de *GNAS*, 90% dans le syndrome de Temple, 50% dans le syndrome de Prader-Willi, 37% dans la pseudohypoparathyroïdie avec mutation de l'allèle maternel de *GNAS* ) (Angulo et al., 2015; Dixit et al., 2013; Finken et al., 2018; Geoffron et al., 2018).



	Syndrome de Silver-Russell	Disomie uniparentale du chromosome 20	Syndrome de Temple	Syndrome de Prader-Willi	Pseudopseudohypoparathyroïdie	Syndrome IMAGE
OMIM	#180860	#617352	#616222	#176270	#612463	#614732
Mécanismes moléculaires	11p15 <i>H19/IGF2</i> :IG-DMR LOM, CNVs, upd(7)mat, mutations de <i>CDKN1C</i> , <i>IGF2</i> , <i>PLAG1</i> , <i>HMGA2</i>	upd(20)mat	upd(14)mat, délétion 14q32 paternelle, <i>DLK1/MEG3</i> :IG-DMR LOM	Délétion paternelle 15q11-13, upd(15)mat, mutations du centre d’empreinte 15q11-13, mutations <i>SNRPN</i> et <i>NDN</i>	Mutations de l’allèle paternel de <i>GNAS1</i>	Mutations gain de fonction de l’allèle maternel de <i>CDKN1C</i>
Autres caractéristiques cliniques	Retard de croissance post-natal, macrocéphalie relative, front bombant, difficultés alimentaires, asymétrie corporelle	Retard de croissance post-natal, difficultés alimentaires sévères, hypotonie et retard de développement psychomoteur inconstant. Pas de macrocéphalie relative	Retard de croissance post-natal, macrocéphalie relative, front haut, acromicrie, difficultés alimentaires, puberté précoce, obésité précoce, hypotonie néonatale	Hypotonie néonatale, difficultés alimentaires puis hyperphagie, obésité, troubles du comportement, déficience intellectuelle, hypogonadisme	Petite taille à l’âge adulte, obésité, ossifications sous-cutanées, dysplasie osseuse, brachydactylie	Hypoplasie congénitale des surrénales, bosses frontales, macrocéphalie relative à la naissance, anomalies des organes génitaux, anomalies osseuses

Tableau 1 : Syndromes associés à une anomalie de l’empreinte parentale responsables d’un petit poids pour l’âge gestationnel. LOM : perte de méthylation. CNVs : copy number variant, anomalie de nombre des chromosomes, mat : maternel, pat : paternel, upd : disomie uniparentale. D’après Finken et al., 2018

## II.2. Mécanismes moléculaires à l'origine des maladies de l'empreinte parentale

La survenue de syndromes liés à des anomalies de l'empreinte parentale peut être secondaire à des anomalies génétiques ou épigénétiques qui modifient l'expression des gènes de la région (Mackay and Temple, 2017). Les délétions, duplications ou mutations entraînent une modification de l'expression d'un gène soumis à empreinte parentale si elles intéressent l'allèle parental à partir duquel il est exprimé (Mackay and Temple, 2017). Des disomies uniparentales (deux copies d'un chromosome provenant du même parent et absence de copie provenant de l'autre parent) entraînent l'expression biallélique de certains gènes et l'absence d'expression d'autres gènes. On parle d'isodisomie si la disomie concerne le même chromosome et d'hétérodisomie s'il s'agit de deux chromosomes homologues différents mais issus du même parent (Mackay and Temple, 2017). Enfin, des anomalies épigénétiques avec perte ou gain de méthylation au niveau d'un ICR peuvent être à l'origine d'une modification des niveaux d'expression des gènes de la région chromosomique concernée (Mackay and Temple, 2017). Certaines anomalies moléculaires à l'origine de pathologies de l'empreinte parentale surviennent de façon post-zygotique et sont présentes en mosaïque, dans certains tissus uniquement (Sanchez-Delgado et al., 2016).

Certains patients avec des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale présentent des anomalies de méthylation au niveau de plusieurs ICRs de régions soumises à empreinte parentale (atteinte multi-loci ou MLID) (Mackay and Temple, 2017). La proportion de ces anomalies multiples de méthylation est variable selon le syndrome identifié (50% des cas chez les patients atteints de diabète néonatal transitoire, 59% chez les patients atteints de syndrome de Temple, 25% chez les patients atteints de syndrome de Beckwith-Wiedemann avec perte de méthylation de l'ICR *KCNQ1OT1*:TSS-DMR et autour de 10% chez les patients atteints de syndrome de Silver-Russell par perte de méthylation de l'ICR *H19/IGF2*:IG-DMR) (Geoffron

et al., 2018; Mackay et al., 2015). La proportion mise en évidence de ces anomalies multiples de méthylation varie également en fonction des tissus étudiés et du nombre de loci soumis à empreinte explorés (Azzi et al., 2014; Eggermann et al., 2014). Des mutations des gènes impliqués dans la mise en place ou le maintien de la méthylation des centres d'empreinte (*ZFP57*, *ZNF445*, cf I.3) ont été identifiées chez des patients présentant une atteinte multiloci. Des mutations des gènes du complexe subcortical maternel (SCMC) de la famille des *NLRP* (*NLRP5*, *NLRP2* ou *NLRP7*) ont été identifiées chez les mères de patients présentant une atteinte multiloci (Li et al., 2008; Soellner et al., 2017). Les protéines du SCMC, exprimées dans l'ovocyte, sont nécessaires au développement de l'embryon juste après la fécondation au cours des premières divisions cellulaires avant l'activation du génome du zygote (Li et al., 2008). Le SCMC est nécessaire à la mise en place de la méthylation des ICRs dans les cellules germinales et au maintien des niveaux de méthylation au tout début de la fécondation (Tian et al., 2009).

### **II.3. Syndrome de Silver-Russell**

#### **II.3.1. Manifestations cliniques du syndrome de Silver-Russell**

Le SRS est une cause rare de RCIU. En période néonatale, il associe des difficultés alimentaires, une hypotonie, des hypoglycémies, une macrocéphalie relative et un front bombant ainsi que quelques particularités morphologiques chez un nouveau-né PAG (Fig.6). Par la suite, les enfants atteints de SRS présentent un retard de croissance postnatal nécessitant la plupart du temps un traitement par hormone de croissance recombinante (GHr), une puberté survenant souvent tôt et d'évolution rapide ainsi que des troubles métaboliques.

La définition du SRS est clinique (Wakeling et al., 2017). Le diagnostic de SRS est considéré si le patient présente au moins quatre des six critères du score de Netchine-Harbison, ce qui mène à une analyse moléculaire (Tableau 2). En l'absence de cause moléculaire identifiée, et

après exclusion des diagnostics différentiels, le diagnostic de SRS est posé si le patient présente au moins quatre des six critères incluant le front bombant et la macrocéphalie relative.



Figure 6 : Photographies d'un patient présentant un syndrome de Silver-Russell. 1A, de face, visage triangulaire, micrognathie. 1B, de profil, front bombant. (Marsaud et al., 2015).

Nouveau-né PAG	Poids de naissance et/ou taille de naissance $\leq -2$ DS pour l'âge gestationnel
Retard de croissance postnatal	Taille à $24 \pm 1$ mois $\leq -2$ DS ou plus de 2 DS sous la taille cible
Macrocéphalie relative à la naissance	Périmètre crânien à la naissance $\geq 1.5$ DS par rapport au DS de poids et/ou taille de naissance
Front bombant	De profil, projection du front en avant du plan facial, entre 1 et 3 ans
Asymétrie corporelle	Asymétrie de longueur des membres inférieurs $\geq 0.5$ cm ou asymétrie de longueur des membres supérieurs ou asymétrie de longueur des membres inférieurs $< 0.5$ cm avec au moins une asymétrie de deux autres parties du corps
Difficultés alimentaires et/ou IMC bas	IMC $\leq -2$ DS à 14 mois ou nécessité de nutrition artificielle sur sonde ou stimulation de l'appétit par cyproheptadine

Tableau 2 : Score clinique de Netchine-Harbison. PAG : Petit poids pour l'âge gestationnel. DS : Déviation standard. IMC : Indice de masse corporelle.

L'anomalie moléculaire la plus fréquemment identifiée dans le SRS est une perte de méthylation de l'ICR *H19/IGF2*:IG-DMR de la région 11p15 (Netchine et al., 2007).

### II.3.2. Région soumise à empreinte parentale 11p15

La région soumise à empreinte parentale humaine 11p15 (Fig.7) contient deux domaines. La région murine homologue est située sur le bras court du chromosome 7. Le domaine télomérique comprend le centre d'empreinte *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) méthylé sur l'allèle paternel, qui contrôle l'expression d'*IGF2* à partir de l'allèle paternel et du lncARN *H19* à partir de l'allèle maternel. Le domaine centromérique comprend le centre d'empreinte *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2), méthylé sur l'allèle maternel, qui contrôle l'expression des gènes *CDKN1C*, *KCNQ1* (*potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1*) et *KCNQ1OT1* (*KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*).

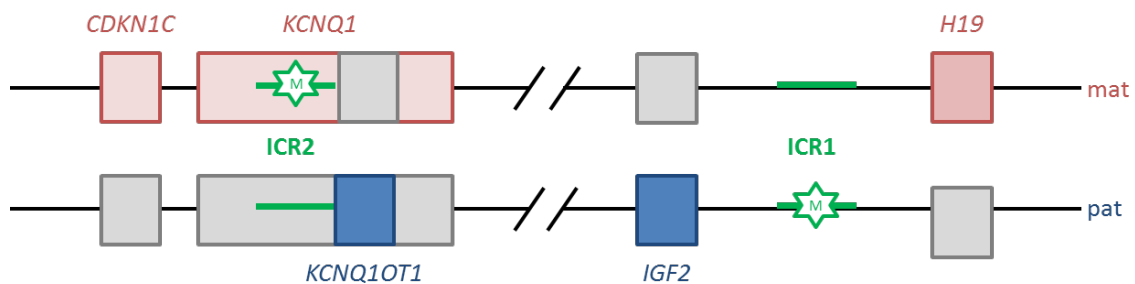


Figure 7 : Région soumise à empreinte parentale 11p15. En situation physiologique, le centre d'empreinte *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) est méthylé uniquement sur l'allèle paternel, permettant l'expression d'*IGF2* à partir de l'allèle paternel et du lncARN *H19* à partir de l'allèle maternel. Le centre d'empreinte *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2) est méthylé uniquement sur l'allèle maternel, induisant l'expression de *CDKN1C* et *KCNQ1* à partir de l'allèle maternel, et de *KCNQ1OT1* à partir de l'allèle paternel.

### **II.3.2.1.      **Domaine télomérique *IGF2/H19*****

#### **II.3.2.1.1.    **Centre d’empreinte parental *H19/IGF2:IG-DMR*****

L’expression mono-allélique des gènes *H19* et *IGF2* est sous le contrôle du centre d’empreinte parental *H19/IGF2:IG-DMR*, situé environ 2kb en 5’ du gène *H19*. Ce centre d’empreinte est méthylé uniquement sur l’allèle paternel. Le centre d’empreinte *H19/IGF2:IG-DMR* comporte des sites de fixation de ZFP57 indispensable au maintien de la méthylation (Quenneville et al., 2011) (cf I.3), des sites de fixation de CTCF (Bell et al., 1999) (cf I.2.4) et des sites de fixation des cofacteurs de CTCF, que sont OCT4 et SOX2 qui protègent l’allèle maternel de la méthylation (Abi Habib et al., 2014; Demars et al., 2010; Poole et al., 2012).

#### **II.3.2.1.2.    **IGF-II et système des IGFs****

Le gène *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*) est un des acteurs majeurs du contrôle de la croissance fœtale chez l’humain (Begemann et al., 2015; Gicquel et al., 2005) et chez la souris (DeChiara et al., 1990, 1991). Pendant la vie fœtale chez l’humain, *IGF2* est soumis à empreinte parentale et est exprimé uniquement à partir de l’allèle paternel de la région 11p15 de façon quasi ubiquitaire (Giannoukakis et al., 1993), à l’exception du cerveau où *IGF2* a une expression biallélique (Pham et al., 1998). En période post-natale chez l’humain, l’expression d’*IGF2* est maintenue (Sussenbach et al., 1993) et le foie est responsable de la majorité de sa production sous la dépendance du promoteur P1 qui n’est pas soumis à empreinte parentale (Vu and Hoffman, 1994). Durant la vie fœtale chez la souris, *Igf2* est soumis à empreinte parentale de manière quasi ubiquitaire (DeChiara et al., 1991) à l’exception du système nerveux central où *Igf2* a une expression biallélique dans les leptoméniges et dans les plexus choroïdes (DeChiara et al., 1991; Hu et al., 1995; Pham et al., 1998) et est exprimé à partir du chromosome 7 murin (Lee et al., 1990). A la différence de l’humain, l’expression d’*Igf2* chez la souris décline rapidement en période postnatal (Rotwein, 2018).

La protéine IGF-II est composée de 67 acides aminés très conservés au cours de l'évolution. Le gène *IGF2* se compose de 10 exons et est beaucoup plus complexe chez l'humain que chez la souris (Rotwein, 2018). Chez l'humain, les cinq promoteurs (P0 à P4) gouvernent la production de six transcrits différents d'*IGF2* (Holthuizen et al., 1990; Ikejiri et al., 1991; de Pagter-Holthuizen et al., 1987). Le promoteur P0 est actif *in utero* dans de nombreux tissus chez l'humain (Monk et al., 2006) et le promoteur P1 n'est actif que pendant la période postnatale et n'est pas soumis à empreinte parentale (Vu and Hoffman, 1994). Chez la souris, l'expression d'*Igf2* est régulée par quatre promoteurs (P0 à P3) (Rotwein and Hall, 1990). Le promoteur P0 murin n'est actif *in utero* que dans le placenta et est un acteur majeur du contrôle de la croissance fœtale et placentaire murine (Constância et al., 2002).

IGF-II fait partie du système des IGFs (Insulin-like Growth Factor) qui possède un rôle primordial dans la croissance fœtale et placentaire. Le système des IGFs comprend les deux facteurs de croissance IGF-I et IGF-II qui présentent une grande homologie entre eux et avec l'insuline, ainsi que des récepteurs communs (IGF-1R, IGF-2R et le récepteur de l'insuline) (Daughaday and Rotwein, 1989; Salmon and Daughaday, 1957; Sussenbach et al., 1992). Contrairement à *IGF2*, *IGF1* n'est pas soumis à empreinte parentale.

Le rôle du système des Igfs dans la croissance fœtale a été montré dès le début des années 90 par des modèles d'inactivation de gènes chez la souris. L'inactivation des deux allèles des gènes *Igf1* ou *Igf2* chez la souris induit une restriction de croissance fœtale (Fig.8) (Baker et al., 1993). L'inactivation des deux allèles du gène *Igf1R* entraîne une restriction de croissance fœtale encore plus sévère due à la perte d'action des facteurs de croissance Igf-I et Igf-II ; tandis que l'inactivation des deux allèles du gène *Igf2R* donne une croissance excessive secondaire à l'augmentation de la biodisponibilité d'Igf-II (De Chiara 1990 et 1991) (Fig.8). *Igf2R* est

soumis à empreinte parentale chez la souris (Barlow et al., 1991) contrairement au gène humain *IGF2R* qui n'est pas soumis à empreinte parentale (Kalscheuer et al., 1993). Le rôle du système des IGFs dans la croissance fœtale a été confirmé chez l'humain dès la fin des années 90 avec la mise en évidence de la première anomalie du système des IGFs (délétion homozygote d'*IGF1*) chez un patient avec RCIU sévère (Woods et al., 1996). Le rôle d'IGF-II dans la croissance fœtale chez l'humain a été très fortement suspecté dans les années 2000 avec la mise en évidence d'une anomalie épigénétique de la région 11p15 responsable d'une diminution d'expression d'*IGF2* pendant la vie fœtale chez un patient avec RCIU sévère (Gicquel et al., 2005) puis confirmé dix ans plus tard en 2015 avec la découverte de la première mutation d'*IGF2* chez des patients présentant un syndrome de Silver-Russell (Begemann et al., 2015) (cf paragraphe III.5).

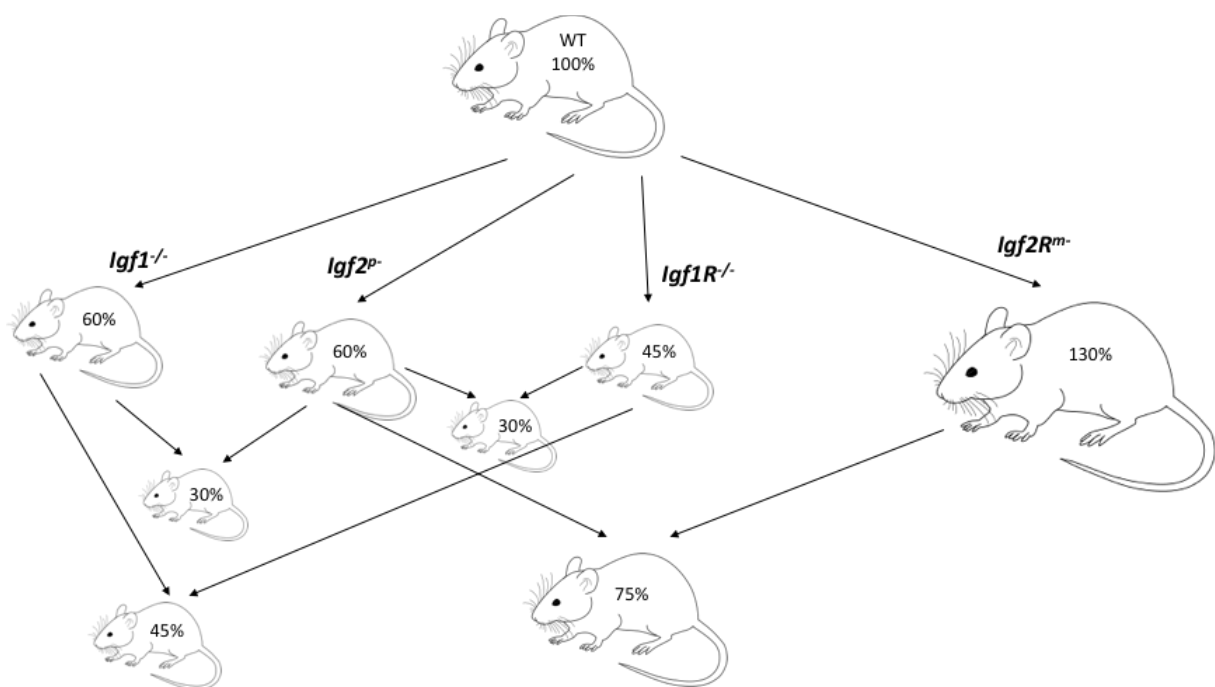


Figure 8 : Poids relatif à la naissance des modèles murins d'invalidation des différents gènes du système des IGFs (en % par rapport aux souris sauvages (WT)) (Baker et al., 1993; Gicquel and Le Bouc, 2006; Liu et al., 1993). p : paternel, m : maternel.



*IGF1* et *IGF2* sont exprimés par le placenta et l'embryon dès le premier trimestre de gestation chez l'humain, avec une prédominance pour *IGF2* à tous les âges gestationnels (Han et al., 1996). Pendant les deux premiers trimestres de gestation, IGF-I et IGF-II circulent majoritairement sous forme libre dans le sang fœtal (Lewitt et al., 1995). La demi-vie plasmatique d'IGF-I et d'IGF-II libres est faible et leur liaison avec les IGFBPs (protéines de liaison des IGFs) et l'ALS (acide labil subunit) sous forme de complexe binaire ou ternaire leur confère une stabilité augmentant ainsi leur demi-vie de quelques minutes à une trentaine d'heures (Le Roith, 2003). Les IGFBPs sont exprimées dès le premier trimestre de gestation par le placenta ce qui module la biodisponibilité des IGFs produites par le placenta pour le fœtus (Gibson et al., 2001; Han et al., 1996). La métalloprotéinase PAPP-A2 (*pregnancy-associated plasma protein-A 2*) libère les IGFs en clivant la liaison IGFBP-IGFs (Yan et al., 2010). Le rôle de PAPP-A2 dans la croissance fœtale a été confirmée par la mise en évidence de mutations de *PAPP-A2* chez des patients avec des retards de croissance, parfois à début anténatal (Dauber et al., 2016).

IGF-I et IGF-II agissent en se fixant sur le récepteur IGF-1R de la famille des tyrosines kinases exprimé par de nombreux tissus dans l'organisme et qui présente une grande analogie structurelle et fonctionnelle avec le récepteur de l'insuline (Nissley et al., 1985). IGF-II peut également se fixer sur l'isotype A du récepteur de l'insuline (IR). En revanche, seuls l'IGF-I et l'IGF-II libres peuvent se fixer aux différents récepteurs. L'affinité du récepteur IGF-1R pour l'IGF-I est supérieure à celle d'IGF-II et 50 fois plus élevée que pour l'insuline (Slaaby et al., 2006; Tian et al., 2019). IGF-1R comprend deux sous unités. La sous-unité alpha est extracellulaire et possède deux sites de liaison au ligand. La sous-unité bêta est transmembranaire (Steele-Perkins et al., 1988; Werner et al., 1989). Le récepteur est organisé en hétéro-tétramère avec deux sous unités alpha et deux sous unités bêta reliées par des ponts disulfure (Abbott et al., 1992). La fixation du ligand à la sous-unité alpha induit des

modifications conformationnelles de la sous-unité bêta qui permettent une autophosphorylation du récepteur au niveau de ses domaines tyrosine-kinase intracellulaires, à l'origine de cascades de phosphorylation de plusieurs voies de signalisation (Hanks et al., 1988). Les IRSs (insulin receptor substrate) sont des protéines qui reconnaissent les résidus tyrosines phosphorylés de IGF-1R et dont l'ancrage à IGF-1R va leur permettre d'être à leur tour phosphorylés. La phosphorylation d'IRS1 ou 2 par IGF-1R permet l'activation des voies de signalisation mitogen-activated protein kinase (MAPK) et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Saltiel and Kahn, 2001).

Le récepteur IGF-2R qui lie IGF-II et le mannose-6-phosphate (MacDonald et al., 1988) est un récepteur de clairance d'IGF-II.

Pendant la vie fœtale, la sécrétion d'IGF-I et d'IGF-II n'est pas régulée par l'axe somatotrope (Kopchick and Andry, 2000).

### **II.3.2.1.3. H19**

*H19* fut le premier gène humain pour lequel a été apporté la preuve d'une expression mono-allélique (Zhang and Tycko, 1992) et le premier lncARN identifié (Brannan et al., 1990). Le gène *H19* est exprimé à partir de l'allèle maternel du domaine télomérique de la région 11p15 chez l'humain (Bartolomei et al., 1991) et à partir de l'allèle maternel du chromosome 7 chez la souris. Pendant l'embryogenèse, *H19* est exprimé chez la souris et chez l'humain par les cellules dérivées du mésoderme à l'exception des cellules hématopoïétiques et par les cellules dérivées de l'endoderme (Lustig et al., 1994; Pachnis et al., 1984). Chez l'humain et la souris, *H19* n'est pas exprimé par les dérivés neurectodermiques. Le profil d'expression d'*H19* est très proche de celui d'*Igf2/IGF2* chez la souris et chez l'humain (DeChiara et al., 1991; Lustig et al., 1994). En période postnatale, l'expression d'*H19* dans les modèles murins est beaucoup plus restreinte qu'en période prénatale et n'est retrouvée à l'âge adulte que dans le cœur et le

muscle squelettique (Pachnis et al., 1984). Le gène *H19* code pour le lncARN H19 et pour plusieurs autres ARNs non codants (miR-675, lncARN anti-sens de H19 appelé 91H, lncARN PIHit) (Berteaux et al., 2008; Cai and Cullen, 2007; Court et al., 2011; Onyango and Feinberg, 2011). Des modèles murins de délétion d'*H19* ont mis en évidence le rôle d'*H19* dans la croissance fœtale (Eggenchwiler et al., 1997; Leighton et al., 1995; Pfeifer et al., 1996; Ripoche et al., 1997). Les souris avec délétion de l'allèle maternel d'*H19* ont un poids de naissance plus élevé que les souris non mutées et présentent une expression biallélique d'*Igf2* (Eggenchwiler et al., 1997; Pfeifer et al., 1996; Ripoche et al., 1997). La surexpression d'*Igf2* en cas de délétion d'*H19* est en partie causée par une régulation en cis de l'expression d'*Igf2* (Ripoche et al., 1997). L'absence d'expression d'*H19* dans les modèles murins est également responsable d'une perte de régulation en trans du réseau de gènes soumis à empreinte parentale puisqu'elle aboutit à la surexpression d'au moins six gènes soumis à empreinte dont certains sont exprimés à partir de régions distantes du génome (*Igf2*, *Dlk1*, *Gnas*, *Cdkn1c*, *Igf2r*, *Rtl1*) (Gabory et al., 2009).

### **II.3.2.2. Domaine centromérique *CDKN1C/KCNQ1OT1***

Le domaine centromérique de la région 11p15 comprend de nombreux gènes soumis à empreinte, certains de façon ubiquitaire, d'autres soumis à empreinte uniquement dans le placenta (Lee et al., 1997; Matsuoka et al., 1996). La plupart des gènes du domaine, dont *CDKN1C*, sont exprimés à partir de l'allèle maternel (Matsuoka et al., 1996). La protéine *CDKN1C* interagit avec les cyclines de la phase G1 du cycle cellulaire en contrôlant négativement la transition des cellules de la phase G1 à la phase S de synthèse de l'ADN et la préparation à l'entrée en mitose (Brioude et al., 2013). Des mutations perte de fonction ou gain de fonction de *CDKN1C* sont associées à des syndromes avec retard de croissance ou croissance excessive, respectivement (Arboleda et al., 2012; Brioude et al., 2013, 2015; Lee, 2012). Le gène *KCNQ1* code pour un canal potassique voltage dépendant et est exprimé à partir de l'allèle

maternel de façon ubiquitaire, en dehors du cœur, où son expression peut être parfois biallélique (Lee et al., 1997). Le lncARN *KCNQ1OT1* exerce une action répressive sur les autres gènes du domaine (Mohammad et al., 2008). Le promoteur de *KCNQ1OT1* correspond à l'ICR de la région centromérique, appelé *KCNQ1OT1* TSS DMR (ou ICR2). Ce centre d'empreinte est méthylé uniquement sur l'allèle maternel entraînant une expression mono-allélique de *KCNQ1OT1* à partir de l'allèle paternel. La délétion paternelle du centre d'empreinte *KCNQ1OT1* TSS DMR chez la souris et chez l'humain entraîne une expression biallélique des gènes du domaine (Fitzpatrick et al., 2002; Horike et al., 2000).

### **II.3.3. Anomalies moléculaires à l'origine du syndrome de Silver-Russell**

Des anomalies moléculaires touchant des régions chromosomiques différentes peuvent être à l'origine du SRS. Les principales anomalies moléculaires identifiées dans le SRS sont des modifications épigénétiques de la région 11p15 avec perte de méthylation de l'ICR *H19/IGF2:IG-DMR* présentes dans 30 à 60% des cas (Gicquel et al., 2005) (Fig.9) et une disomie uniparentale maternelle du chromosome 7 identifiée chez 5 à 7% des patients (Kotzot et al., 1995; Netchine et al., 2007). Les anomalies de méthylation de la région 11p15 sont souvent présentes en mosaïque, justifiant d'étudier la méthylation dans différents tissus en cas de niveau de méthylation normal dans les leucocytes (Azzi et al., 2014; Mackay and Temple, 2017; Wakeling et al., 2017). D'autres causes moléculaires plus rares ont également été identifiées. Des mutations perte de fonction au sein de la copie paternelle d'*IGF2* ou gain de fonction au sein de la copie maternelle de *CDKN1C* ont été identifiées chez des patients SRS (Begemann et al., 2015; Brioude et al., 2015). Récemment ont été identifiées des mutations des gènes *PLAG1* (*pleomorphic adenoma gene 1*) et *HMGA2* (*high mobility group at-hook 2*) chez des patients SRS, affectant la voie *HMGA2-PLAG1-IGF2* (Abi Habib et al., 2018; De Crescenzo et al., 2015). *HMGA2* est un facteur de transcription se fixant sur le promoteur de

*PLAG1*. *PLAG1* est un trans-activateur du promoteur P3 d'*IGF2*. Ainsi, une mutation perte de fonction de *HMGA2* ou *PLAG1* entraîne une diminution de l'expression de l'isoforme d'*IGF2* sous la dépendance du promoteur P3, expliquant le phénotype SRS. *PLAG1* n'ayant pas d'action sur le promoteur P1 d'*IGF2* responsable de la production hépatique d'IGF-II, les patients SRS avec mutations de *PLAG1* ou *HMGA2* ont des niveaux d'expression sérique d'*IGF2* normaux en période post-natale (Abi Habib et al., 2018). A l'heure actuelle, environ 40% des patients SRS restent sans anomalie moléculaire identifiée (Giabicani et al., 2016).

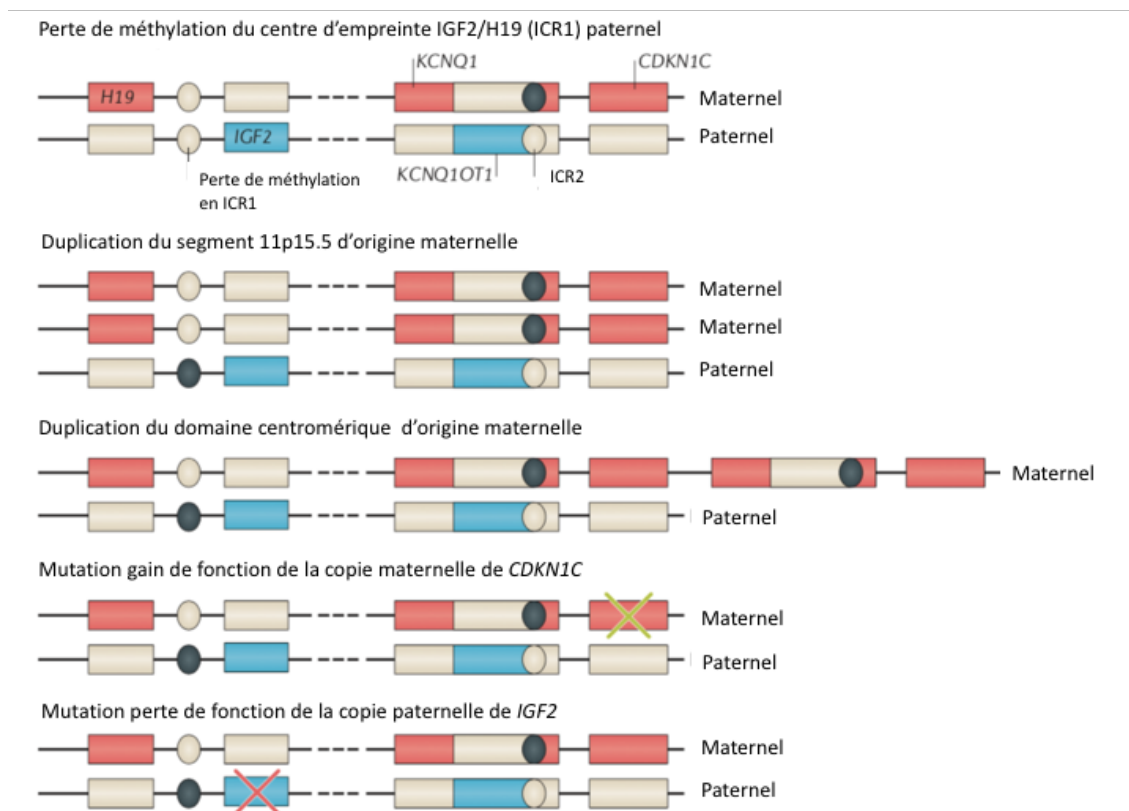


Figure 9 : Mutations et anomalies épigénétiques de la région 11p15 associées au syndrome de Silver-Russell. La perte de méthylation du centre d’empreinte *H19/IGF2*:IG-DMR sur l’allèle paternel est associée à une perte de l’expression paternelle d’*IGF2* et à un gain d’expression d’*H19*. La duplication maternelle de la région 11p15 ou du domaine centromérique ou les mutations gain de fonction de *CDKN1C* sont associées à un gain d’expression de *CDKN1C* et à un arrêt du cycle cellulaire à la phase G1. Les mutations perte de fonction de l’allèle paternel d’*IGF2* sont associées à une diminution ou une perte d’expression d’*IGF2*. D’après Wakeling et al., 2017.

Des études de conformation chromatinienne 3C chez des patients SRS avec perte de méthylation au centre d’empreinte *H19/IGF2*:IG-DMR ont montré des modifications majeures dans les interactions au sein du TAD de la région *IGF2/H19* (Fig.10). Chez ces patients, il existe une diminution des interactions entre *IGF2* et ses activateurs de transcription (« *enhancer* ») qui induit une diminution d’expression d’*IGF2* (Rovina et al., 2020).

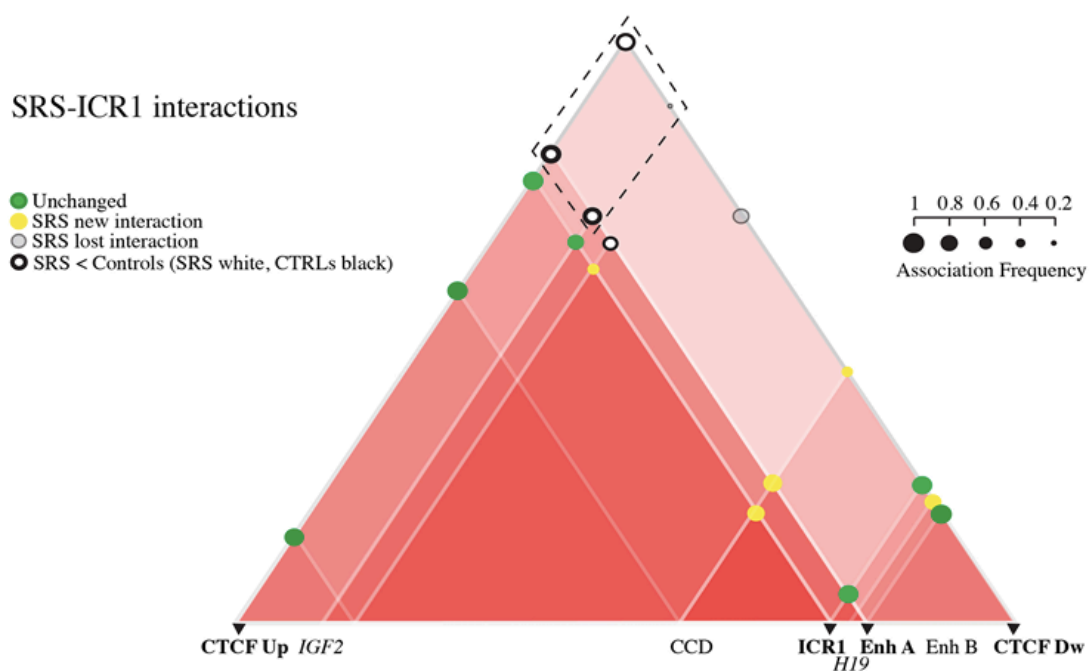


Figure 10 : Représentation schématique des modifications au sein du TAD du centre d’empreinte *IGF2/H19*:IG-DMR (ICR1) en cas de perte de méthylation chez des patients avec un SRS. Les triangles rouges représentent les interactions entre les différents éléments de la région *IGF2/H19*. Les ronds verts représentent les interactions inchangées entre les patients SRS et les témoins. En jaune, les nouvelles interactions formées chez les patients SRS. En gris clair, les interactions perdues chez les patients SRS. En cercle noir, les interactions dont l’intensité diminue chez les patients SRS. D’après Rovina et al., 2020.

## II.4. Syndrome de Temple

### II.4.1. Manifestations cliniques du syndrome de Temple

Le syndrome de Temple (TS) associe un RCIU et un retard de croissance postnatal avec une petite taille à l'âge adulte, une hypotonie néonatale, un retard de développement moteur, des difficultés alimentaires néonatales et dans les premières années de vie, une puberté et une obésité précoces (Temple et al., 1991). Les patients avec un TS présentent quelques caractéristiques morphologiques non spécifiques comme un grand front, une large ensellure nasale, une clinodactylie et une acromicrie (Ioannides et al., 2014; Temple et al., 1991) (Fig.11). Les anomalies moléculaires rencontrées dans le syndrome de Temple concernent la région chromosomique 14q32 (Temple et al., 1991).



Figure 11 : Photographies de patients présentant un syndrome de Temple (Lande et al., 2018).

## II.4.2. Région soumise à empreinte parentale 14q32

La région chromosomique humaine 14q32 (Fig.12) s'étend sur environ 1 Mb. Sa région homologue chez la souris est située sur la région 12qF1 et s'étend sur 1.3 Mb (Howard and Charalambous, 2015a). Cette région soumise à empreinte parentale comprend trois gènes (*DLK1*, *DIO3*, *RTL1*) codant pour des protéines exprimés à partir de l'allèle paternel, des ARN non codants exprimés à partir de l'allèle maternel (*GTL2/MEG3*, *MEG8*, *RTL1as*), un cluster de miARNs, ainsi que des snoARNs exprimés également à partir de l'allèle maternel (Howard and Charalambous, 2015a; da Rocha et al., 2008).

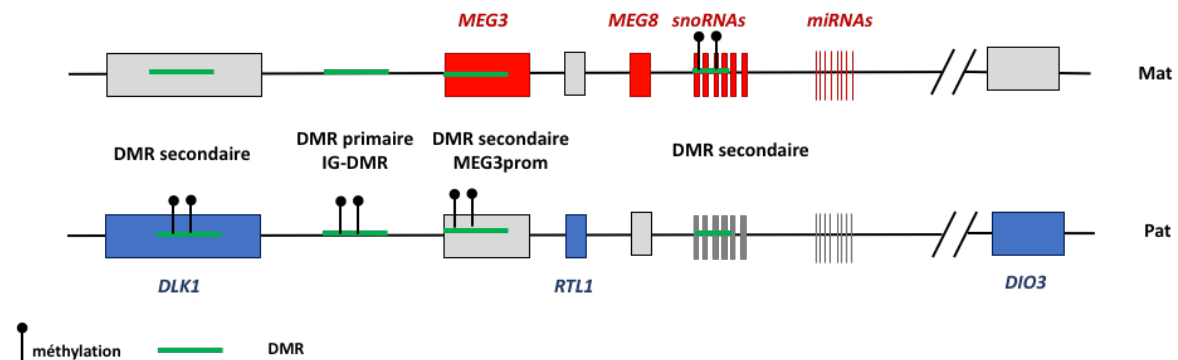


Figure 12 : Région soumise à empreinte parentale 14q32. En rouge les gènes exprimés à partir de l'allèle maternel. En bleu les gènes exprimés à partir de l'allèle paternel. En vert le centre d'empreinte *MEG3/DLK1*:IG-DMR, méthylé uniquement sur l'allèle paternel et les DMR secondaires.

### II.4.2.1. Régions différenciellement méthylées

Il existe au sein de la région humaine 14q32 quatre régions différenciellement méthylées. La DMR intergénique (*MEG3/DLK1*:IG-DMR) située environ 15kb en amont du promoteur de *MEG3* est la DMR primaire ou centre d'empreinte, méthylée uniquement sur l'allèle paternel comme le centre d'empreinte *IGF2/H19*:IG-DMR de la région 11p15 (Takada et al., 2002). *MEG3/DLK1*:IG-DMR acquière sa méthylation différentielle au cours du développement implantatoire et contrôle l'expression des gènes de la région 14q32 (Takada et al., 2002). Des



expériences de délétions ciblées chez la souris de *Meg3/Dlk1*:IG-DMR montrent que si la délétion est héritée de la mère, l'expression des ARNs non codants de la région est inhibée et la transcription des gènes codants pour les protéines *DLK1*, *DIO3*, *RTL1* sur l'allèle maternel est réactivée (Lin et al., 2003). Il existe deux autres DMR méthylées sur l'allèle paternel au sein de la région 14q32 : une DMR intragénique au sein de *DLK1* et le promoteur de *MEG3* (*MEG3*-DMR) qui est également différenciellement méthylé. La troisième DMR secondaire de la région 14q32 est méthylée sur l'allèle maternel et se situe au sein du cluster RIAN-C/D snoARNs (Takada et al., 2002). Les trois DMR secondaires acquièrent par définition leur méthylation différentielle après l'implantation. La méthylation différentielle de la DMR secondaire du promoteur de *MEG3* est dirigée par le centre d'empreinte IG-DMR. Dans le modèle murin de délétion maternelle du centre d'empreinte IG-DMR, le promoteur de *Meg3* perd sa méthylation. Des expériences de modifications géniques au sein du locus *Dlk1/Meg3* (insertion de cassette LacZ entre l'IG-DMR et *Meg3*-DMR ou délétion de *Meg3*-DMR) chez la souris ont montré que la perte de méthylation de *Meg3*-DMR sur l'allèle paternel sans modification de l'état de méthylation de l'IG-DMR conduit à une réactivation de l'expression en cis des ARN non codants et à une diminution de l'expression des gènes codants pour les protéines *DLK1*, *DIO3*, *RTL1* (Schuster-Gossler et al., 1996, 1998; Sekita et al., 2006; Steshina et al., 2006; Takahashi et al., 2009).

#### **II.4.2.2. Gènes codant pour des protéines (*DLK1*, *DIO3*, *RTL1*)**

Chez l'humain, les trois gènes *DLK1* (Kobayashi et al., 2000), *DIO3* (Hernandez et al., 2006) et *RTL1* (Sekita et al., 2008) sont exprimés à partir de l'allèle paternel de la région 14q32. Le chapitre III est dédié au gène *DLK1*. Le gène *Rtl1* est exprimé de façon quasi ubiquitaire dans le placenta et l'embryon murin (Sekita et al., 2008). Son expression persiste dans le cerveau en période postnatale (Brandt et al., 2005; Howard and Charalambous, 2015b). L'invalidation

paternelle de *Rtl1* dans les modèles murins conduit à une restriction de croissance fœtale, une diminution de taille du placenta et un retard de croissance postnatal (Sekita et al., 2008). *DIO3* code pour l'enzyme iodothyronine déiodinase de type 3 qui agit comme régulateur négatif en convertissant la thyroxine et la triiodothyronine biologiquement active en T3 inverse et en T2 biologiquement inactives (Bianco, 2011). Les modèles murins d'invalidation paternelle de *Dio3* présentent une restriction de croissance fœtale avec une mortalité périnatale élevée (Hernandez et al., 2006).

#### **II.4.2.3. ARNs non codants**

Plusieurs lncARNs sont exprimés à partir de l'allèle maternel de la région 14q32 (*MEG3/Meg3* également appelé *Gtl2*, *MEG8* et son homologue murin *Rian* et enfin *RTL1as* chez l'humain et la souris) (Tierling et al., 2006). Dans les modèles murins, *Meg3/Gtl2* est exprimé de manière ubiquitaire par l'embryon et le placenta (Schuster-Gossler et al., 1996). En période post-natale, son expression persiste de manière importante dans le système nerveux central (Schmidt et al., 2000). La perte de fonction de *Gtl2* a été associée au processus de tumorigenèse mais sa fonction exacte n'a pas été établie à l'heure actuelle (Benetatos et al., 2011). *Rian* code pour des snoARNs capables d'entraîner des modifications post-transcriptionnelles en stabilisant les ARNs (Cavaillé et al., 2002). Il n'existe pas à ce jour de modèle murin d'invalidation de *Rian*. Chez l'humain, le transcrit court de *Rian* correspond au lncARN *MEG8* dont la fonction n'est pas définie. *Rtl1as*, antisens du gène *Rtl1*, code pour des miARNs dont le rôle est de réguler négativement *Rtl1* et *Dlk1* en trans. *MIRG* code pour un des plus grands domaines de miARNs avec plus de 63 miARNs identifiés chez l'humain (Benetatos et al., 2013). Les souriceaux issus de modèles murins d'invalidation maternelle de *Mirg* ne présentent pas de restriction de croissance fœtale mais présentent une mortalité néonatale élevée du fait de difficultés

alimentaires majeures et de troubles métaboliques avec principalement des hypoglycémies (Labiaille et al., 2014).

#### **II.4.2.4. Interactions au sein des TADs**

Au niveau de la région *Dlk1-Dio3*, CTCF se fixe sur le promoteur de *Meg3* sur l'allèle maternel non méthylé (Rosa et al., 2005). La fixation de CTCF sur l'allèle maternel forme des ponts entre des éléments à distance (Llères et al., 2019). La modification de l'architecture chromatinienne résultant de la fixation de CTCF sur l'allèle maternel permet à *Meg3* de réprimer la transcription de *Dlk1* (Llères et al., 2021; Noordermeer and Feil, 2020). Comme au niveau du locus *Igf2/H19*, des études de conformation chromatinienne 3C et 4C ont montré que les interactions au sein de la région *Dlk1-Dio3* sont organisées en sous-TADs (Llères et al., 2019). Les sous-TADs de la région *Dlk1-Dio3* sont différents selon l'origine parentale de l'allèle. Le TAD de l'allèle paternel de la région *Dlk1-Dio3* est composé de deux sous-TADs : le sous TAD *begain* et le sous TAD *Dlk1-Dio3*. La fixation de CTCF sur l'allèle maternel du promoteur de *Meg3* divise la région *Dlk1-Dio3* en deux sous-TADs différents : *Dlk1-Meg3* et *Mirg-Dio3* (Fig.13).

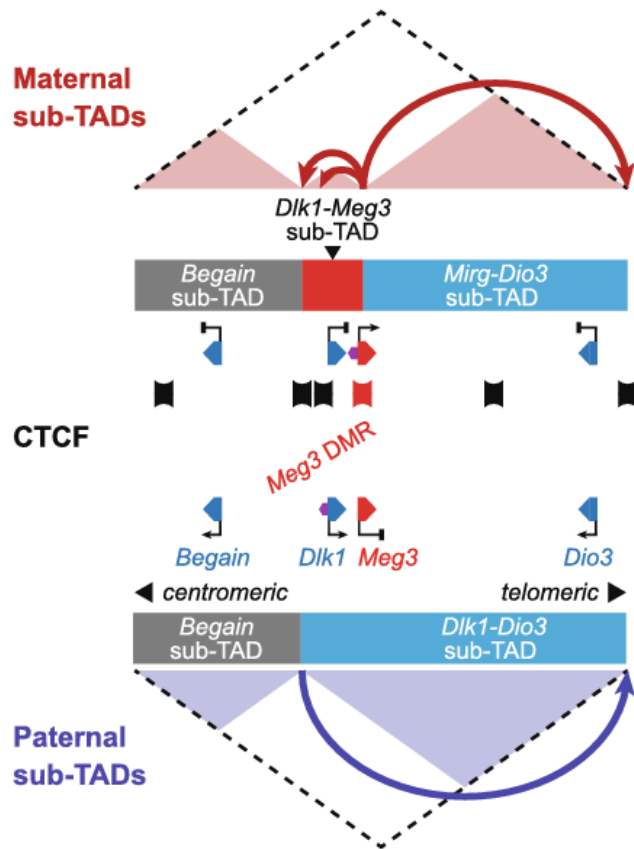


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation en sous-TADs de la région *Dlk1-Dio3* en fonction de l'allèle parental. Bannières noires : sites de fixation de CTCF. Triangles rouges : gènes exprimés à partir de l'allèle maternel, triangles bleus : gènes exprimés à partir de l'allèle paternel. D'après Llères et al., 2019.

### II.4.3. Anomalies moléculaires à l'origine du syndrome de Temple

La disomie uniparentale maternelle du chromosome 14 et les épimutations avec perte de méthylation du centre d'empreinte de la région du chromosome 14 sont les causes moléculaires les plus fréquentes du TS (Geoffron et al., 2018; Ioannides et al., 2014; Temple et al., 1991). Ces deux anomalies moléculaires sont responsables d'une perte d'expression des gènes *DLK1*, *DIO3* et *RTL1* normalement exprimés par l'allèle paternel et d'un gain d'expression des ARN non codants exprimés à partir de l'allèle maternel (Ioannides et al., 2014; Temple et al., 1991). Des délétions paternelles de la région 14q32 ont été identifiées plus rarement chez des patients avec un TS (<10% des cas) (Ioannides et al., 2014; Kagami et al., 2017). Aucune mutation génique de la région 14q32 n'a été identifiée chez des patients avec TS. En revanche, les

modèles murins avec invalidation de *Dlk1* (Moon et al., 2002) ou de *Rtl1* (Sekita et al., 2008) présentent un phénotype proche de celui du TS (cf III.4).

## **II.5. Chevauchement clinique et moléculaire des patients présentant un syndrome de Silver-Russell et de Temple**

Bien que les anomalies moléculaires à l'origine du SRS et du TS concernent deux régions chromosomiques différentes, il existe un chevauchement clinique entre ces syndromes (Geoffron et al., 2018). En effet, 76% des patients avec un TS présentent un score de Netchine-Harbison  $\geq 4/6$  et répondent donc à la définition clinique du SRS (Geoffron et al., 2018). Par ailleurs, les manifestations cliniques classiquement rapportées dans le TS, comme l'hypotonie néonatale, l'acromicrie, la clinodactylie, la puberté précoce et l'obésité, peuvent également être présentes chez des patients présentant un SRS avec anomalies épigénétiques de la région 11p15 sans atteinte d'autre région soumise à empreinte parentale (Wakeling et al., 2017).

Il existe également un chevauchement moléculaire entre les patients avec un SRS et avec un TS même en l'absence d'atteinte multiloci puisque les patients avec perte de méthylation de l'ICR de la région 14q32 sans anomalie de méthylation de la région 11p15 présentent une diminution d'expression d'*IGF2* dans les fibroblastes, comme les patients SRS (Abi Habib et al., 2019). Par ailleurs, les patients avec un SRS présentent, comme les patients avec un TS, une surexpression dans les fibroblastes de certains ARNs non codants exprimés à partir de l'allèle maternel de la région 14q32 (*MEG8* et certains miARNs) alors qu'ils ne présentent pas d'anomalie de méthylation de l'ICR de la région 14q32 (Fig.14). Enfin, des analyses *in vitro* de surexpression ou d'inactivation dans des fibroblastes de *MEG3* et *MEG8* exprimés à partir de la région 14q32 sont associées à des modifications du niveau d'expression d'*IGF2* (Fig.15) (Abi Habib et al., 2019).

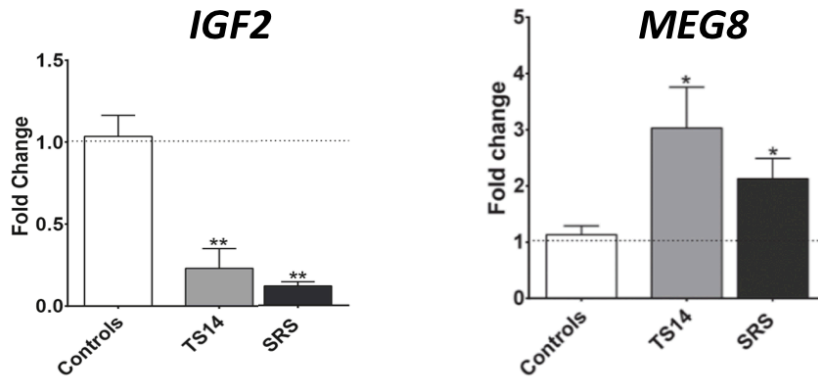
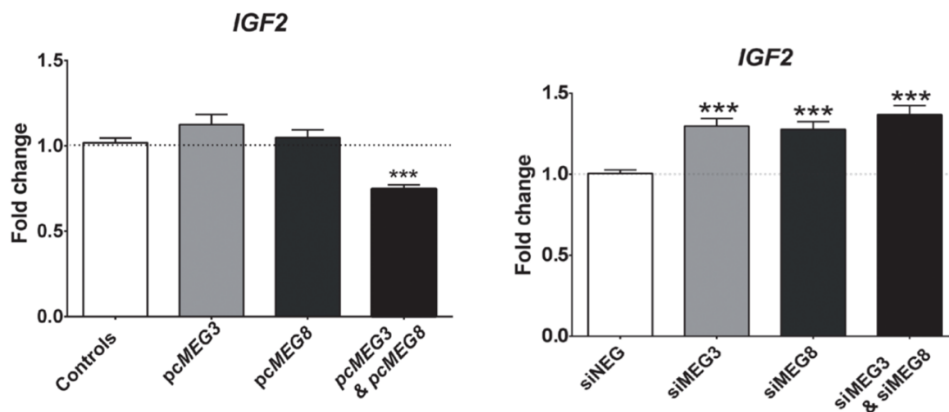


Figure 14 : Étude des niveaux d'expression d'*IGF2* et de *MEG8* dans les fibroblastes de témoins et de patients avec un SRS et un TS par PCR quantitative. Il existe une diminution de l'expression d'*IGF2* et une augmentation du niveau d'expression de *MEG8* dans les fibroblastes de patients avec un SRS et dans les fibroblastes de patients avec un TS (TS14) par rapport à des sujets contrôles sains. D'après *Abi Habib et al., 2019*.



a.

b.

Figure 15 : Étude des niveaux d'expression d'*IGF2* dans des fibroblastes par PCR quantitative après surexpression transitoire de *MEG3* et/ou *MEG8* dans des fibroblastes sains (a) ou après blocage de l'expression de *MEG3* et *MEG8* dans des fibroblastes sains par des ARNs interférents. a. La surexpression concomitante de *MEG3* et *MEG8* entraîne une diminution d'expression d'*IGF2*. b. La diminution d'expression de *MEG3* et/ou *MEG8* entraîne une augmentation d'expression d'*IGF2*. Pc : surexpression transitoire par transfection d'un vecteur contenant *MEG3* ou *MEG8*. Si : petit ARN interférent. D'après *Abi Habib et al., 2019*

### III. RÔLE DE DLK1 DANS LA CROISSANCE FŒTALE

#### III.1. Gène et protéine DLK1

Le gène *DLK1* (*Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) est exprimé à partir de l'allèle paternel du chromosome 14q32 chez l'humain (Gubina et al., 1999; Kobayashi et al., 2000; Schmidt et al., 2000). Le gène *DLK1* code pour une protéine transmembranaire possédant six motifs EGF-like dans son domaine extracellulaire (Smas and Sul, 1993), un site de clivage par l'enzyme TACE/ADAM17 juxta-membranaire, un domaine transmembranaire et un court domaine intracytoplasmique (Wang et al., 2006) (Fig. 16). À l'issue d'un épissage alternatif sont obtenus chez l'humain deux isoformes : une possédant le site de clivage par l'enzyme TACE permettant de générer après clivage protéolytique une forme soluble de DLK1, et une isoforme membranaire ne possédant pas le site de clivage protéolytique (Mei et al., 2002; Smas et al., 1997). Chez la souris, *Dlk1* est exprimé à partir du chromosome 12 paternel dès E8.5 (Gubina et al., 2000). Six isoformes de *Dlk1* ont été identifiées chez la souris, deux possédant le site de clivage et quatre isoformes transmembranaires sans clivage possible (Jensen et al., 1994; Wang et al., 2006).

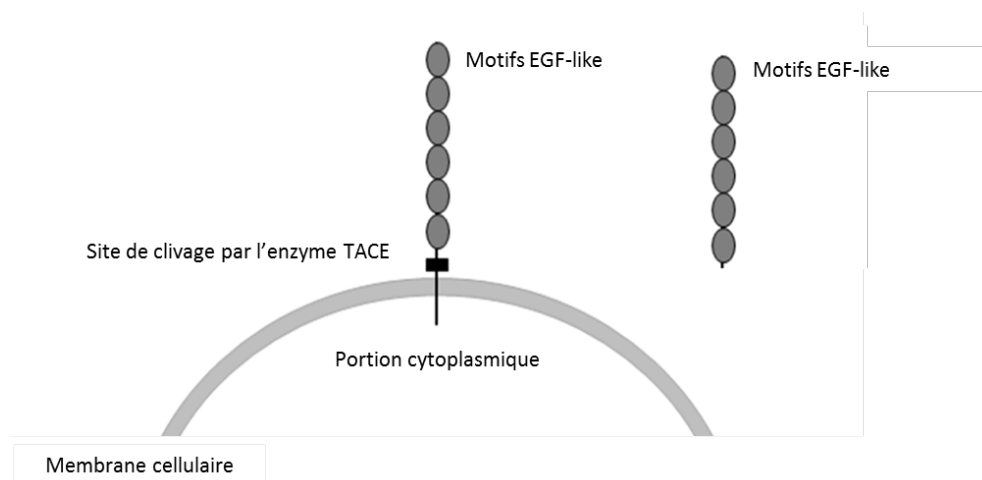


Figure 16 : Représentation schématique des formes transmembranaire et soluble de DLK1.

### III.2. Voies de signalisation

Bien que son mécanisme d'action soit mal connu, DLK1 semble être impliquée dans plusieurs voies de signalisation chez l'humain (Fig.17) (Traustadóttir et al., 2019). Des données contradictoires existent dans la littérature concernant l'inhibition de la voie de signalisation NOTCH exercée par DLK1 (Baladrón et al., 2005). La voie NOTCH est une cascade de signalisation conservée au cours de l'évolution. La liaison des ligands canoniques Delta et Serrate du récepteur NOTCH entraîne un clivage protéolytique du récepteur permettant la libération du segment intra-cytoplasmique du récepteur. Ce fragment pénètre ensuite dans le noyau pour exercer une régulation de la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation NOTCH (Fiúza and Arias, 2007). La forme transmembranaire de DLK1 semble exercer une cis-inhibition de la voie NOTCH par interaction entre les domaines EGF-like 5-6 de DLK1 et les domaines EGF 10-15 du récepteur NOTCH-1, empêchant la fixation des ligands canoniques Delta et Serrate sur le récepteur NOTCH-1 par compétition avec ces derniers et inhibant ainsi la cascade de signalisation NOTCH (Fig.17B) (Baladrón et al., 2005; Traustadóttir et al., 2016). En revanche, la forme soluble de DLK1 semble pouvoir se fixer à la forme transmembranaire de DLK1 via les domaines EGF-like 4 et 5 (Fig.17A), modulant ainsi par compétition l'inhibition exercée par DLK1 sur la voie NOTCH (Baladrón et al., 2001; Traustadóttir et al., 2017). Les formes solubles et transmembranaires de DLK1 exerceraient donc un effet inverse, permettant une régulation du niveau d'inhibition de la voie NOTCH (Traustadóttir et al., 2019). DLK1 agit également indépendamment de la voie de signalisation NOTCH. L'interaction entre forme transmembranaire de DLK1 et le récepteur de FGF18 (Fibroblast Growth Factor impliqué dans la différenciation des ostéoblastes) empêche la fixation de FGF18 à son récepteur et ainsi inhibe la chondrogenèse (Fig.17E) (Miyaoka et al., 2010). La forme soluble de DLK1 permet l'activation de la voie de signalisation MAPK (Mitogen-activated protein kinases)/ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) qui augmente l'expression de *SOX9*, impliqué dans la



chondrogenèse et l'ostéogenèse ainsi que dans la différenciation adipocytaire et inhibe la voie de signalisation PI3K/AKT (Fig.17C) (Kim et al., 2007; Wang et al., 2010). Enfin, en liant l'IGFBP-1, la forme transmembranaire de DLK1 diminue la liaison d'IGF-I à IGFBP-1 et ainsi augmente la fixation d'IGF-I à son récepteur IGF-1R (Fig.17D) (Nueda et al., 2008; Ruiz-Hidalgo et al., 2002).

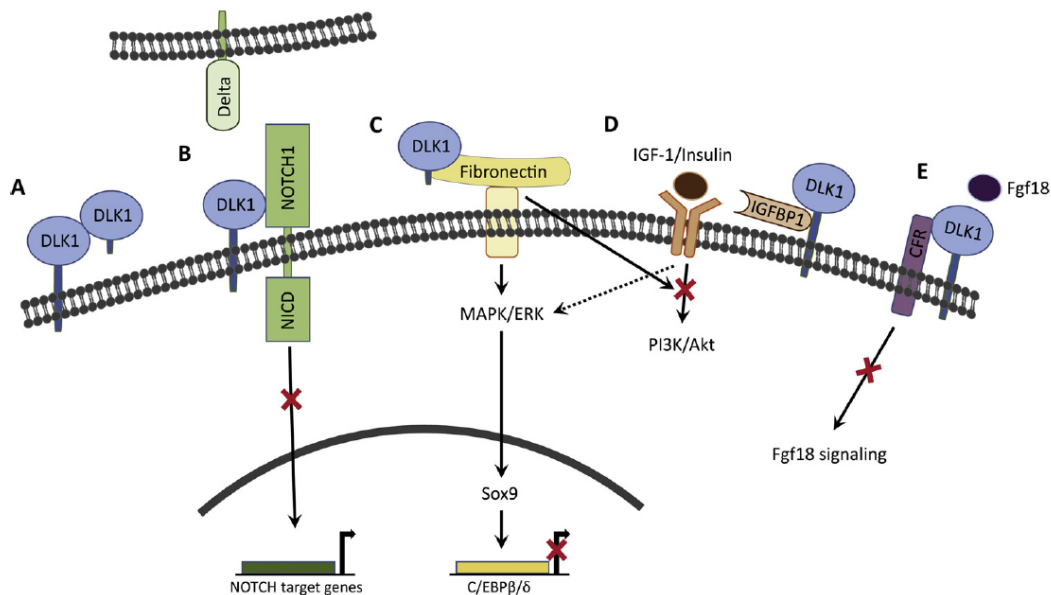


Figure 17 : Représentation schématique des voies de signalisation de DLK1. D'après Traustadóttir et al., 2019.

### III.3. Expression spatio-temporelle de *DLK1*

En période anténatale, *DLK1* est exprimé chez l'humain par les cellules endothéliales du placenta et par le trophoblaste (Fay et al., 1988; Floridon et al., 2000). L'embryon exprime *DLK1* de manière ubiquitaire dès la cinquième semaine d'aménorrhée (endoderme, mésoderme, ectoderme) puis son expression diminue au cours de la vie fœtale (Abdallah et al., 2004; Floridon et al., 2000; Tornehave et al., 1993; Zwierzina et al., 2015). La forme soluble de DLK1 est présente chez l'humain dans le liquide amniotique à des concentrations très élevées au deuxième et troisième trimestre de gestation (Fay et al., 1988). Chez la souris, *Dlk1* est

également exprimé de manière ubiquitaire en début de gestation puis son expression est restreinte en fin de gestation à certains organes comme l’hypophyse, les surrénales, le pancréas et le muscle squelettique (Yevtodiyyenko and Schmidt, 2006). Dans le placenta murin, *Dlk1* n’est exprimé que par les cellules endothéliales (Yevtodiyyenko and Schmidt, 2006). En période postnatale, l’expression de *DLKI* est restreinte chez la souris et chez l’humain à quelques types cellulaires (cellules  $\beta$  du pancréas, cellules somatotropes de l’hypophyse, adipocytes, glandes surrénales, muscle squelettique...) (Larsen et al., 1996; Tornehave et al., 1989, 1993). Contrairement aux cellules différenciées, la plupart des progéniteurs cellulaires présents chez l’adulte humain expriment *DLKI* (Floridon et al., 2000; da Rocha et al., 2008; Traustadóttir et al., 2019) (Fig.18).

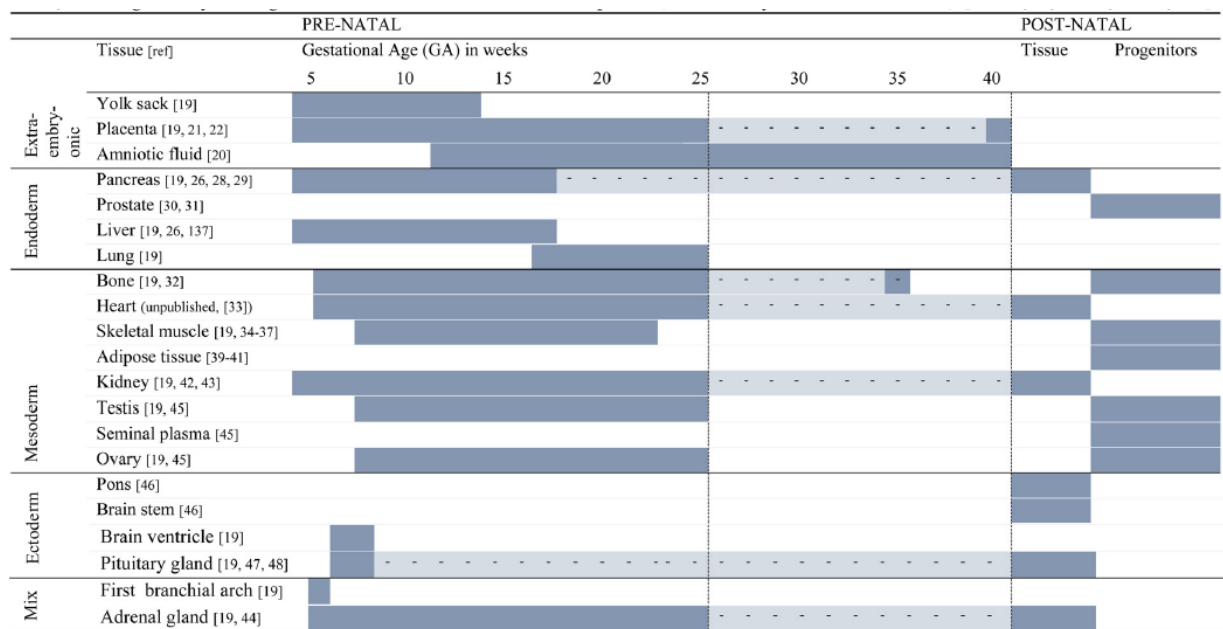


Figure 18 : Expression temporo-spatiale de *DLKI* chez l’humain au cours de la gestation et en période postnatale. Rectangles bleus: expression de *DLKI* démontrée dans un tissu donné à un temps donné, en pointillé expression supposée de *DLKI*. D’après Traustadóttir et al., 2019.

#### **III.4. Modèles murins d'invalidation de *Dlk1***

Les modèles murins d'invalidation de *Dlk1* suggèrent un rôle de *Dlk1* dans la croissance fœtale et postnatale. L'invalidation homozygote de *Dlk1* chez la souris entraîne une mortalité périnatale importante (Moon et al., 2002). Les souriceaux présentant une restriction de croissance fœtale avec des difficultés alimentaires néonatales, des anomalies squelettiques costales et un retard de croissance postnatale (Moon et al., 2002). Les souris avec invalidation de l'allèle paternel de *Dlk1* présentent également une restriction de croissance fœtale et un retard de croissance postnatal, contrairement aux souris avec invalidation de l'allèle maternel de *Dlk1* qui présentent une croissance normale (Moon et al., 2002). Le rattrapage pondéral complet chez les souris *Dlk1*<sup>-/-</sup> intervient entre 65 et 90 jours (Moon et al., 2002). A 16 semaines, le poids des souris *Dlk1*<sup>-/-</sup> est similaire au poids des souris contrôles, mais leur composition corporelle est différente, avec un excès de masse grasse (Moon et al., 2002). L'absence de *Dlk1* chez ces souris favorise la différenciation adipocytaire et conduit à une hypertrophie des adipocytes, à l'origine de l'augmentation de la masse grasse constatée chez les souris *Dlk1*<sup>-/-</sup> (Moon et al., 2002). Le poids des autres organes, en dehors de celui du foie, est moindre chez les souris *Dlk1*<sup>-/-</sup> (Moon et al., 2002). Ces souris développent une hépatomégalie par accumulation de graisse intra-hépatique. A l'âge adulte, elles présentent une obésité et des troubles métaboliques avec augmentation des concentrations sanguines de triglycérides, de cholestérol et d'acides gras libres circulants (Moon et al., 2002).

#### **III.5. Mutations de *DLK1* identifiées en pathologie humaine**

Des délétions et des mutations de *DLK1* (p.Gly199Alafs\*11, p.Val271Cysfs\*14, et p.Pro160Leufs\*50) ont été identifiées chez des patients présentant une puberté précoce non syndromique, sans documentation concernant leurs biométries de naissance ou avec des biométries de naissance normales (Dauber et al., 2017; Gomes et al., 2019; Montenegro et al.,

2020). Les patients avec mutation de *DLK1* présentent un syndrome métabolique à l'âge adulte avec obésité, intolérance glucidique, diabète et dyslipidémie (Dauber et al., 2017; Gomes et al., 2019; Montenegro et al., 2020). A l'heure actuelle, il n'a jamais été identifié de mutation de *DLK1* chez des patients avec RCIU.

### **III.6. Rôles de DLK1**

#### **III.6.1. Régulation de la différenciation cellulaire**

DLK1 exerce un rôle de régulateur entre prolifération et différenciation cellulaire en maintenant un grand nombre de progéniteurs cellulaires dans un stade indifférencié (Appelbe et al., 2013; Floridon et al., 2000; Li et al., 2005; Mortensen et al., 2012; Traustadóttir et al., 2019). Le rôle de DLK1 a été très étudié dans le tissu adipeux, ce qui lui vaut son nom original PEF-1 (Preadipocyte factor 1). *DLK1* est fortement exprimé par les préadipocytes, qu'il maintient à un stade indifférencié (Smas and Sul, 1993). L'expression de *DLK1* est ensuite inhibée lors du processus de différenciation des préadipocytes en adipocytes. Les deux formes de DLK1, transmembranaire et soluble, pourraient jouer des rôles opposés dans les processus de différenciation cellulaire, la forme transmembranaire maintenant les cellules en phase de prolifération à un stade indifférencié, tandis que la forme soluble favoriserait la différenciation cellulaire (Appelbe et al., 2013; Garcés et al., 1999; Lee et al., 2003a; Shin et al., 2014). DLK1 joue également un rôle important dans le développement squelettique en maintenant les chondrocytes en prolifération à un stade indifférencié *via* la surexpression du facteur de transcription *SOX9* (Andersen et al., 2013; Howard and Charalambous, 2015a).

#### **III.6.2. Échanges foeto-placentaires et adaptation métabolique à la gestation**

Les forts niveaux d'expression de *DLK1* par le placenta humain, et particulièrement par la chambre inter-villeuse et par les cellules endothéliales des villosités choriales plaident pour un

rôle important de DLK1 dans les échanges fœto-placentaires (Fay et al., 1988; Schrey et al., 2015), sans que ce rôle ne soit bien défini à l'heure actuelle. Par ailleurs, les niveaux d'expression placentaire de *DLK1* sont plus faibles chez les nouveau-nés PAG comparativement aux nouveau-nés eutrophes (Díaz et al., 2013). En cas d'inactivation de l'allèle paternel de *Dlk1* chez la souris surviennent des modifications morphologiques du placenta labyrinthique, avec une réduction de la taille du compartiment vasculaire (Appelbe et al., 2013). Chez l'humain, l'expression placentaire de *DLK1* est corrélée positivement au poids de naissance des nouveau-nés, augmentée chez les nouveau-nés macrosomes (Kappil et al., 2015) et diminuée chez les nouveau-nés PAG (MacDonald et al., 2020). Les concentrations de DLK1 circulant dans le sang chez l'adulte sont quasiment indétectables, mais augmentent significativement dans le sang maternel au cours de la gestation (Floridon et al., 2000). À l'aide de modèles murins d'inactivation conditionnelle de *Dlk1*, Cleaton *et al.* ont montré que la forme soluble de *Dlk1* circulant dans le sang maternel pendant la gestation est d'origine fœtale ou trophoblastique (Cleaton et al., 2016; Petry et al., 2021).

Cleaton *et al.* et McDonald *et al.* ont montré une corrélation positive entre le poids de naissance des nouveau-nés et les concentrations sériques de DLK1 circulant chez la femme enceinte avec une diminution significative des concentrations sériques de DLK1 respectivement à 36 SA (semaines d'aménorrhée) et à 28 SA chez les mères donnant naissance à des nouveau-nés PAG (Cleaton et al., 2016; MacDonald et al., 2020). Indépendamment du poids de naissance, l'association entre les niveaux d'expression placentaire de *DLK1* et des signes d'insuffisance placentaire vasculaire a été rapportée par plusieurs équipes (Cleaton et al., 2016; Schrey et al., 2015). Les concentrations sériques de DLK1 circulant chez les femmes enceintes sont significativement plus basses en cas de prééclampsie, y compris après ajustement sur le poids de naissance et l'âge gestationnel (Schrey et al., 2015). Il existe également une diminution

d'expression de *DLK1* par les cellules endothéliales du placenta en cas de prééclampsie (Yu et al., 2019).

La gestation chez l'humain et la souris est caractérisée par des modifications du métabolisme énergétique maternel afin de maintenir un apport nutritionnel au fœtus suffisant tout au long de la gestation pour permettre son développement et sa croissance (Feldt–Rasmussen and Mathiesen, 2011; Zeng et al., 2017). Les concentrations sériques élevées de Dlk1 circulant chez les souris gestantes semblent jouer un rôle important dans l'adaptation métabolique à la gestation, en particulier lors du passage à un métabolisme catabolique en seconde partie de gestation (Cleaton et al., 2016). A l'aide de modèles murins d'inactivation de *Dlk1*, Cleaton *et al.* ont montré qu'en l'absence de Dlk1 circulant dans le sang maternel pendant la gestation, la réponse métabolique de la mère à la grossesse est modifiée avec en particulier une réduction des concentrations sanguines de HDL-cholestérol et de cétones (Cleaton et al., 2016).

### **III.6.3. Régulation de la croissance**

Les modèles murins d'inactivation de *Dlk1* sont en faveur d'un rôle de Dlk1 dans la croissance fœtale et postnatale (Moon et al., 2002) (cf III.4). Une des hypothèses pour expliquer l'effet de *Dlk1* sur la croissance postnatale est la modulation des niveaux de GH induite par Dlk1 (Charalambous et al., 2014). En effet, l'inactivation de *Dlk1* dans les modèles murins induit une réduction de la sécrétion hypophysaire de GH (Ansell et al., 2007; Cheung et al., 2013). A l'inverse, les souris sur-exprimant *Dlk1* présentent des concentrations sanguines élevées de GH circulant (Ansell et al., 2007). Cependant la sécrétion d'Igf-I et d'Igf-II n'est pas régulée par l'axe somatotrope pendant la vie fœtale. La modulation des concentrations de GH induite par Dlk1 n'a donc pas ou peu d'impact sur la croissance fœtale.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à partir des données sur les modèles murins concernant le mécanisme d'action de DLK1 dans la régulation de la croissance fœtale :

- Les souris avec délétion sélective de *Dlk1* dans les cellules endothéliales placentaires présentent une réduction de taille du placenta (Appelbe et al., 2013; Moon et al., 2002) et une restriction de croissance fœtale (Howard and Charalambous, 2015a; Moon et al., 2002), ce qui peut expliquer, au moins en partie, son rôle dans la croissance fœtale.
- Comme évoqué précédemment, Dlk1 circulant dans le sang des souris gestantes joue un rôle important dans la régulation de l'adaptation métabolique de la mère à la gestation (Cleaton et al., 2016) et peut expliquer également au moins en partie le rôle de Dlk1 dans la croissance fœtale.
- En fixant Igfbp-1, la forme transmembranaire de Dlk1 augmente par compétition la forme libre de Igf-I et ainsi sa fixation sur son récepteur Igf-1R (Nueda et al., 2008), favorisant la croissance fœtale et placentaire.
- Enfin, la régulation des processus d'adipogenèse et de chondrogenèse exercée par Dlk1 (cf III.6.1) participe directement à la régulation de la croissance fœtale et postnatale (Traustadóttir et al., 2019).

Chez l'humain, *DLK1* est également exprimé par les cellules endothéliales du placenta labyrinthique dès 5 SA, et est nécessaire au bon développement du placenta (Floridon et al., 2000).

#### IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

L'état des connaissances actuelles concernant le gène *DLK1* soumis à empreinte parentale et les modèles murins d'inactivation de *Dlk1* sont en faveur d'un rôle de ce gène dans la croissance fœtale. Cependant, à l'heure actuelle, aucune mutation de *DLK1* n'a été impliquée en pathologie humaine chez des patients avec RCIU. L'objectif de ce travail expérimental était de caractériser le rôle de *DLK1* dans la croissance fœtale par une approche translationnelle puis fondamentale. L'approche translationnelle a fait l'objet de deux travaux expérimentaux. Dans un premier temps, nous nous sommes attachées à déterminer si les concentrations sériques de *DLK1* circulant dans le sang maternel au deuxième trimestre de gestation reflétaient la croissance fœtale et plus particulièrement si *DLK1* pouvait être utilisée comme un biomarqueur de RCIU. Dans un deuxième temps, nous avons étudié *DLK1* comme gène candidat de RCIU, par un séquençage de panel de gènes impliqués dans les RCIU. Enfin, l'approche fondamentale de mon travail expérimental a consisté à mettre au point un modèle cellulaire humain d'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale. En effet, par leur chevauchement clinique et moléculaire, les maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale avec RCIU comme les syndromes SRS et TS constituent un modèle d'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale et de son implication dans la croissance fœtale. Étudier les conséquences des épimutations en 11p15 et 14q32 sur la signature moléculaire du réseau de gènes soumis à empreinte parentale chez ces patients permettrait de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques participant à la régulation de la croissance fœtale.



**APPROCHE TRANSLATIONNELLE, PREMIERE PARTIE :  
DLK1 circulant dans le sang maternel pendant la gestation est-il  
un biomarqueur de retard de croissance intra-utérin ?**

## **I. Contexte clinique et scientifique**

### **I.1. Définitions et épidémiologie**

Selon l'enquête périnatale nationale française de 2016, 10,8% des nouveau-nés vivants avaient un poids de naissance inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile. Les recommandations élaborées par le CNGOF (collège national des gynécologues et obstétriciens français) en 2013 définissent un fœtus PAG comme ayant une estimation de poids fœtale (EPF) échographique inférieure au 10<sup>ème</sup> percentile et un PAG sévère comme ayant une EPF inférieure au 3<sup>ème</sup> percentile. Cette définition n'est pas univoque puisqu'un consensus international d'endocrinologues pédiatres avait défini auparavant les nouveau-nés PAG comme ayant un poids et/ou une taille de naissance inférieure à -2 déviations standard (DS) selon l'âge gestationnel (Lee et al., 2003b). La notion de RCIU fait intervenir une dimension dynamique et pathologique de la croissance avec un infléchissement de la courbe d'estimation de poids fœtal (Gordijn et al., 2016). La cause la plus fréquente est une insuffisance vasculo-placentaire (Mifsud and Sebire, 2014). Un fœtus peut, par ailleurs, avoir un RCIU sans avoir un PAG si un ralentissement de la croissance fœtale intervient entre deux échographies sans toutefois aboutir à une estimation de poids inférieure au 10<sup>ème</sup> percentile (Ego, 2013). Il y a fréquemment dans la littérature une confusion entre les termes PAG et RCIU ce qui rend difficile l'interprétation des données de la littérature sur le sujet. Le RCIU est une des causes principales de mortalité et de morbidité périnatales dans le monde (Lees et al., 2020). Les études concernant les conséquences périnatales et néonatales du RCIU portent généralement sur des groupes de patients hétérogènes. Il est difficile de définir précisément les conséquences périnatales et néonatales en différenciant les enfants PAG avec ou sans RCIU. Cependant, les conséquences sont probablement différentes, l'hypoxie présente en cas d'insuffisance placentaire expliquant en grande partie les effets délétères rencontrés chez les enfants avec RCIU. Par ailleurs, le diagnostic anténatal d'un RCIU et la surveillance qui va être associée aboutissent souvent à une prématurité induite, ce qui peut

exposer les nouveau-nés avec RCIU aux complications liées à l'anomalie de croissance fœtale et aux complications de la prématurité. Le RCIU constitue le premier facteur de risque de mort fœtale *in utero*. Trente pour cent des morts fœtales *in utero* au troisième trimestre de gestation sont associées à un RCIU (Lees et al., 2020). Dans la majorité des cas, l'association entre RCIU et mort fœtale *in utero* est liée à l'insuffisance placentaire et à l'hypoxie fœtale qui en résulte. Le dépistage anténatal du RCIU et la surveillance adaptée diminuent le risque de mort fœtale (cf paragraphe II.2.1).

## **I.2. Dépistage du retard de croissance intra-utérin**

Le dépistage échographique du RCIU, qui fait appel à une surveillance échographique avec le suivi des biométries fœtales associé à la recherche de signes indirects d'insuffisance placentaire, permet de réduire le risque de mort fœtale *in utero*. La sensibilité du dépistage anténatal des nouveau-nés PAG est estimée à 10-30% en population générale, avec une valeur prédictive positive de 50% seulement, ce qui a pour conséquences une prise en charge prénatale inadaptée et un excès de prématurité induite pour de nombreux fœtus PAG (Monier et al., 2015).

Le choix des courbes de croissance à utiliser est encore débattu à l'heure actuelle. L'utilisation des courbes dites « post-natales », construites à partir du poids de naissance des enfants, sous-estime la croissance normale aux petits âges gestationnels du fait de l'association entre prématurité et RCIU (Ego et al., 2008, 2016). Les courbes du collège Français d'Echographie Fœtale (CFEF), dont l'utilisation est actuellement recommandée par le CNGOF, ont été établies à partir de l'EPF dont le calcul intègre les mesures biométriques réalisées lors de l'échographie fœtale. Elles reflètent mieux la croissance physiologique aux âges gestationnels les plus précoces que les courbes dites postnatales. Des courbes ajustées en fonction du sexe fœtal, de l'âge, de la taille et de la parité maternels ont été développées récemment (courbes EPOPé) et sont de plus en plus utilisées par les équipes françaises (Chamagne et al., 2021; Ego et al.,

2016). En cas de RCIU, la surveillance anténatale a pour objectif de définir le terme de naissance idéal en évaluant les risques d'hypoxie fœtale chronique et de mort fœtale *in utero* au regard des conséquences de la prématurité induite. Selon certaines études, le dépistage anténatal d'un fœtus PAG réduit le risque de mort fœtale *in utero* sans augmenter le risque de mortalité néonatale (Andreasen et al., 2021; Lindqvist and Molin, 2005). En revanche, une récente étude a montré que le dépistage anténatal d'un fœtus PAG (défini dans cette étude comme une EPF<-2DS) diminue le risque de mort fœtale *in utero* mais est associé à une augmentation de la morbidité néonatale liée à la prématurité induite pour le sauvetage fœtal (Andreasen et al., 2021). Un dépistage en excès (faux positifs) augmente le risque de prématurité induite (risque multiplié par cinq chez les nouveau-nés eutrophes suspects de PAG à l'échographie anténatale par rapport aux nouveau-nés eutrophes sans suspicion anténatale de PAG) (Andreasen et al., 2021).

### **I.3. Insuffisance placentaire**

Les causes de naissance PAG sont multiples et correspondent dans un certain nombre de cas à une restriction de croissance fœtale dont la cause la plus fréquente est d'origine vasculo-placentaire. L'insuffisance placentaire est définie par l'incapacité du placenta à assurer un apport d'oxygène et de nutriments suffisants au fœtus pour permettre sa croissance et son développement (Burton and Jauniaux, 2018; Ghidini, 1996). Le placenta, organe temporaire reliant le fœtus à sa mère, est un déterminant majeur de la croissance fœtale en permettant les échanges nutritifs et gazeux materno-fœtaux nécessaires au développement du fœtus. Il possède également une fonction endocrine majeure, nécessaire à la croissance fœtale et à l'adaptation métabolique de la mère à la gestation. Le placenta est constitué d'une plaque chorionale du côté fœtal et d'une plaque basale face à l'utérus (Fig.19). Le fœtus est relié au placenta par le cordon ombilical qui prend naissance du côté de la plaque chorionale du placenta. Entre les plaques

choriale et basale se situe la chambre intervillieuse où circule le sang maternel. Grâce à un gradient de pression, la chambre intervillieuse est irriguée par les artères spiralées, puis drainée par les veines utéro-placentaires. La plaque basale de l'utérus est composée du trophoblaste extravillieux qui pénètre dans la muqueuse utérine jusqu'au tiers supérieur du myomètre (Pijnenborg et al., 1980). L'invasion des artères spiralées utérines par le trophoblaste extravillieux conduit à la formation d'une paroi atone insensible aux éléments vasoactifs, diminuant la résistance au flux sanguin, et permettant ainsi l'irrigation de la chambre intervillieuse par un gradient de pression (Pijnenborg et al., 1980).

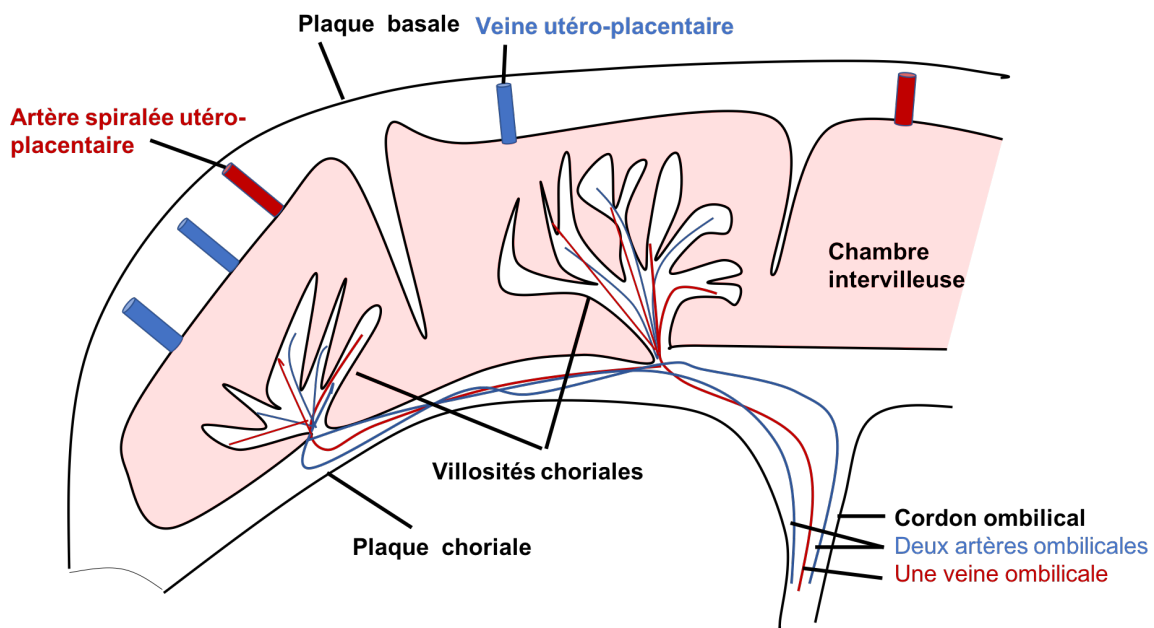


Figure 19 : Représentation schématique du placenta.

Des anomalies de développement vasculaire du placenta, des phénomènes thrombotiques et des processus inflammatoires sont impliqués dans la survenue d'une insuffisance placentaire (Kaufmann et al., 2003; Roland et al., 2016). La prééclampsie, entité définie classiquement par l'association d'une hypertension artérielle gravidique et d'une protéinurie significative survenant après 20 SA affecte 2 à 5% des gestations et est à l'origine d'une insuffisance

placentaire (Mol et al., 2016; Steegers et al., 2010).

Un des principaux enjeux du dépistage anténatal est de faire la différence entre les fœtus PAG constitutionnellement petits et les fœtus présentant une insuffisance placentaire avec RCIU qui nécessitent une surveillance accrue. La mesure échographique du périmètre abdominal est un bon marqueur de RCIU par insuffisance placentaire. En effet, en cas d'insuffisance placentaire, le système hémodynamique du fœtus s'adapte pour assurer un apport sanguin au cerveau au détriment de certains organes comme le tube digestif ou les reins (Copel and Bahtiyar, 2014). La réduction du périmètre abdominal fœtal est donc un reflet indirect du niveau d'insuffisance placentaire (Copel and Bahtiyar, 2014). L'oligoamnios, lié à la vasoconstriction rénale fœtale, est également un signe indirect d'insuffisance placentaire (Silver, 2018). La redistribution cérébrale fœtale en cas d'insuffisance placentaire peut également être documentée par la recherche d'une baisse des résistances dans l'artère cérébrale moyenne témoin de la vasodilatation cérébrale et par la mesure de l'index cérébro-placentaire (rapport de l'index de pulsatilité de l'artère cérébrale moyenne sur l'index de pulsatilité de l'artère ombilicale) (Alfirevic et al., 2017; Vollgraff Heidweiller-Schreurs et al., 2018). En combinant tous ces facteurs, le RCIU précoce par insuffisance placentaire a été défini, suite à un consensus international d'expert, par la présence avant 32 SA d'un critère parmi un périmètre abdominal inférieur au 3<sup>ème</sup> percentile, une estimation de poids fœtal inférieure au 3<sup>ème</sup> percentile ou une diastole nulle à l'échographie Doppler des artères utérines, et le RCIU tardif par l'apparition après 32 SA de deux critères parmi un périmètre abdominal inférieur au 3<sup>ème</sup> percentile ou une estimation de poids fœtal inférieure au 3<sup>ème</sup> percentile et un index cérébro-placentaire inférieur au 5<sup>ème</sup> percentile ou un index de pulsatilité dans l'artère ombilicale supérieur à 95% (Gordijn et al., 2016).

#### **I.4. Biomarqueurs de retard de croissance intra-utérin par insuffisance placentaire**

Des biomarqueurs peuvent également aider au dépistage précoce du RCIU par insuffisance placentaire, mais aucun n'a une sensibilité suffisamment importante pour être utilisé en pratique clinique courante (Gaccioli et al., 2018; Lees et al., 2020).

Un modèle combiné de prédiction au premier trimestre de gestation du risque de donner naissance à un nouveau-né PAG a été évalué dans une cohorte prospective de 4970 femmes. Ce modèle associait surveillance échographique avec Doppler utérin au premier trimestre, surveillance tensionnelle maternelle et mesure au premier trimestre de gestation des concentrations sanguines maternelles de la metalloprotéinase PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein A*) et de l'hCG (gonadotrophine chorionique humaine) produites par le placenta. Les auteurs rapportent une sensibilité de cette méthode de prédiction de 73 % pour le RCIU à début précoce (avant 34 SA) et de 32 % pour le RCIU à début tardif (à partir de 34 SA) avec un taux de faux positifs de 15 % (Crovetto et al., 2014). Les mêmes auteurs ont montré au sein d'une deuxième cohorte comprenant 9 150 femmes qu'un dépistage combiné associant caractéristiques maternelles, mesure de la pression artérielle, réalisation d'un Doppler des artères utérines et dosage du rapport sFlt-1 (fraction soluble du récepteur membranaire du VEGF - vascular endothelial growth factor de type 1 pro-angiogénique)/PlGF (facteur de croissance placentaire ou *placental growth factor*) au cours du premier trimestre de gestation augmente la sensibilité à 86 % pour la prédiction du RCIU à début précoce et à 66 % pour la prédiction du RCIU à début tardif (Crovetto et al., 2016, 2017). En utilisant une approche multiparamétrique, Miranda *et al.* ont évalué au sein d'une cohorte de 1590 femmes l'efficacité d'une méthode de dépistage du RCIU au troisième trimestre de gestation associant des facteurs de risque maternels de RCIU, l'EPF, le Doppler des artères utérines et la mesure des concentrations sanguines maternelles de PlGF et de l'estriol. Cette méthode atteint une sensibilité de 61% pour le dépistage de fœtus PAG au troisième trimestre et de 77% pour le RCIU (Miranda et al.,

2017). La mesure des concentrations sanguines maternelles de PlGF semble avoir une sensibilité élevée dans le dépistage du fœtus PAG sévère associé à une dysfonction placentaire d'origine vasculaire, particulièrement en cas de prééclampsie (Benton et al., 2016; Griffin et al., 2018).

Indépendamment du poids de naissance des nouveau-nés, le ratio sFlt-1/PlGF est actuellement utilisé en pratique courante pour prédire le risque de survenue d'une prééclampsie (Dröge et al., 2021; Zeisler et al., 2016a, 2016b). Il existe dans le placenta prééclamptique une perturbation des facteurs de régulation de l'angiogenèse. En situation physiologique, les facteurs VEGF et PlGF exprimés par le placenta favorisent l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire placentaires. VEGF et PlGF se fixent sur le récepteur FLT1 au niveau placentaire (récepteur membranaire du VEGF de type 1 pro-angiogénique). En situation d'hypoxie, le placenta ischémique libère dans la circulation maternelle une fraction soluble du FLT1 (sFlt-1) qui capte les formes circulantes de VEGF et PlGF et inhibe la vasodilatation des artères spiralées utérines (Cottrell et al., 2017). Une étude prospective de cohorte incluant 500 femmes a montré qu'un ratio sérique maternel sFlt-1/PlGF supérieur à 38 avait une sensibilité de 80% et une spécificité de 78% et une valeur prédictive négative de 99.3% au deuxième et troisième trimestres de gestation pour prédire la survenue d'une prééclampsie dans les quatre semaines qui suivent la mesure du ratio (Zeisler et al., 2016b).

### **I.5. Concentrations sériques maternelles de DLK1 pendant la gestation**

Les concentrations de DLK1 circulant dans le sang maternel augmentent au cours de la gestation et *DLK1* est exprimé par le placenta dès 5 SA (Floridon et al., 2000). Cleaton *et al.* ont démontré que les concentrations sériques de Dlk1 circulant étaient positivement associées à la masse fœtale chez des souris gestantes, et que chez l'humain les concentrations sériques de DLK1 circulant dans le sang maternel étaient significativement plus basses à 36 SA chez les



mères donnant naissance à des nouveau-nés PAG. Dans cette étude, la diminution des concentrations sériques de DLK1 semblait associée à la présence de signes d'insuffisance placentaire (Cleaton et al., 2016). MacDonald *et al.* ont récemment confirmé la réduction des concentrations sériques de DLK1 circulant à 28 et 36 SA chez des mères donnant naissance à des nouveau-nés PAG, mais n'ont pas retrouvé d'association entre les concentrations sériques de DLK1 et les signes d'insuffisance placentaire (MacDonald et al., 2020). L'objectif de ce volet de ma thèse, initié avant la publication de Mac Donald, était de déterminer s'il existe une diminution des concentrations sériques de DLK1 circulant dans le sang maternel dès le deuxième trimestre de la gestation en cas de fœtus PAG et de tester DLK1 comme biomarqueur de fœtus PAG et d'insuffisance placentaire. Nous avons réalisé une étude à partir d'un sous-groupe de la cohorte EDEN (étude des déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'enfant), afin de déterminer si DLK1 dans le sang circulant maternel est un bon marqueur de PAG et de RCIU par insuffisance placentaire vasculaire au deuxième trimestre de gestation.

## **II. Études préliminaires**

La mise au point de la mesure des concentrations sériques de DLK1 a été un pré-requis nécessaire avant de réaliser la mesure des concentrations de DLK1 dans le sang maternel au deuxième trimestre de la gestation.

### **II.1. Choix de la technique de mesure**

Comme l'équipe de Cleaton, nous avons choisi de mesurer les concentrations de DLK1 circulant dans le sang maternel à l'aide du kit ELISA DLK1 adipogen commercialisé par COGER (AG-45A-0032YEK-KI01). Ce kit est adapté à la mesure des concentrations de DLK1

circulant de 0,5 ng/mL à 30,0 ng/mL. Les concentrations de DLK1 sont déterminées grâce à un immunodosage dit « en sandwich » (Fig.20). Les anticorps primaires anti-DLK1 sont fixés sur une plaque 96 puits, au fond desquels sont déposés les échantillons. On dépose ensuite successivement un anticorps de détection spécifique, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, et enfin un révélateur de peroxydase (TMB). La mesure de la densité optique (ou absorbance) est ensuite réalisée à une longueur d'onde de 450 nm après ajout d'une solution acide qui arrête la réaction.

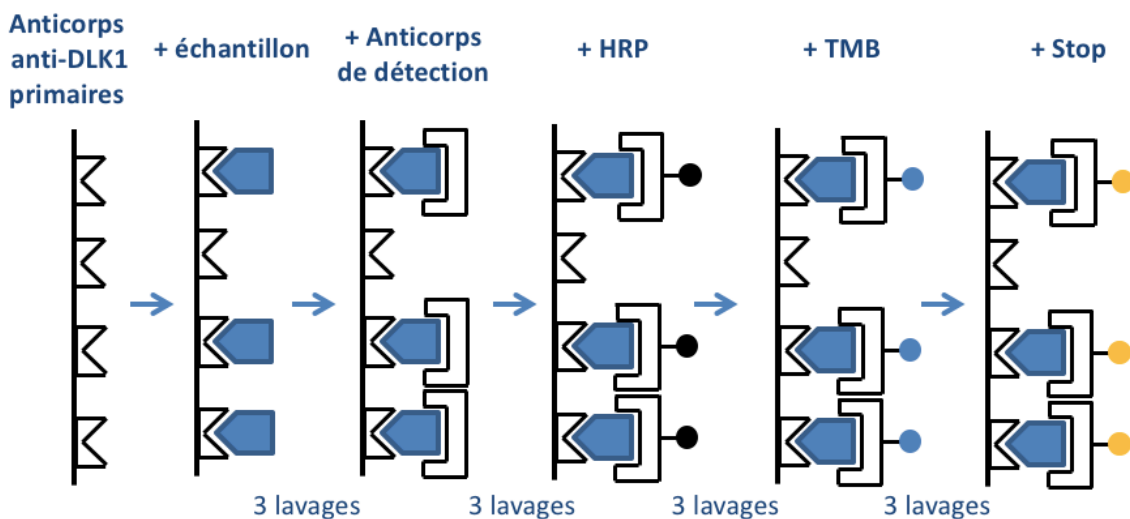


Figure 20 : Technique de mesure des concentrations de DLK1. HRP : peroxydase de raifort. TMB : révélateur de peroxydase. Stop : solution acide.

## II.2. Mise au point de la technique de mesure

Les premières mesures des concentrations sériques de DLK1, chez des femmes enceintes témoins, réalisées avec cette technique selon les recommandations du fabricant n'étaient pas concluantes du fait d'une absence de reproductibilité des mesures avec de grandes variations inter et intra essai, et des concentrations sériques de DLK1 nettement inférieures à celles décrites par Cleaton *et al.*.

Afin de s'assurer de la fiabilité de la technique de mesure décrite par le fournisseur du kit, nous avons également mesuré les concentrations de DLK1 dans le sang de patients insuffisants rénaux chroniques et de patients obèses chez qui les concentrations de DLK1 sont élevées (Chacón et al., 2008). Les concentrations de DLK1 obtenues lors de ces différentes mesures étaient également très inférieures à celles décrits dans la littérature.

Nos principales hypothèses concernant ces résultats étaient la survenue d'un effet « crochet » (Fig.21) et d'un effet « matrice » (Fig.22).

L'effet « crochet » est dû à un excès de protéines DLK1 qui ne se fixent pas sur le support solide et capturent l'anticorps de détection spécifique. Cet effet est en partie éliminé par la phase de lavage avant l'incorporation de l'anticorps marqué, qui permet d'éliminer les protéines DLK1 en excès non fixées sur la phase solide. Dans l'hypothèse d'une saturation des anticorps fixés sur phase solide par des concentrations trop élevées de DLK1 dans les sérums testés, nous avons réalisé des mesures de DLK1 dans des échantillons témoins avec plusieurs facteurs de dilution. Les concentrations de DLK1 obtenues avec ces dilutions n'étaient pas reproductibles (variabilité inter-essai) et étaient inférieures aux concentrations décrites dans la littérature.

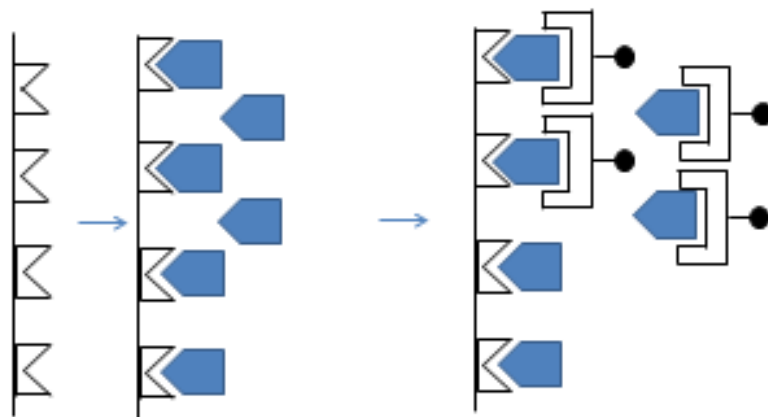


Figure 21 : Effet « crochet ». Fixation de l'anticorps secondaire sur des protéines non fixées sur la plaque.

L'effet « matrice » (Fig. 22) correspond à la présence de protéines du sérum liées à DLK1 ou éventuellement à un phénomène de dimérisation de DLK1 modifiant l'interaction antigène-anticorps. Nous avons testé cette hypothèse en incorporant dans le tampon de dilution un détergent non ionique (le tween), afin de séparer DLK1 d'éventuelles protéines interférant dans la mesure des concentrations. L'association d'une dilution des échantillons avec un tampon contenant du sérum de veau fœtal (SVF) et l'ajout de tween (Fig.22) ont permis d'obtenir des concentrations sériques de DLK1 comparables à celles de la littérature, avec une bonne reproductibilité inter et intra essai.

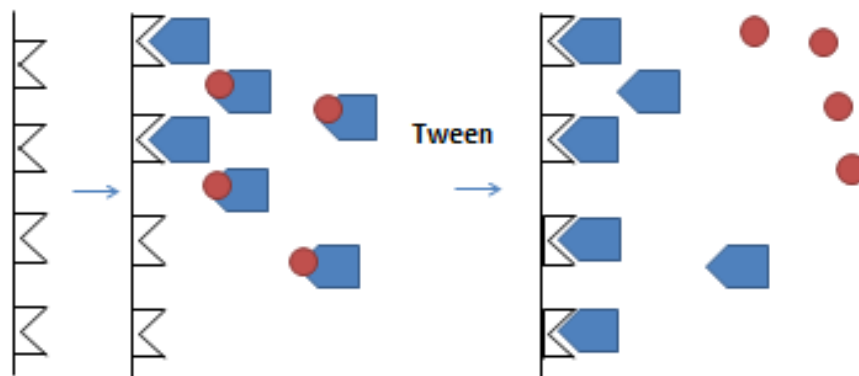


Figure 22 : Effet « matrice » levé par l'ajout de détergent dans le tampon. En bleu DLK1, en rouge protéines liées à DLK1. Tween : détergent non ionique.

### II.3. Choix du facteur de dilution

Afin de déterminer le niveau de dilution des échantillons nécessaire à la mesure des concentrations de DLK1, nous avons testé différents niveaux de dilution du sérum obtenu chez six femmes enceintes (Fig.23). Pour des concentrations de DLK1 circulant situées entre 15 et 30 ng/mL, un plateau est atteint à partir d'une dilution des échantillons au 1/8<sup>ème</sup>. Pour des concentrations supérieures à 30 ng/mL, le plateau n'est atteint qu'à partir d'une dilution des échantillons au 1/32<sup>ème</sup>. Les concentrations circulantes de DLK1 dans le sang maternel au

deuxième trimestre de gestation étant inférieures à 30 ng/mL (Cleaton et al., 2016), une dilution au 1/8<sup>ème</sup> était suffisante pour notre étude.

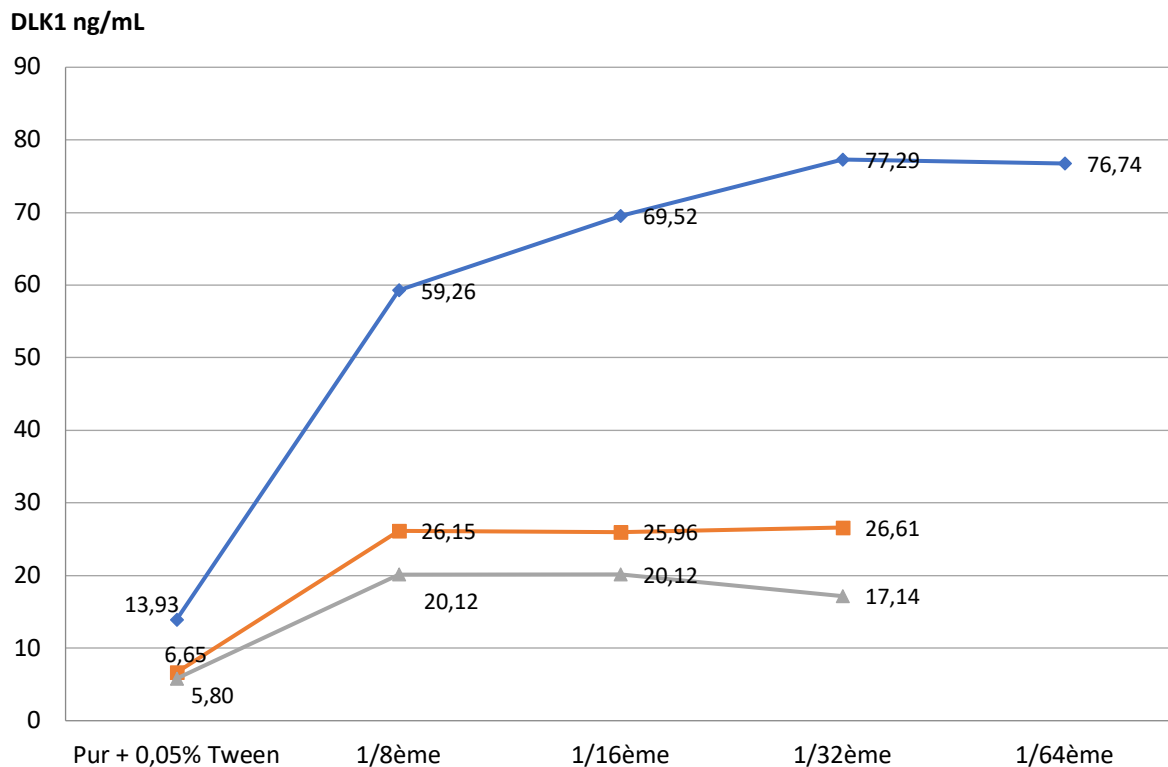


Figure 23 : Effet de la dilution sur le dosage de DLK1 dans le sérum prélevé chez des femmes durant la gestation. N=3.

#### II.4. Choix du type d'échantillon

Les mesures des concentrations sanguines de DLK1 circulant réalisées par l'équipe de Cleaton ont été réalisées dans des sérums prélevés à jeun. Le fournisseur du kit Adipogen conseille également une mesure dans le sérum.

Des échantillons de plasma à jeun ou de sérum après charge en sucre étant plus facilement disponibles au sein de la cohorte dans laquelle nous souhaitions réaliser notre étude, nous avons testé la reproductibilité des mesures des concentrations de DLK1 circulant dans ces différents échantillons chez 13 femmes enceintes, en comparant pour chacune les concentrations de DLK1

mesurées dans le plasma ou dans le sérum après charge en sucre et les concentrations de DLK1 mesurées dans le sérum à jeun. Le ratio DLK1 mesuré dans le plasma à jeun / DLK1 mesuré dans le sérum à jeun varie de 0,6 à 1,4 sur cet échantillon de 13 femmes (Fig.24a), avec un coefficient de variation de 1,5 à 26,5% (moyenne 12 %). Le ratio DLK1 mesuré dans le plasma après charge en sucre / DLK1 mesuré dans le sérum à jeun varie de 0,85 à 1,05 sur cet échantillon de 13 femmes (Fig.24b), avec un coefficient de variation de 0,4 à 11,6 (moyenne 7,5 %). Devant l'absence de reproductibilité des mesures dans le plasma, et la diminution des concentrations de DLK1 circulant après charge en sucre, nous avons décidé de réaliser les mesures dans le sérum à jeun.

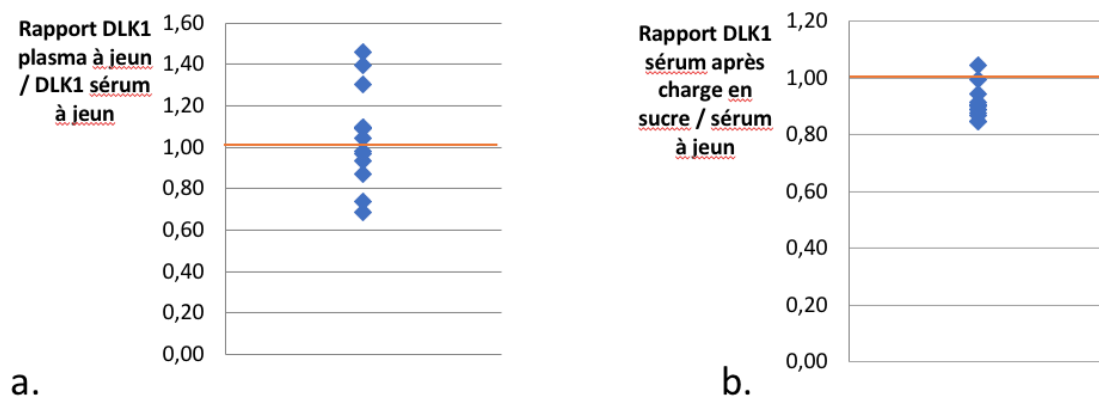


Figure 24 : Reproductibilité des mesures des concentrations de DLK1. a/ entre les mesures effectuées dans le plasma et le sérum. b/ avant et après charge en sucre.

## II.5. Évolution des concentrations de DLK1 au cours de la gestation

La deuxième étape a été de déterminer l'évolution de DLK1 circulant dans le sang maternel de femmes ayant donné naissance à des nouveau-nés eutrophes. Pour ce faire, nous avons mesuré les concentrations de DLK1 dans le sérum d'un panel de 78 femmes enceintes aux termes de 9 à 39 SA afin de déterminer l'évolution des concentrations au cours de la gestation. Toutes ces

femmes ont donné naissance à des nouveau-nés eutrophes. Les sérums utilisés pour ce dosage sont issus d'une collection biologique du laboratoire d'hormonologie de l'hôpital Armand Trousseau. Les concentrations de DLK1 circulant dans le sang maternel sont très basses durant le premier trimestre de gestation et semblent augmenter de manière exponentielle au cours de la gestation, avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,82$  (Fig.25).

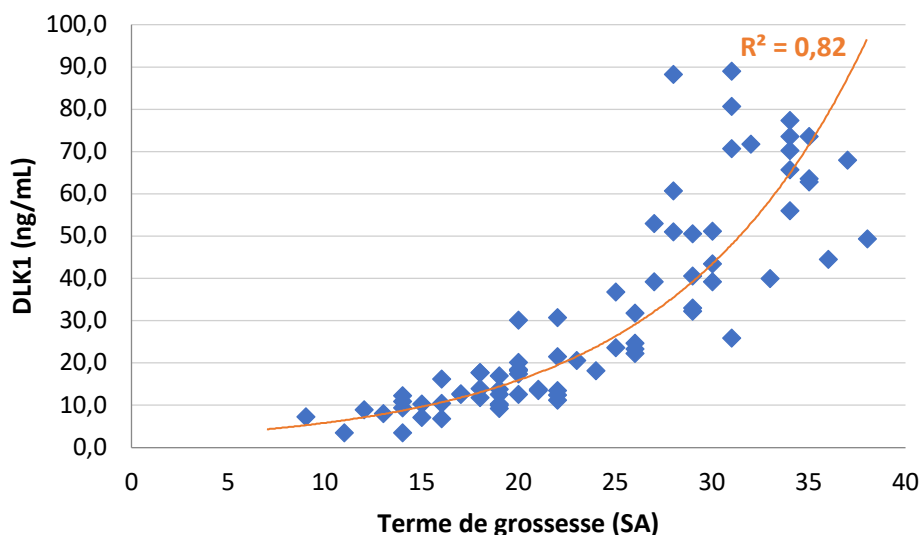


Figure 25 : Évolution des concentrations sériques de DLK1 circulant en fonction du terme de gestation (N=78). SA : semaines d'aménorrhée.

## II.6. La cohorte EDEN

Une collaboration a été instaurée avec l'équipe du Docteur Barbara Heude (Inserm UMR 1153 - Centre de Recherche Epidémiologie et Biostatistique Sorbonne Paris Cité (CRESS), Équipe de recherche sur les origines précoces de la santé et du développement de l'enfant (ORCHAD)), investigatrice principale de la cohorte EDEN. La cohorte EDEN a reçu l'approbation du comité d'éthique (CPPRB) de l'hôpital Kremlin Bicêtre le 12 Décembre 2002 et de la CNIL (Commission Nationale Informatique et Liberté).

La cohorte EDEN a été constituée en 2003 au sein de deux maternités françaises (centre hospitalo-universitaire régional de Nancy et centre hospitalo-universitaire de Poitiers) (Heude

et al., 2016). Entre 2003 et 2006, 2002 femmes ont été incluses dans la cohorte EDEN (1034 à Nancy, 968 à Poitiers), 95 ont quitté l'étude pendant leur gestation, et les données sont manquantes pour 125 enfants. Au total, 1899 couples mère-enfant ont donc été inclus dans cette cohorte.

Les données suivantes ont été collectées chez ces 1899 couples mère-enfant :

- Données pré-partum chez les mères : âge, poids, taille, parité, niveau d'éducation, profession ;
- Données pré-partum chez les pères : poids, taille, antécédent de diabète, consommation d'alcool et de toxique, profession ;
- Pendant la gestation : données échographiques (mensurations, échographie Doppler des artères utérines et ombilicales) recueillies entre 20 et 24 SA et entre 30 et 34 SA, diabète gestationnel, prééclampsie ;
- À la naissance de l'enfant : parité, âge gestationnel, poids, taille et périmètre crânien de naissance, sexe de l'enfant.

## **II.7. Définition des nouveau-nés PAG et choix des témoins**

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les concentrations de DLK1 circulant maternel sont un marqueur prédictif de PAG au 2<sup>ème</sup> trimestre de gestation, j'ai mesuré les concentrations de DLK1 dans le sérum maternel de femmes ayant donné naissance à des nouveau-nés PAG et les ai comparées aux concentrations sériques maternelles de DLK1 de femmes ayant donné naissance à des nouveau-nés eutrophes. Les nouveau-nés PAG ont été définis comme ayant un poids de naissance inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile selon les courbes de croissance individualisées EPOPé. Les témoins ont été sélectionnées parmi les couples mère-enfant dont le poids de naissance de l'enfant était situé entre le 25<sup>ème</sup> et le 75<sup>ème</sup> percentile des courbes individualisées EPOPé.



Chaque couple mère-enfant PAG a été apparié à deux couples mère-enfant témoins sur les facteurs suivants :

- Le centre d'inclusion.
- L'âge gestationnel au moment du prélèvement du sérum (à la semaine d'aménorrhée près) (cf Fig.25) .
- L'âge maternel. En effet, les mesures des concentrations de DLK1 réalisées chez 23 témoins de sexe féminin âgés de 0 à 39 ans dont les prélèvements sont issus de la collection biologique du laboratoire d'hormonologie de l'hôpital Armand Trousseau ont montré que les concentrations sériques de DLK1 circulant diminuent avec l'âge chronologique (Fig.26).

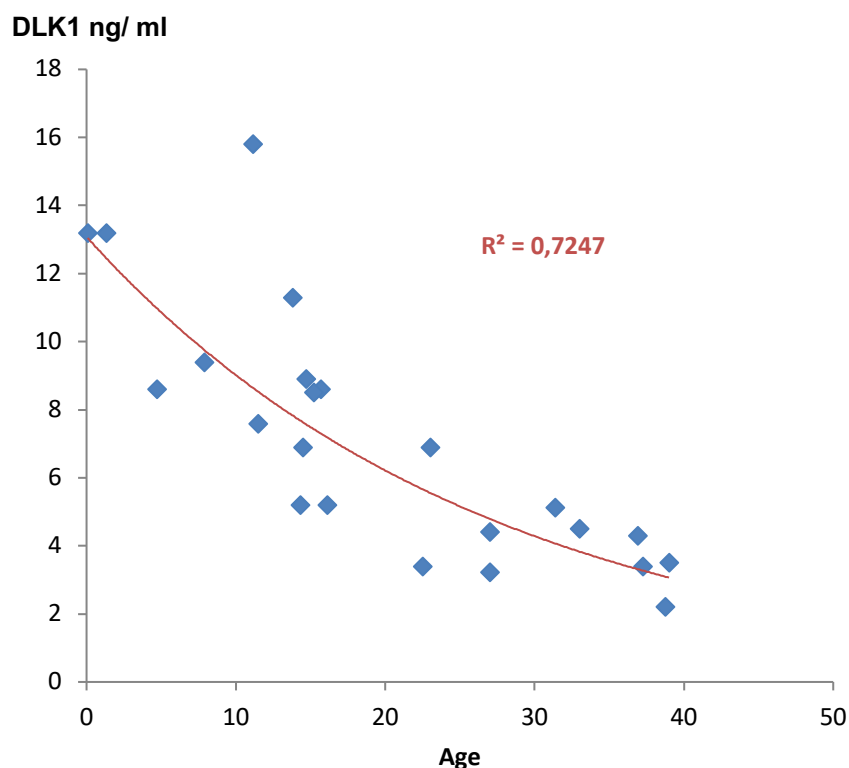


Figure 26 : Évolution des concentrations sériques de DLK1 circulant chez des témoins en fonction de leur âge chronologique.

- L'IMC maternel avant la gestation selon quatre classes : IMC <18,5 kg/m<sup>2</sup>, 18,5-24,9

kg/m<sup>2</sup>, 25-30 kg/m<sup>2</sup>, > 30 kg/m<sup>2</sup>. En effet, Chacón *et al.* ont montré que les concentrations sériques de DLK1 circulant sont significativement plus élevés chez des sujets obèses (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) comparativement à des sujets dont l'IMC est situé entre 18,5 et 25 kg/m<sup>2</sup> (Fig.27) (Chacón et al., 2008). Il ne semble pas y avoir d'augmentation significative des concentrations sériques de DLK1 chez les sujets en surpoids non obèses (IMC 25-30 kg/m<sup>2</sup>).

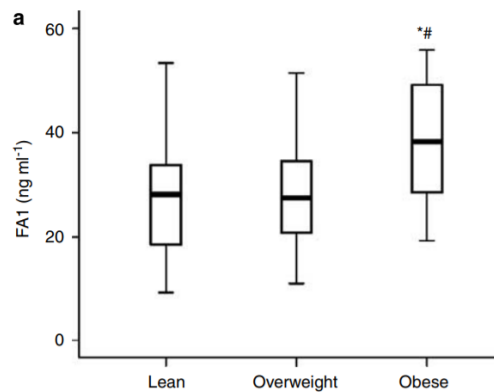


Figure 27 : Mesure des concentrations de DLK1 circulant chez des témoins en fonction de l'IMC. D'après Chacón et al., 2008.

Le sexe de l'enfant et la parité étant déjà pris en compte dans les courbes de croissance EPOPé, nous n'avons pas retenu ces deux critères comme facteur d'appariement.

## II.8. Définition des cas de RCIU par insuffisance placentaire vasculaire

Dans l'étude de Cleaton *et al.*, les concentrations sériques de DLK1 circulant étaient significativement plus faibles chez les enfants nés avec un RCIU par insuffisance placentaire vasculaire (Cleaton et al., 2016). Cette différence n'était pas significative chez les nouveau-nés PAG sans critère d'insuffisance placentaire vasculaire. Nous souhaitons réaliser une analyse de sous-groupe afin de déterminer si DLK1 circulant au 2<sup>ème</sup> trimestre de la gestation est un marqueur de RCIU par insuffisance placentaire vasculaire.

Nous avons retenu les critères suivant pour classer les nouveau-nés PAG en sous-groupe d'origine vasculaire ou non vasculaire (Gordijn et al., 2016; Miller et al., 2008):

- Antécédents maternels : maladie auto-immune, hypertension artérielle préexistante à la gestation, prééclampsie,
- Signes échographiques : périmètre crânien/périmètre abdominal (PC/PA) <10<sup>ème</sup> percentile, anomalie de structure placentaire,
- Signes Doppler : élévation des index de résistance des artères utérines, notch bilatéral sur le spectre des artères utérines, élévation de l'index de résistance de l'artère ombilicale, abaissement de l'index de résistance de l'artère cérébrale moyenne.

**III. Article original accepté pour publication par le journal ‘*Frontiers in Endocrinology, section pediatric endocrinology*’, sous presse : Low maternal DLK1 levels at 26 weeks is associated with small for gestational age at birth.**

A PHAM, D MITANCHEZ, A FORHAN, L PERIN, Y LE BOUC, F BRIOUDE, ML  
SOBRIER, B HEUDE\* and I NETCHINE\*.

\* co-derniers auteurs



# Low Maternal DLK1 Levels at 26 Weeks Is Associated With Small for Gestational Age at Birth

Aurelie Pham<sup>1</sup>, Delphine Mitanchez<sup>2</sup>, Anne Forhan<sup>3</sup>, Laurence Perin<sup>4</sup>, Yves Le Bouc<sup>5</sup>, Frederic Brioude<sup>6</sup>, Marie-Laure Sobrier<sup>5</sup>, Barbara Heude<sup>3†</sup> and Irene Netchine<sup>6\*†</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 938 - Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Service de Néonatalogie, Paris, France, <sup>2</sup> Service de Néonatalogie, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, Tours, France, <sup>3</sup> CRESS – U1153 - Equipe 06: "ORCHAD: Origines Précoces de la Santé du Développement de l'Enfant", INSERM, Villejuif, <sup>4</sup> APHP, Hôpital Armand Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, Laboratoire d'Endocrinologie, Paris, France, <sup>5</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 938 - Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, France, <sup>6</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 938 - Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Tsutomu Ogata,  
Hamamatsu University School of  
Medicine, Japan

### Reviewed by:

Masayo Kagami,  
National Center for Child Health and  
Development (NCCHD), Japan  
Anne Gabory,  
Institut National de la Recherche  
Agronomique (INRA), France

### \*Correspondence:

Irene Netchine  
irene.netchine@aphp.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pediatric Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

Received: 15 December 2021

Accepted: 26 January 2022

Published: xx xx 2022

### Citation:

Pham A, Mitanchez D, Forhan A,  
Perin L, Le Bouc Y, Brioude F,  
Sobrier M-L, Heude B and Netchine I  
(2022) Low Maternal DLK1 Levels at  
26 Weeks Is Associated With Small for  
Gestational Age at Birth.  
Front. Endocrinol. 13:836731.  
doi: 10.3389/fendo.2022.836731

Detecting SGA (small for gestational age) during pregnancy improves the fetal and neonatal prognosis. To date, there is no valid antenatal biomarker of SGA used in clinical practice. Maternal circulating DLK1 (delta-like non-canonical notch ligand 1) levels have been shown to be significantly lower in pregnant women at 36 weeks of gestation (WG) who delivered a SGA newborn than in controls. Data in the literature are contradictory on the association between maternal circulating DLK1 levels and placental vascular dysfunction. The objective was to determine if maternal DLK1 levels in the second trimester of pregnancy are predictive of SGA, and to assess whether the measurement of DLK1 levels in maternal blood could be a means to distinguish SGA with placental vascular dysfunction from that due to other causes. We conducted a nested case-control study within the EDEN mother-child cohort. 193 SGA (birth weight < 10<sup>th</sup> percentile) and 370 mother-child control (birth weight between the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile) matched pairs were identified in the EDEN cohort. Maternal circulating DLK1 levels at 26 WG were significantly lower for children born SGA than for controls (27.7 ± 8.7 ng/mL vs 30.4 ± 10.6 ng/mL, p = 0.001). Maternal blood DLK1 levels in the first quartile (DLK1 < 22.85 ng/mL) were associated with an odds ratio for SGA of 1.98 [1.15 - 3.37]. DLK1 was less predictive of SGA than ultrasound, with an area under the curve of 0.578. Maternal circulating DLK1 levels were not significantly different in cases of SGA with signs of placental vascular dysfunction (n = 63, 27.1 ± 9.2 ng/mL) than in those without placental dysfunction (n = 129, 28.0 ± 8.5 ng/mL, p = 0.53). The level of circulating DLK1 is reduced in the second trimester of pregnancy in cases of SGA at birth, independently of signs of placental vascular dysfunction. However, DLK1 alone cannot predict the risk of SGA.

**Keywords:** DLK1, small for gestational age (SGA), fetal growth restriction, placental vascular dysfunction, biomarker

**Q16** INTRODUCTION

Fetal growth restriction (FGR), defined as a failure of the fetus to reach its genetically determined growth potential (1), is one of the most common causes of perinatal mortality and morbidity. FGR often results in neonates who are small for gestational age (SGA), usually defined as a birth weight < 10<sup>th</sup> percentile of a given reference by neonatologists or a birth weight and/or height of < -2 standard deviations of the reference mean by endocrinologists (2, 3).

The performance of ultrasound to detect SGA during pregnancy is low, with a sensitivity of 10 to 30% in the general population and a positive predictive value of 50% (4). However, detecting SGA during pregnancy in the second or third trimester of gestation has been shown to improve the fetal and neonatal prognosis and may be associated to long term metabolic consequences (5–7). A study including 92,218 singletons reported a lower stillbirth rate in antenatal-detected versus non-detected SGA (9.7 vs 18.9 per 1000 births) (8). Another recent study including 2425 FGR children reported that stillbirth risk was increased in undetected FGR fetuses (OR 2.63) (9). FGR results from multiple causes (10). One of the main causes of SGA is placental vascular dysfunction. Placental vascular dysfunction, due to abnormal placentation with inadequate remodeling of maternal spiral and altered uteroplacental blood perfusion, impairs materno-fetal exchange of nutrients and oxygen leading to FGR (11–13). The identification of SGA with placental vascular dysfunction is clinically relevant because of poorer perinatal outcomes and higher risks of severe neonatal comorbidities than for SGA without placental vascular dysfunction were reported (10, 14, 15). Repeated estimations by ultrasound of fetal weight (EFW) and abdominal circumference, Doppler-flow velocimetry of umbilical artery (UA) and fetal middle cerebral artery (MCA) and pulsatility index in uterine artery (UtA) are currently used to diagnose FGR with placental vascular dysfunction (16). Indeed, a high mean pulsatility index in UtA reflects the lack of physiological transformation of the uterine arteries from high- to low-resistance vessels. This is associated with maternal vascular malperfusion of the placenta and consequently of the fetus, leading to fetal hypoxia (13). On the fetal side, Doppler velocimetry allows the evaluation of cerebroplacental ratio (ACM pulsatility index/UA pulsatility index) that reflects the cardiovascular adaptation of the fetus to hypoxia (13).

However, another promising approach is to combine ultrasonic data with maternal biomarkers of placental dysfunction (1). To date, no antenatal predictive biomarker of SGA are used in clinical practice (1, 14, 17).

DLK1 (delta-like non-canonical notch ligand 1) is the product of an imprinted gene that is expressed during fetal development (18). Parental imprinting is an epigenetic mechanism that refers to the monoallelic silencing of genes according to their parental origin. In the 14q32 imprinted region, the imprinting control center *MEG3/DLK1:IG-DMR* is methylated on the paternal allele (19), resulting in *DLK1* expression from the same allele. DLK1 is a single-pass transmembrane protein that is cleaved by extracellular proteases to give rise to a circulating form, which

reaches a high concentration in the maternal circulation during pregnancy (20), as well as in the amniotic fluid and fetal circulation during the second and third trimesters (18). DLK1 plays an important role in preserving the pool of various progenitor cells until they differentiate (18) and has an impact on metabolism. *DLK1*, also called *PREF-1* (preadipocyte factor 1), is known for its involvement in adipogenesis (21, 22). *Dlk1* null mice display accelerated weight gain and hyperlipidemia (22) and patients with *DLK1* mutations show metabolic alterations in adulthood (23). Data show that DLK1 is present in the extra-embryonic tissue as early as five weeks of gestation (WG) and then until birth (18). Cleaton et al. showed maternal circulating DLK1 levels to be positively associated with embryonic mass during mouse gestation and to be required for maternal metabolic adaptations to pregnancy. According to Cleaton, DLK1 levels are significantly lower at 36 WG for pregnant women who later delivered a SGA newborn than controls. In the same study, maternal circulating DLK1 levels were also associated with placental vascular dysfunction and FGR (20). MacDonald et al. recently confirmed low circulating maternal DLK1 levels at 28 and 36 WG for women who finally delivered a SGA newborn, but they did not find any significant association with placental vascular dysfunction (24).

Evaluation of the association between maternal DLK1 levels and fetal growth at an earlier gestational age would offer a greater clinical benefit. We aimed to determine whether the level of DLK1 in maternal serum during the second trimester of gestation is a predictive biomarker of SGA and to assess whether the measurement of DLK1 levels in maternal blood could be a means to distinguish SGA with placental vascular dysfunction from that due to other causes.

**MATERIALS AND METHODS****The EDEN Mother-Child Cohort**

This is a nested case-control study based on the EDEN mother-child cohort (25) that was set up in 2003 in two university maternity clinics, Nancy and Poitiers, France. Participation in the EDEN mother-child cohort was proposed to all women visiting the prenatal clinic before 24 WG. Exclusion criteria were multiple pregnancies, known diabetes before pregnancy, the inability to read and understand French, or planning to move out of the region within the next three years. Among the 3,758 women invited to participate in the EDEN mother child-cohort, 2,002 (53%) were enrolled in the study (1,034 women from Nancy and 968 from Poitiers).

**Data Collection**

Data were collected from medical and obstetrical records and clinical examinations. Mothers underwent a clinical examination with blood sampling at 24 to 28 WG. At birth, the weight of the newborns was measured by midwives using an electronic scale (Seca Ltd). Data on maternal smoking during pregnancy and maternal and newborn characteristics were collected during pregnancy or at birth. Maternal weight before pregnancy was obtained by interview

at inclusion and maternal height measured during the clinical examination. Both anthropometric measurements were used to calculate the BMI as the reported weight (kilograms) divided by the square of the measured height (meters). Information on ultrasound measurements and placental function measured at 26 WG were collected from obstetrical records: fetal head circumference, fetal abdominal circumference, femur length, amniotic fluid index, notch in Doppler flow velocimetry of the uterine artery, pulsatility index, and reverse flow on umbilical doppler. Information on the presence of a maternal vascular disease before pregnancy (chronic high blood pressure, sickle cell anemia, antiphospholipid or anticardiolipin antibody syndrome, or autoimmune disease) was also collected from obstetrical records.

## Case-Control Study Design

We conducted a case-control study nested within the EDEN mother-child cohort. Cases were defined as mothers who gave birth to newborns with a birth weight < 10<sup>th</sup> percentile according to customized fetal growth charts (26). For each case, two matched controls were recruited among mothers who gave birth to AGA (adapted for gestational age) newborns with a birth weight between the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile of the same customized references (26). Controls were matched for the maternity clinic (Nancy – Poitiers), sex of the child, maternal age, maternal body mass index (BMI) (4 groups: < 18.5 kg/m<sup>2</sup>, 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>, 25-30 kg/m<sup>2</sup>, > 30 kg/m<sup>2</sup>), and gestational age (GA) at blood collection. In total, 196 SGA mother-child pairs and 370 match control pairs were identified in the EDEN mother-child cohort.

## Definition of SGA With Signs of Placental Vascular Dysfunction

SGA children were considered to be SGA with placental vascular dysfunction when they met at least one of the following criteria (1, 27): fetal head circumference > 10<sup>th</sup> percentile and fetal abdominal circumference < 10<sup>th</sup> percentile, presence of a notch in Doppler-flow velocimetry of the UtA, high-resistance UtA flow, defined as a mean pulsatility index > 95<sup>th</sup> percentile, reverse flow on umbilical doppler, high-resistance UA flow, defined as a pulsatility index > 95<sup>th</sup> percentile, or the presence of a maternal vascular disease before pregnancy (chronic high blood pressure, sickle cell anemia, antiphospholipid syndrome).

## Quantitative Determination of DLK1 Levels in Serum

Q19 Serum samples were frozen on the day of collection and stored at -80°C. The DLK1 concentration was measured blind to the case/control status. Maternal serum DLK1 levels were quantified in 96-well plates using the DLK1 soluble (human) ELISA Kit (Adipogen Life sciences, Coger, Switzerland), based on the sandwich enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA). Maternal serum samples were diluted 1/10 with buffer (Adipogen Life sciences, Coger, Switzerland) containing fetal bovine serum (0.5%) and Tween (0.05%) before binding to the antibody-coated plates. The human DLK1 ELISA kit was then used according to the manufacturers' instructions.

## Statistical Analysis

Characteristics of the mothers and children are described using means ± SD and frequencies (%). Differences between cases and controls were tested using Student *t* and chi-square tests for continuous and categorical variables, respectively. Circulating DLK1 levels were compared according to maternal and pregnancy characteristics using Student *t* tests or ANOVA for multiple means comparisons. Univariate analysis was performed by the analysis of variance for qualitative variables or the Pearson correlation coefficient for quantitative variables. The effect of placental vascular dysfunction was assessed using an interaction test. The association between circulating DLK1 levels and SGA was investigated using unconditional logistic multiple regression models, adjusted for matching factors: center, sex of the child, gestational age, maternal age, pre-pregnancy BMI, and gestational age at blood collection. Two models were computed, one with DLK1 considered as a continuous trait and the other with DLK1 considered as a categorical variable divided into quartiles.

We assessed the discriminative power of DLK1 alone or in combination with ultrasound measurements by examining the ROC curves of the respective models. The areas under the ROC curves (AUROCs) were measured using Mann-Whitney tests and compared using DeLong tests. This analysis was conducted using the data from 520 subjects (180 cases and 340 controls) due to missing values for the ultrasound data. We conducted sensitivity analyses to determine whether further adjustment for smoking during pregnancy modified the results. Statistical analyses were performed using SAS<sup>®</sup> 9.3 with AIX 7.1, with *P* < 0.05 considered to be statistically significant.

## Ethics Approval and Consent to Participate

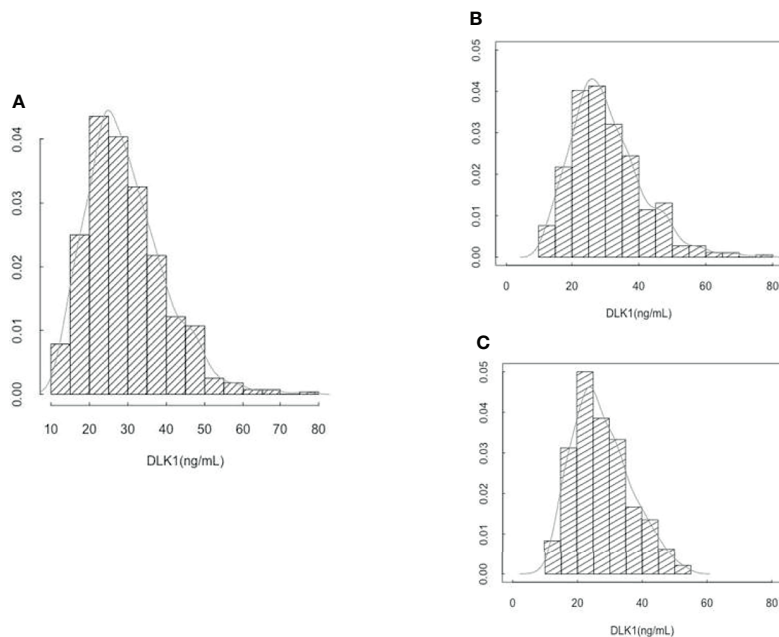
The EDEN mother-child cohort received approval from the ethics committee of the Kremlin Bicêtre Hospital (France) on 12 December 2002 and from the French data privacy institution CNIL. All participants were treated in accordance with French national ethics regulations.

## RESULTS

### DLK1 Levels at 26 WG Are Lower for Women Who Give Birth to SGA Infants

Among the 193 identified cases of SGA, the DLK1 value was aberrant in the maternal serum of one SGA case (870.7 ng/mL vs a mean value of for the other 562 samples 29.5 ± 10.1ng/mL). After exclusion of this subject and her matched controls, 192 SGA and 368 matched controls were included in the analyses. Sixty-three cases of SGA (32.6%) were classified in the subgroup of SGA with placental vascular dysfunction. The distribution of DLK1 values is presented in **Figure 1**.

Q27 Characteristics of the two groups are presented in **Table 1**. The median gestational age at blood sampling was 26 WG. As expected, there were no differences between cases and controls concerning the matching factors. The proportion of women who



**FIGURE 1 | (A)** Distribution of circulating DLK1 levels at 26 weeks of gestation in 560 EDEN mothers. **(B)** Distribution of circulating DLK1 levels at 26 weeks of gestation in 368 mothers who gave birth to AGA newborn. **(C)** Distribution of circulating DLK1 levels at 26 weeks of gestation in 192 mothers who gave birth to SGA newborn.

declared smoking during pregnancy was no different between cases and controls.

There were also no differences in DLK1 levels according to the center of inclusion or the sex of the neonates (Table 2). DLK1 levels in maternal blood serum at 26 WG were significantly lower for women who gave birth to SGA infants ( $27.7 \pm 8.7$  ng/mL) than for control women ( $30.4 \pm 10.6$  ng/mL,  $p = 0.001$ ) (Table 2).

Consideration of DLK1 as continuous variable in the multiple regression analysis showed a significant association of DLK1 levels with SGA: a 1 ng/mL increase in DLK1 decreased the risk of

SGA by 3%. Consideration of DLK1 as a categorical variable divided into quartiles showed an odds ratio for SGA of 1.98 [1.15 - 3.37] in the first quartile compared to the last (Table 3).

### DLK1 Levels Are Lower for Women Who Give Birth to SGA Infants Independently of Placental Vascular Dysfunction

Maternal circulating DLK1 levels were not significantly different in cases of SGA with signs of placental vascular dysfunction ( $n = 63$ ,  $27.1 \pm 9.2$  ng/mL) than in those without placental

**TABLE 1 |** Characteristics of the matched case and control pregnancies from the EDEN mother-child cohort.

n	All 560	Control 368	Case 192	p
<b>Medical Center</b>				0.93
Poitiers	41.4% (232)	41.3% (152)	41.7% (80)	
Nancy	58.6% (328)	58.7% (216)	58.3% (112)	
<b>Sex</b>				0.88
Female	46.4% (260)	46.2% (170)	46.9% (90)	
Male	53.6% (300)	53.8% (198)	53.1% (102)	
<b>Maternal age (years)</b>	$29.3 \pm 4.5$	$29.3 \pm 4.5$	$29.3 \pm 4.7$	0.91
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	$23.1 \pm 4.5$	$23.0 \pm 4.4$	$23.3 \pm 4.7$	0.51
< 18.5	10% (56)	10.6% (39)	8.9% (17)	0.80
[18.5-25]	64.6% (362)	65.2% (240)	63.5% (122)	
[25-30]	17.7% (99)	16.5% (62)	19.3% (37)	
$\geq 30$	7.7% (43)	7.3% (27)	8.3% (16)	
<b>Gestational age at blood sampling (WG)</b>	$26.2 \pm 1.2$	$26.3 \pm 1.2$	$26.2 \pm 1.2$	0.79
<b>Smoking during pregnancy*</b>				0.13
No	71.2% (398)	73.3% (269)	67.2% (129)	
Yes	28.8% (161)	26.7% (98)	32.8% (63)	

\*Information was missing for one woman.



**TABLE 2** | DLK1 maternal serum levels at 26 weeks of gestation according to maternal and neonatal characteristics.

Cases/Controls	n	m ± sd	p
Controls	368	30.4 ± 10.6	< 10 <sup>-3</sup>
Cases (SGA)	192	27.7 ± 8.7	
<b>Medical Center</b>			0.75
Poitiers	232	29.3 ± 10.6	0.36
Nancy	328	29.6 ± 9.9	
<b>Sex</b>			0.009
Male	300	29.1 ± 9.4	0.009
Female	260	29.9 ± 10.7	
<b>Placental vascular dysfunction</b>			0.009
Controls	368	30.4 ± 10.6	0.009
Cases (SGA) without signs of placental vascular dysfunction	129	28.0 ± 8.5	
Cases (SGA) with signs of placental vascular dysfunction	63	27.1 ± 9.2	
<b>Smoking during pregnancy</b>			0.07
No	398	29.9 ± 10.5	0.07
Yes	161	28.4 ± 8.8	

dysfunction (n = 129, 28.0 ± 8.5 ng/mL, p = 0.53). Indeed, they both showed significantly lower levels of maternal circulating DLK1 than controls (n = 368) (30.4 ± 10.6 ng/mL, p = 0.009) (Table 2).

### DLK1: A Predictive Biomarker of SGA?

The ROC curve showed DLK1 levels to be less predictive of SGA (Area under the receiver operating characteristic curve – AUROC = 0.578) than the ultrasound alone model (AUROC = 0.658) (Figure 2). Combining DLK1 levels with the prenatal ultrasound detection of SGA significantly increased the prediction of SGA than DLK1 alone (AUROC for ultrasound associated with maternal DLK1 levels = 0.675, p = 0.0002;). However, DLK1 levels do not add much to the ultrasound model alone.

## DISCUSSION

We showed the maternal level of DLK1 to be significantly lower during the second trimester of pregnancy for women who delivered a SGA newborn than that of women who delivered an AGA newborn. However, DLK1 levels were less predictive of SGA than ultrasound alone and combining DLK1 levels with ultrasound did not add much to the predictive value of ultrasound data alone. We observed a decrease in the level of

DLK1 of the same magnitude in cases of SGA with placental vascular dysfunction as those due to other causes.

### DLK1 Levels in 2nd Trimester of Gestation Are Associated With SGA

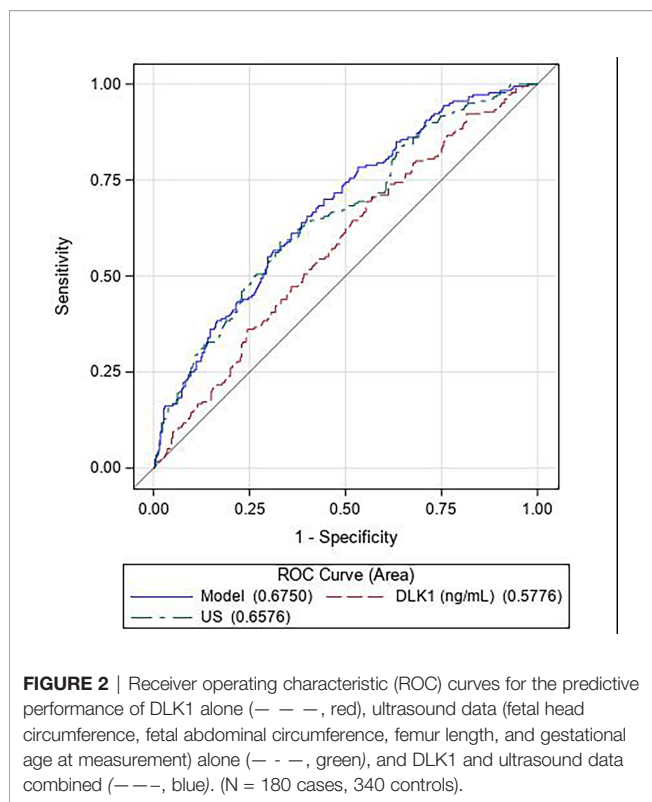
Our results show an association between DLK1 levels in pregnancy during the 2<sup>nd</sup> trimester of gestation and SGA, which was first described by Cleaton et al. for DLK1 levels measured during the 3<sup>rd</sup> trimester of gestation (20). They reported lower levels of DLK1 at 36 WG for women who gave birth to SGA children in a study that included 45 women who delivered a SGA newborn and 43 matched controls. Recently, McDonald et al. confirmed lower DLK1 levels at 36 WG for women with SGA children in a cohort of 105 SGA and 245 controls. They also reported that DLK1 levels were already significantly reduced at 28 WG in women who delivered a SGA infant in a sub-group of 84 SGA cases and 132 controls (24). With a larger cohort and earlier in pregnancy than Cleaton and McDonald, our study confirms the association of DLK1 levels with SGA. The demonstration of such an association at an early stage in pregnancy should be beneficial for the management of newborns.

However, it is not well established whether the reduction of circulating maternal DLK1 levels during pregnancy causes fetal growth restriction or whether the low weight of the fetus and the placenta diminishes maternal DLK1 levels. An important clue to

**TABLE 3** | Multivariable logistic regression analyses of DLK1 as a predictor of risk of SGA (N = 560).

	Odds Ratio [95%IC]	p-value
DLK1 (for 1 ng/mL)	0.97 [0.95 - 0.99]	0.003
Separately according to center		
Poitiers (n = 232)	0.97 [0.940 - 1.000]	0.052
Nancy (n = 328)	0.97 [0.946 - 0.996]	0.025
DLK1 Quartiles (ng/mL)		0.013
Q1 < 22.85	1.98 [1.15 - 3.37]	
Q2 22.85-28.05	1.75 [1.03 - 2.96]	
Q3 28.05-35.20	1.52 [0.90 - 2.54]	
Q4 > 35.2	ref	

Models consist of unconditional logistic regressions adjusted for matching variables: center, sex of the child, maternal age, gestational age at sampling, maternal BMI. Ref, reference.



address this question would be provided by determining the source of maternal DLK1 during pregnancy. Circulating DLK1 levels are very low in non-pregnant women and substantially increase during pregnancy (20, 24, 28). Maternal DLK1 levels have been reported to be significantly higher in twin pregnancies than normal singleton pregnancies after 17 WG (29). Overall, these data suggest that maternal DLK1 measured during the 2nd and 3rd trimester originate from the fetus or the placenta. Cleaton et al. hypothesized that the source of maternal circulating DLK1 is the fetus, and not the placenta, based on data from murine models with conditional deletion of *Dlk1* (20). However, more recent data from humans have shown that DLK1 is present in the extra-embryonic tissue as early as 5 WG and remains detectable until birth (18, 30). Other studies have reported that placental expression of DLK1 is associated with fetal growth. One study reported a two-fold increase in the placental expression of DLK1 in large for gestational age newborns (birth weight > 90th percentile) (31) and another reported significantly lower DLK1 expression in the placentas of mothers who gave birth to SGA than those who gave birth to AGA infants (32). MacDonald et al. showed a positive correlation between maternal circulating DLK1 levels and placental weight and that DLK1 is secreted by the human placenta in *in-vitro* studies (24). Overall, these data at least partially support a placental origin of maternal circulating DLK1 in humans.

## Circulating DLK1 Levels at 26 WG Are Associated With SGA Independently of Signs of Placental Vascular Dysfunction

Data in the literature are contradictory on the association between maternal circulating DLK1 levels and placental vascular dysfunction. Cleaton et al. reported highly reduced DLK1 levels only in cases of SGA with placental vascular dysfunction, but no significant difference in maternal circulating DLK1 levels between SGA due to other causes and controls. MacDonald et al. found no relationship between circulating DLK1 levels and ultrasound measures of placental vascular dysfunction in a cohort of 63 women at 36 WG. Unlike Cleaton et al., we did not observe a significant difference in DLK1 levels between SGA with placental vascular dysfunction and SGA due to other causes in our cohort, in which 32.6% of SGA cases showed signs of placental vascular dysfunction. But we confirmed the results of MacDonald et al. in a larger cohort. However, the definition of SGA with placental vascular dysfunction is not consensual and differs widely depending on the study. In the study of Cleaton et al., SGA with placental vascular dysfunction was defined as SGA with high-resistance uterine artery flow, high-resistance umbilical artery flow, or low abdominal circumference growth velocity. Fifty-three percent of SGA cases were defined as SGA with placental vascular dysfunction in the study of Cleaton et al. In contrast, McDonald et al. reported only 6.3% of SGA with placental vascular dysfunction, defined as a low cerebroplacental ratio.

Regardless of birth weight, the association between DLK1 levels and placental vascular dysfunction has been documented by several studies. In a study that included 102 pregnant women, the median DLK1 serum concentration during pregnancy was significantly lower for women with preeclampsia than healthy pregnant women, even after adjustment for gestational age at blood sampling and birth weight (30). Schrey et al. reported lower placental expression of DLK1, primarily in the endothelium and cytotrophoblast, following immunohistochemistry of 40 placental biopsies of healthy pregnant women and speculated that aberrant cytotrophoblast development and endothelial dysfunction in preeclampsia may contribute to reduced placental expression of DLK1 in SGA fetuses.

## DLK1 as a Predictive Biomarker of SGA?

Using the combination of ultrasound data with a blood test that indicates placental dysfunction is a promising approach for the prediction of SGA (1). The measurements in maternal blood of various proteins or hormones produced by the placenta which are modified in the case of placental vascular dysfunction (pregnancy-associated plasma protein A - PAPP-A, soluble fms-like tyrosine kinase-1 -, sFLT1, placental growth factor - PIGF ...) have been tested to identify women at risk of this adverse pregnancy outcome leading to FGR, stillbirth, and preeclampsia. But to date, none is used in clinical practice to predict the risk of SGA with or without FGR (1).

In our study, DLK1 level cannot be considered as a biomarker of SGA, as previously reported by Cleaton et al. and McDonald et al. (20, 24). DLK1 level is less predictive of SGA than

ultrasound alone, and DLK1 level does not add much to the predictive value of ultrasound model alone.

The accuracy of detecting SGA for each woman could be enhanced by using ultrasound and following individual trends in the level of DLK1 during pregnancy. Indeed, we have observed a perfect exponential increase in the level of DLK1 when measured each four weeks during pregnancy in a woman who gave birth to an AGA child (unpublished data), offering promising perspectives.

## Strengths and Limitations

Our study is based on a well-characterized prospective cohort, which allowed us to measure maternal circulating DLK1 levels in a large sample of 193 cases if SGA and 370 matched controls. Maternal levels of DLK1 remained lower in women who delivered SGA than controls when considering the two centers of inclusion separately, showing that our results are robust. We found no association between maternal DLK1 level and placental vascular dysfunction for SGA children. This may have been due to the limited number of subjects with placental vascular dysfunction and the resulting lack of power. Nonetheless, the DLK1 levels for these subjects were very close to those of SGA due to other causes, making this hypothesis unlikely. Also, due to the design of the EDEN cohort and the information collected, data about the placental histopathology were not available.

## CONCLUSION

DLK1 levels at 26 WG are associated with SGA at birth, independently of signs of placental vascular dysfunction. However, DLK1 alone cannot predict the risk of SGA.

## Q21 DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Q23 ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics committee of the Kremlin Bicêtre Hospital (France). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## REFERENCES

- Gaccioli F, Aye ILMH, Sovio U, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Screening for Fetal Growth Restriction Using Fetal Biometry Combined With Maternal Biomarkers. *Am J Obstet Gynecol* (2018) 218(2S):S725–37. doi: 10.1016/j.ajog.2017.12.002
- Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega ACS, Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board. International Small for Gestational Age Advisory Board Consensus Development Conference Statement: Management of Short Children Born Small for Gestational Age, April 24–

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, BH, AF, LP, YB, DM, and IN contributed to the conception and design of this study. AP, BH, AF, LP, YB, EG, FB, M-LS, DM, and IN contributed to acquisition of the data or its analysis and interpretation. AP, BH, AF, LP, YB, EG, FB, M-LS, DM, and IN contributed to drafting the article or critically revising it for important intellectual content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

The EDEN study was supported by Foundation for Medical Research (FRM), National Agency for Research (ANR), National Institute for Research in Public Health (IRESP: TGIR cohorte santé 2008 program), French Ministry of Health (DGS), French Ministry of Research, INSERM Bone and Joint Diseases National Research (PRO-A), and Human Nutrition National Research Programs, Paris-Sud University, Nestlé, the French National Institute for Population Health Surveillance (InVS), the French National Institute for Health Education (INPES), European Union FP7 programs (FP7/2007–2013, HELIX, ESCAPE, ENRIECO, Medall projects), the Diabetes National Research Program [through a collaboration with the French Association of Diabetic Patients (AFD)], the French Agency for Environmental Health Safety (now ANSES), the complementary health insurance Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale (MGEN), the French national agency for food security, and the French-speaking association for the study of diabetes and metabolism (ALFEDIAM). This work was supported by a grant (Grant for Growth Innovation, GGI) from Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the EDEN mother-child cohort study group, whose members are I. Annesi-Maesano, J.Y. Bernard, M.A. Charles, P. Dargent-Molina, B. de Lauzon-Guillain, P. Ducimetière, M. de Agostini, B. Foliguet, AF, X. Fritel, A. Germa, V. Goua, R. Hankard, B. Heude, M. Kaminski, B. Larroquey, N. Lelong, J. Lepeule, G. Magnin, L. Marchand, C. Nabet, F Pierre, R. Slama, M.J. Saurel-Cubizolles, M. Schweitzer, and O. Thiebaugeorges.

- October 1, 2001. *Pediatrics* (2003) 111(6 Pt 1):1253–61. juin. doi: 10.1542/peds.111.6.1253
- Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the Child Born Small for Gestational Age Through to Adulthood: A Consensus Statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* (2007) 92(3):804–10. doi: 10.1210/jc.2006-2017
  - Monier I, Blondel B, Ego A, Kaminiski M, Goffinet F, Zeitlin J. Poor Effectiveness of Antenatal Detection of Fetal Growth Restriction and Consequences for Obstetric Management and Neonatal Outcomes: A

- French National Study. *BJOG* (2015) 122(4):518–27. doi: 10.1111/1471-0528.13148
5. Newsome CA, Shiell AW, Fall CHD, Phillips DIW, Shier R, Law CM. Is Birth Weight Related to Later Glucose and Insulin Metabolism?—a Systematic Review. *Diabetes Med* (2003) 20(5):339–48. doi: 10.1046/j.1464-5491.2003.00871.x
6. Castanys-Muñoz E, Kennedy K, Castañeda-Gutiérrez E, Forsyth S, Godfrey KM, Koletzko B, et al. Systematic Review Indicates Postnatal Growth in Term Infants Born Small-for-Gestational-Age Being Associated With Later Neurocognitive and Metabolic Outcomes. *Acta Paediatr* (2017) 106(8):1230–8. doi: 10.1111/apa.13868
7. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in Infancy and Death From Ischaemic Heart Disease. *Lancet* (1989) 2(8663):577–80. doi: 10.1016/S0140-6736(89)90710-1
8. Gardosi J, Madurasinghe V, Williams M, Malik A, Francis A. Maternal and Fetal Risk Factors for Stillbirth: Population Based Study. *BMJ* (2013) 346:f108. doi: 10.1136/bmj.f108
9. Andreasen LA, Tabor A, Nørgaard LN, Rode L, Gerds TA, Tolsgaard MG. Detection of Growth-Restricted Fetuses During Pregnancy is Associated With Fewer Intrauterine Deaths But Increased Adverse Childhood Outcomes: An Observational Study. *BJOG* (2021) 128(1):77–85. doi: 10.1111/1471-0528.16380
10. Giabicani E, Pham A, Brioude F, Mitanchez D, Netchine I. Diagnosis and Management of Postnatal Fetal Growth Restriction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2018) 32(4):523–34. doi: 10.1016/j.beem.2018.03.013
11. Chisholm KM, Folkins AK. Placental and Clinical Characteristics of Term Small-for-Gestational-Age Neonates: A Case-Control Study. *Pediatr Dev Pathol* (2016) 19(1):37–46. doi: 10.2350/15-04-1621-OA.1
12. Ganer Herman H, Barber E, Gasnier R, Gindes L, Bar J, Schreiber L, et al. Placental Pathology and Neonatal Outcome in Small for Gestational Age Pregnancies With and Without Abnormal Umbilical Artery Doppler Flow. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2018) 222:52–6. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.01.009
13. Lees CC, Stampalija T, Baschat AA, da Silva Costa F, Ferrazzi E, Figueras F, et al. ISUOG Practice Guidelines: Diagnosis and Management of Small-for-Gestational-Age Fetus and Fetal Growth Restriction. *Ultrasound Obstetrics Gynecol* (2020) 56(2):298–312. doi: 10.1002/uog.22134
14. Figueras F, Caradeux J, Crispi F, Eixarch E, Peguero A, Gratacos E. Diagnosis and Surveillance of Late-Onset Fetal Growth Restriction. *Am J Obstetrics Gynecol* (2018) 218(2, Supplement):S790–S802.e1. doi: 10.1016/j.ajog.2017.12.003
15. Durrmeyer X, Kayem G, Sinico M, Dassieu G, Danan C, Decobert F. Perinatal Risk Factors for Bronchopulmonary Dysplasia in Extremely Low Gestational Age Infants: A Pregnancy Disorder-Based Approach. *J Pediatr* (2012) 160(4):578–583.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.09.025
16. Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, Papageorgiou A, Baschat AA, Baker PN, et al. Consensus Definition of Fetal Growth Restriction: A Delphi Procedure. *Ultrasound Obstetrics Gynecol* (2016) 48(3):333–9. doi: 10.1002/uog.15884
17. Grangé G. [Screening and Diagnosis of Small for Gestational Age Fetuses]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* (2013) 42(8):921–8.
18. Traustadóttir GÁ, Lagoni LV, Ankerstjerne LBS, Bisgaard HC, Jensen CH, Andersen DC. The Imprinted Gene Delta Like non-Canonical Notch Ligand 1 (Dlk1) is Conserved in Mammals, and Serves a Growth Modulatory Role During Tissue Development and Regeneration Through Notch Dependent and Independent Mechanisms. *Cytokine Growth Factor Rev* (2019) 46:17–27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.03.006
19. Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal Uniparental Disomy for Chromosome 14. *J Med Genet* (1991) 28(8):511–4. doi: 10.1136/jmg.28.8.511
20. Cleaton MAM, Dent CL, Howard M, Corish JA, Gutteridge I, Sovio U, et al. Fetus-Derived DLK1 is Required for Maternal Metabolic Adaptations to Pregnancy and is Associated With Fetal Growth Restriction. *Nat Genet* (2016) 48(12):1473–80. doi: 10.1038/ng.3699
21. Hudak CS, Sul HS. Pref-1, a Gatekeeper of Adipogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2013) 4:79. doi: 10.3389/fendo.2013.00079
22. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim K-H, Yun EJ, et al. Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1/Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Mol Cell Biol* (2002) 22(15):5585–92. doi: 10.1128/MCB.22.15.5585-5592.2002
23. Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, Ramos CO, Montenegro LR, Canton A, et al. DLK1 is a Novel Link Between Reproduction and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* (2019) 104(6):2112–20. doi: 10.1210/je.2018-02010
24. MacDonald TM, Walker SP, Hiscock R, Cannon P, Harper A, Murray E, et al. Circulating Delta-Like Homolog 1 (DLK1) at 36 Weeks is Correlated With Birthweight and is of Placental Origin. *Placenta* (2020) 91:24–30. doi: 10.1016/j.placenta.2020.01.003
25. Heude B, Forhan A, Slama R, Douhaud L, Bedel S, Saurel-Cubizolles M-J, et al. Cohort Profile: The EDEN Mother-Child Cohort on the Prenatal and Early Postnatal Determinants of Child Health and Development. *Int J Epidemiol* (2016) 45(2):353–63. doi: 10.1093/ije/dyv151
26. Gardosi J. Customized Fetal Growth Standards: Rationale and Clinical Application. *Semin Perinatol* (2004) 28(1):33–40. doi: 10.1053/j.semperi.2003.12.002
27. Miller J, Turan S, Baschat AA. Fetal Growth Restriction. *Semin Perinatol* (2008) 32(4):274–80. doi: 10.1053/j.semperi.2008.04.010
28. de Zegher F, Diaz M, Sebastiani G, Martín-Ancel A, Sánchez-Infantes D, López-Bermejo A, et al. Abundance of Circulating Preadipocyte Factor 1 in Early Life. *Diabetes Care* (2012) 35(4):848–9. doi: 10.2337/dc11-1990
29. Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, Westergaard JG, et al. Does Fetal Antigen 1 (FA1) Identify Cells With Regenerative, Endocrine and Neuroendocrine Potentials? A Study of FA1 in Embryonic, Fetal, and Placental Tissue and in Maternal Circulation. *Differentiation* (2000) 66(1):49–59. doi: 10.1046/j.1432-0436.2000.066001049.x
30. Schrey S, Wurst U, Ebert T, Kralisch S, Drewlo S, Stepan H, et al. The Adipokine Preadipocyte Factor-1 is Downregulated in Preeclampsia and Expressed in Placenta. *Cytokine* (2015) 75(2):338–43. doi: 10.1016/j.cyto.2015.07.021
31. Kappil MA, Green BB, Armstrong DA, Sharp AJ, Lambertini L, Marsit CJ, et al. Placental Expression Profile of Imprinted Genes Impacts Birth Weight. *Epigenetics* (2015) 10(9):842–9. doi: 10.1080/15592294.2015.1073881
32. Diaz M, Bassols J, Aragonés G, Mazarico E, López-Bermejo A, Ibáñez L. Decreased Placental Expression of Pre-Adipocyte Factor-1 in Children Born Small-for-Gestational-Age: Association to Early Postnatal Weight Gain. *Placenta* (2013) 34(4):331–4. doi: 10.1016/j.placenta.2013.01.011

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. Q25

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Pham, Mitanchez, Forhan, Perin, Le Bouc, Brioude, Sobrier, Heude and Netchine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

#### IV. Conclusions et perspectives

Nous avons observé une diminution significative des concentrations sériques de DLK1 à 26 SA dans le sang des mères ayant donné naissance à des nouveau-nés PAG. Nos données viennent confirmer les données de Cleaton *et al.* et McDonald *et al.*, au sein d'une cohorte plus importante, et à un terme plus précoce, ce qui peut avoir un impact sur la prise en charge de ces gestations. Comme McDonald *et al.*, nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les concentrations sériques de DLK1 en cas de nouveau-né PAG avec ou sans signe d'insuffisance vasculaire placentaire.

Bien que significativement diminuées dans le sérum des mères ayant donné naissance à des nouveau-nés PAG, les concentrations sériques de DLK1 ne présentent pas une sensibilité et une spécificité suffisantes pour le dépistage des fœtus PAG. Cela ne permet pas de considérer DLK1 comme un biomarqueur de la croissance fœtale et son utilisation dans la pratique clinique. La mesure des concentrations sanguines maternelles de DLK1 à 26 SA couplée au dépistage échographique actuellement recommandé augmente très modérément la sensibilité du dépistage des fœtus PAG. Enfin, l'évolution parfaitement polynomiale ( $R^2=0.98$ ) des concentrations sériques de DLK1 chez une femme enceinte à titre individuelle (Fig.28) laisse penser que la mesure des concentrations de DLK1 circulant dans le sang maternel à intervalles réguliers pendant la gestation, pourrait refléter la croissance intra-utérine et permettre selon l'évolution de la courbe individuelle de dépister les fœtus avec RCIU.

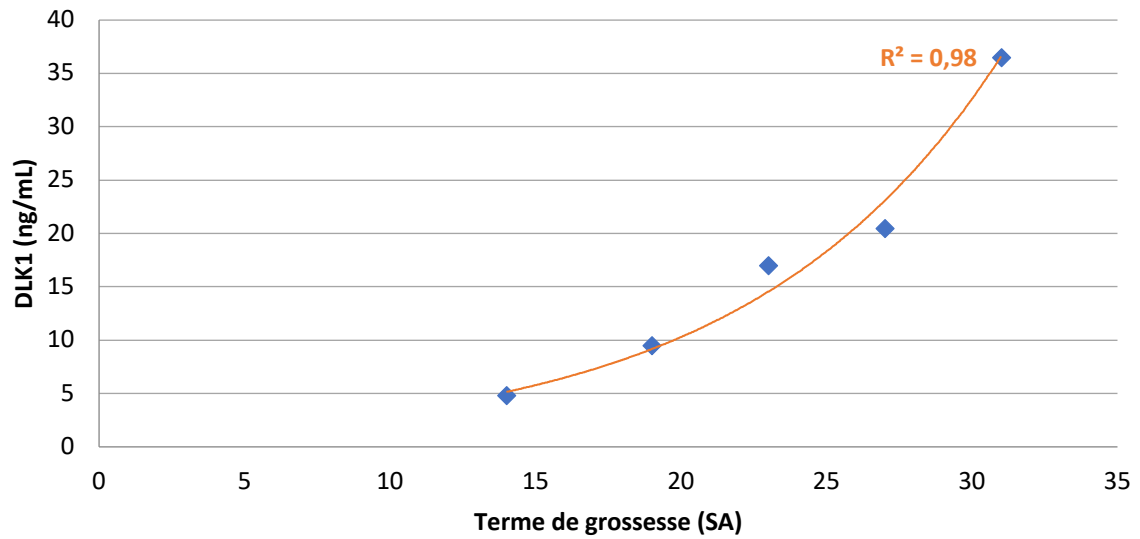


Figure 28 : Évolution des concentrations de DLK1 circulant chez une femme au cours de la gestation entre 14 et 31 SA. Les prélèvements ont été réalisés chez une volontaire ayant donné son consentement, dans le cadre du dépistage mensuel de l'infection à *Toxoplasma gondii*.

**APPROCHE TRANSLATIONNELLE, DEUXIEME PARTIE :**

***DLK1* : un gène candidat de retard de croissance intra-utérin ?**

## I. Contexte clinique et scientifique

Comme exposé dans la partie ‘État des connaissances’, les modèles murins d’invalidation de *Dlk1* suggèrent un rôle de *Dlk1* dans la croissance fœtale (Moon et al., 2002). En effet, les souriceaux *Dlk1*<sup>-/-</sup> ou avec invalidation de l’allèle paternel présentent un RCIU (Moon et al., 2002). En revanche, aucune mutation de *DLKI* n’a été identifiée à l’heure actuelle en pathologie humaine chez des patients présentant un RCIU. Des remaniements (~délétion de 14-kb et duplication de 269bp) et des mutations de *DLKI* (p.Gly199Alafs\*11, p.Val271Cysfs\*14, and p.Pro160Leufs\*50) ont été identifiées chez des patients présentant une puberté précoce non syndromique (Dauber et al., 2017; Gomes et al., 2019; Montenegro et al., 2020). Les données concernant les biométries de naissance ne sont documentées que pour un certain nombre de ces patients, parmi ceux-ci, aucun n’était PAG.

Afin de documenter le rôle de *DLKI* dans la croissance fœtale, nous avons recherché des mutations de ce gène au sein d’une cohorte de patients présentant un RCIU. Du fait de la révolution biotechnologique apportée ces dernières années par le séquençage haut débit, nous avons décidé d’intégrer *DLKI* dans un séquençage de panel de gènes dont les mutations sont responsables de RCIU (gènes dits « de diagnostic ») ou dont les modèles murins d’invalidation ou l’étude des voies de signalisation *in vitro* sont en faveur d’un rôle de ces gènes dans la croissance fœtale (gènes dits « de recherche »).

Les technologies de séquençage haut débit permettent actuellement d’améliorer le rendement diagnostique par le séquençage simultané d’un grand nombre de gènes. La mise au point de la première méthode de séquençage de l’ADN basée sur une polymérase et des nucléotides radioactifs par Frederick Sanger en 1977 a permis de réaliser le premier séquençage du génome humain au cours du « Human Genom Project » en 13 ans et avec un coût de 13 milliards de dollars (Istrail et al., 2004). Bien que le séquençage Sanger soit encore utilisé en pratique courante médicale, les progrès technologiques et la mise au point de techniques de séquençage



à haut débit permettent aujourd'hui de séquencer le génome humain en quelques heures. Le séquençage ciblé de gènes lors de recherches diagnostiques étiologiques et l'approche 'gène candidat' laissent désormais souvent la place à des techniques de séquençage simultané de plusieurs gènes (panel), d'exome entier (WES ou « whole exome sequencing ») ou de génome entier (WGS ou « whole genome sequencing »). Ces approches possèdent plusieurs avantages. En pratique diagnostique, le séquençage haut débit permet de séquencer dans un même temps des dizaines ou des centaines de gènes dont des mutations peuvent être à l'origine des manifestations présentées par un patient, et présente donc comme avantage un gain de temps majeur comparativement à une approche de séquençage Sanger gène après gène. Le WES permet également de rechercher très rapidement des mutations de gènes sans orientation préalable du diagnostic (Meienberg et al., 2016). Le principal inconvénient de cette technique est la gestion des données secondaires liées à l'identification de variants dans des gènes non liés avec la symptomatologie ayant fait l'objet de la recherche étiologique (à titre d'exemple, identification d'un variant pathogène de *BRCA2*, gène de prédisposition à certaines tumeurs, chez un patient dont l'exome a été séquençé pour la recherche d'une cause moléculaire d'un retard de croissance) (Saudi Mendeliome Group, 2015).

Cette partie de mon travail expérimental comprend deux volets. Le premier volet a fait l'objet de la mise en place du séquençage haut débit d'un panel de gènes associés au RCIU, à la fois à visée de diagnostic et de recherche. Nous avons fait le choix de développer un séquençage de panel de gènes et non pas un séquençage d'exome afin de faciliter la gestion des données secondaires. A l'issu d'un travail de recherche bibliographique, nous avons déterminé un panel de gènes d'intérêt pouvant être impliqués dans des anomalies de la croissance foetale. Le deuxième volet a consisté à utiliser le séquençage de ce panel de gènes dans une cohorte de patients présentant un SRS. En effet, le laboratoire d'accueil possédant une cohorte de plusieurs centaines de patients adressés pour une suspicion de SRS avec RCIU et sans diagnostic

moléculaire identifié (pas d'anomalie de méthylation en 11p15 ou 14q32, pas de disomie uniparentale du chromosome 7 et pas de mutation d'*IGF2*), nous avons réalisé le séquençage de ce panel de gènes, dont le gène *DLK1*, chez 132 patients issus de cette cohorte. Dans ce travail, nous ne développerons que les analyses concernant le gène *DLK1*.

L'analyse du séquençage de ce panel de gènes chez ces 132 patients n'a pas permis d'identifier de variation pathogène au sein de *DLK1*. Cette analyse a fait l'objet de la publication '**Screening for *DLK1* mutations in small for gestational age patients scoring for Silver-Russell syndrome. Pham A. et al.**' dans le journal '*European Journal of Human Genetics*'.

La mise en route de ce séquençage de panel de gènes au sein du laboratoire a fait l'objet de discussions avec nos partenaires du réseau européen COST (coopération européenne en sciences et technologies) afin de définir, de façon consensuelle, une liste de gènes à séquencer dans le cadre d'un RCIU avec suspicion de SRS sans anomalie de méthylation. Ces discussions ont abouti à la rédaction de l'article '**Genes to be evaluated when using NGS (next generation sequencing) based technologies in Silver-Russell syndrome and its differential diagnoses: a joint strategy. Pham A. et al.**' qui sera soumis dans les prochaines semaines, après relecture et validation de tous les auteurs du réseau COST.

**II. Article original publié dans le journal ‘*European Journal of Human Genetics*’:  
Screening for *DLK1* mutations in patients born small for gestational age with Silver-  
Russell syndrome phenotype.**

Aurélie PHAM, Marie-Laure SOBRIER, Eloïse GIABICANI, Cristina DAS NEVES,  
Marilyne LE JULES FERNANDES, Delphine MITANCHEZ, Frédéric BRIOUDE, Irène  
NETCHINE.

## ARTICLE



# Screening of patients born small for gestational age with the Silver-Russell syndrome phenotype for *DLK1* variants

Aurélien Pham<sup>1</sup>, Marie-Laure Sobrier<sup>2</sup>, Eloïse Giabicani<sup>3</sup>, Marilyne Le Jules Fernandes<sup>4</sup>, Delphine Mitanchez<sup>2</sup>, Frédéric Brioude<sup>3</sup> and Irène Netchine<sup>3</sup>✉

© The Author(s), under exclusive licence to European Society of Human Genetics 2021

Silver–Russell syndrome (SRS) is a rare imprinting disorder associated with prenatal and postnatal growth retardation. Loss of methylation (LOM) on chromosome 11p15 is observed in 40 to 60% of patients and maternal uniparental disomy (mUPD) for chromosome 7 (upd(7)mat) in ~5 to 10%. Patients with LOM or mUPD 14q32 can present clinically as SRS. *Delta like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1)* is one of the imprinted genes expressed from chromosome 14q32. *Dlk1*-null mice display fetal growth restriction (FGR) but no genetic defects of *DLK1* have been described in human patients born small for gestational age (SGA). We screened a cohort of SGA patients with a SRS phenotype for *DLK1* variants using a next-generation sequencing (NGS) approach to search for new molecular defects responsible for SRS. Patients born SGA with a clinical suspicion of SRS and normal methylation by molecular testing at the 11p15 or 14q32 loci and upd(7)mat were screened for *DLK1* variants using targeted NGS. Among 132 patients, only two rare variants of *DLK1* were identified (NM\_003836.6:c.103 G > C (p.(Gly35Arg)) and NM\_003836.6: c.194 A > G p.(His65Arg)). Both variants were inherited from the mother of the patients, which does not favor a role in pathogenicity, as the mono-allelic expression of *DLK1* is from the paternal-inherited allele. We did not identify any pathogenic variants in *DLK1* in a large cohort of SGA patients with a SRS phenotype. *DLK1* variants are not a common cause of SGA.

*European Journal of Human Genetics*; <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00927-5>

## INTRODUCTION

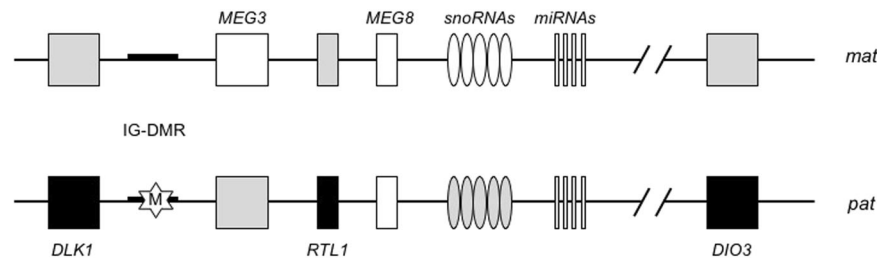
Fetal growth restriction (FGR), defined as the failure of the fetus to reach its genetically determined growth potential, is one of the most common causes of perinatal mortality and morbidity [1]. It results from multiple causes, such as genetic and epigenetic alterations, the environment, hormonal dysregulation, or placental vascular dysfunction. More than 150 genetic disorders have been associated with FGR [2].

Silver–Russell syndrome (SRS, OMIM #180860) is a rare but well known imprinting disorder [3]. Clinical diagnosis of SRS is considered if a patient shows at least four of the six criteria of the Netchine–Harbison clinical scoring system (NH-CSS) [3, 4], which includes pre- and postnatal growth retardation, relative macrocephaly at birth, body asymmetry, protruding forehead, and early feeding difficulties. An underlying molecular cause is identified in ~60% of patients with SRS [3, 5]. Among them, loss of methylation (LOM) at *H19/IGF2*:IG-DMR (also called ICR1) on chromosome 11p15 (11p15 LOM) is observed in 40 to 60% and maternal uniparental disomy (mUPD) for chromosome 7 (upd(7)mat) in ~5 to 10% [3, 5–7]. The recent international consensus of SRS recommends additional molecular testing in cases of normal methylation on chromosomes 11 and 7, including screening of *cyclin D kinase inhibitor 1c (CDKN1C)* and *insulin-like growth factor 2 (IGF2)* genes [8, 9]. Since the first consensus on SRS, new

molecular defects have been identified in *high mobility group AT-hook 2 (HMGA2)* and *pleiomorphic adenoma gene 1 (PLAG1)* in patients with a clinical presentation of SRS [10, 11]. The recent use of next-generation sequencing (NGS) for SRS patients has improved the molecular diagnosis [12–16], but more than 30% of patients with SRS remain without an identified molecular cause.

Temple Syndrome (TS) is another rare cause of prenatal and postnatal growth restriction caused by disruption of the 14q32 imprinted region. In this region, *MEG3/DLK1*:IG-DMR is normally methylated on the paternal allele [17], resulting in *Delta like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1)*, *retrotransposon Gag like 1 (RTL1)*, and *Iodothyronine Deiodinase 3 (DIO3)* expression from the paternal allele [18]. In contrast, long noncoding RNAs (*maternally expressed 3 (MEG3)* and *maternally expressed 8 (MEG8)*), microRNAs, and small nucleolar RNAs are expressed by the unmethylated maternal allele (Fig. 1). mUPD of chromosome 14 (upd(14)mat), hypomethylation of *MEG3/DLK1*:IG-DMR, and paternal deletion of this region all lead to the phenotype of TS. Clinical overlap between SRS and TS has been described and Geoffron et al. reported 73% of patients with 14q32 disruption scoring positively for SRS, with a NHCS  $\geq 4/6$  [19–22]. According to Geoffron et al., 14q32 disruption may be considered to be an alternative molecular cause of SRS and *MEG3/DLK1*:IG-DMR methylation

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint Antoine, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, service de néonatalogie, Paris, France. <sup>2</sup>Sorbonne Université, INSERM UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, France. <sup>3</sup>Sorbonne Université, INSERM UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, Paris, France. <sup>4</sup>APHP, Hôpital Armand Trousseau, Laboratoire de Biologie Moléculaire Endocrinienne, Paris, France. ✉email: irene.netchine@aphp.fr



**Fig. 1 Schematic representation of the imprinted domain of the 14q32 region.** The black line “IG-DMR” indicates the differentially methylated region (the imprinting control center of 14q32, named IG-DMR methylated on the paternal allele). The star represents methylated DMR. Black boxes indicate genes expressed from the paternal (pat) allele (*DLK1*, *RTL1*, and *DIO3*). White boxes indicate genes expressed from the maternal (mat) allele (the non-coding genes *MEG3* and *MEG8*, and a cluster of snoRNAs and miRNAs).

should be tested in cases of negative results for other molecular testing of SRS patients [3].

*DLK1* is widely expressed during fetal development. It encodes a transmembrane glycoprotein with six epidermal growth factor (EGF)-like motifs in its extracellular domain, a juxtamembrane region with a TACE-mediated cleavage site, a single transmembrane domain, and a short cytoplasmic tail [18]. The exact function of *DLK1* is uncertain but it is involved in adipogenesis and appears to play an important role in preserving the pool of various progenitor cells until they differentiate [18]. With the generation of *Dlk1*-knockout mice, Moon et al. demonstrated overlapping phenotypes between *Dlk1*-null mice and human upd(14)mat, including growth retardation. They hypothesized that loss of *Dlk1* expression may be responsible for most of the symptoms observed in human upd(14)mat [23]. Paternally inherited *DLK1* variants have been recently identified in patients with central precocious puberty (CPP) but no growth retardation [24, 25]. Genetic defects of *DLK1* have never been described in patients with FGR.

We screened *DLK1* variants in a cohort of patients born SGA with a SRS phenotype using a NGS approach to search for new molecular defects responsible for SRS and assess the role of *DLK1* in fetal growth.

## METHODS

### Population studied

Patients included were referred to our molecular laboratory because they were born SGA (birth length and/or weight with a standard deviation score (SDS) < -2 [26]) with a clinical suspicion of SRS. Patients born SGA with a NH-CSS  $\geq 4/6$  or a NH-CSS = 3/6 with a strong clinical suspicion of SRS (relative macrocephaly and/or protruding forehead), negative molecular testing for *H19/IGF2:IG-DMR* (11p15.5) and *DLK1/MEG3:IG-DMR* (14q32.2) LOM and upd(7)mat, and negative molecular testing for *CDKN1C*, *IGF2*, *HMG2*, and *PLAG1* variants were included in this study. Written informed consent for participation was received from all patients or parents, in accordance with national ethics rules (Assistance Publique–Hôpitaux de Paris authorization no. 681). Patients were either followed at Armand Trousseau Children’s Hospital or referred by other clinical centers for molecular analysis. Postnatal growth parameters are expressed as SDS according to charts by Sempé and Pedron [27]. Blood samples were collected during routine biological follow-up at clinical visits. DNA was extracted in our laboratory from peripheral blood samples using an in-house protocol after cell lysis by a salting-out procedure, as previously described [28, 29].

### Next-generation sequencing

*DLK1* was sequenced as a SRS candidate gene using targeted sequencing. Library preparation, gene enrichment, sequencing, and data analysis were performed by IntegraGen SA (Evry, France) or by our laboratory with a pipeline designed by SOPHiA GENETICS (Lausanne, Switzerland).

### Sanger sequencing

Variations of *DLK1* identified through NGS were verified for the probands and their parents by Sanger sequencing using the ABI PRISM Big Dye

Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit and an ABI 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, Courtaboeuf, France).

### In silico analysis

The allele frequency was checked in the GnomAD database (online <https://gnomad.broadinstitute.org/>) to predict the functional consequences of any identified *DLK1* variants. Interspecies alignment of *DLK1* was performed using Clustal Omega (online tool from The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and damage prediction scores were obtained using the PolyPhen-2 bioinformatic tool [30]. Variants were also classified as benign or likely benign, pathogenic or likely pathogenic, or of uncertain significance following the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) classification of variants [31]. Six main categories are evaluated according to these guidelines: population data (prevalence of the variant in control populations), computational in silico predictive data, functional characterization, segregation, de novo data, and allelic data.

### Statistical analysis

Characteristics of the population are described as percentages for qualitative variables or as the SDS and mean (range) for quantitative variables.

## RESULTS

### Clinical characteristics of patients screened for *DLK1* variants

Samples from 132 patients referred for molecular genetic testing for SRS and without disturbances of 11p15 and 14q32 methylation or upd(7)mat were analyzed using a targeted NGS-based approach (93 by Integrigen and 39 using the pipeline of SOPHiA GENETICS). Clinical data for at least four NH-CSS criteria were available for all patients and was complete (all six criteria available) for 61 (46%). All patients were born SGA. Patient characteristics are presented in Tables 1 and 2.

### Screening for *DLK1* variants

Among the 132 patients born SGA with a clinical suspicion of SRS, only two rare heterozygous variants of *DLK1* were identified in two independent patients (NM\_003836.6:c.103 G > C, p.(Gly35Arg) and NM\_003836.6: c.194 A > G, p.(His65Arg)).

### Phenotype of patients with identified *DLK1* variants

Patient 1 was the third female child of two non-consanguineous parents. The proband’s parents were healthy. The final height of the father was 176 cm (0.2 SDS) and that of the mother 152 cm (-2.0 SDS). Proband’s mother was not born SGA and had no clinical features of SRS. The proband’s sisters were healthy, without prenatal or postnatal growth restriction. Patient 1 was born at 36 + 2 weeks of amenorrhea (WA). Her birth weight was 1930 g (-1.9 SDS), birth length 41 cm (-3.6 SDS), and head circumference 31 cm (-1.6 SDS). She did not experience catch up growth, with a height of 98.5 cm (-3.3 SDS), weight of 13.5 kg (-3.4 SDS), and head circumference of 49 cm (-1.5 SDS) at 6 years

**Table 1.** Anthropometric data at birth for patients included in the analysis.

	<i>n</i>	Mean	(Min-Max)	< -2 SDS (%)
Gestational age at birth (weeks)	133	37	(26–42)	
Weight (g)	130	1874	(530–3170)	
Weight (SDS)		-2.6	(-6.0 to 1.8)	89 (68%)
Length (cm)	125	40.9	(30–48)	
Length (SDS)		-3.7	(-8.6 to -1.2)	118 (94%)
Head circumference (cm)	126	30.7	(21–38)	
Head circumference (SDS)		-1.8	(-5.2 to 1.8)	48 (38%)

SDS standard deviation score.

**Table 2.** Clinical features and NH-CSS for patients included in the analysis.

	<i>n</i> (%)
SGA (BW and/or BL ≤ -2SDS for gestational age)	132/132 (100%)
Relative macrocephaly at birth	93/128 (73.0%)
Postnatal growth failure	95/105 (90.0%)
Feeding difficulties and/or low BMI	113/128 (88.0%)
Protruding forehead	54/74 (73.0%)
Body asymmetry	7/127 (5.5%)
NH-CSS = 3	60 (45.5%)
NH-CSS = 4	48 (36.4%)
NH-CSS = 5	22 (16.6%)
NH-CSS = 6	2 (1.5%)

SGA small for gestational age, BW birth weight, BL birth length, SDS standard deviation score, BMI body mass index, NH-CSS Netchine–Harbison clinical scoring system.

of age. She had no other remarkable features. She was not treated by growth-hormone (GH) therapy. She had feeding difficulties and a protruding forehead and fulfilled five of the six criteria of the NH-CSS. NGS sequencing of *DLK1* revealed the heterozygous NM\_003836.6: c.103 G > C variant located in exon 2, predicting an amino acid substitution at codon 35 (p.(Gly35Arg)). Gly35 is located within the first EGF-like motif in the extracellular domain of *DLK1*. This variant was inherited from her healthy mother, who carried the same heterozygous variant (Fig. 2).

Patient 2 was the first female child of two non-consanguineous parents. The mother's final height was 169 cm (1.0 SDS). The proband's father was born SGA at 35 WA (birth weight and height were 1290 g (-3.4 SDS) and 38 cm (-4.7 SDS)), but his head circumference at birth was unknown and we do not know if he had protruding forehead between 1 and 3 years. The proband's father had no feeding difficulties during childhood and initially experienced catch-up growth with a height at -1 SDS between 10 and 14 years of age, but his final height was only 163 cm (-2.0 SDS). He was not treated with GH therapy. NH-CSS of proband's father was 1/4. Patient 2 was a 29 WA-preterm girl with a birth weight of 920 g (-1.9 SDS), birth length of 34 cm (-3.0 SDS), and head circumference of 25 cm (-1.2 SDS). SGA was diagnosed in the second trimester of gestation. She did not develop feeding difficulties but had a protruding forehead. By 16 months of age, she had not experienced catch-up growth, with a height of 68.5 cm (-3.0 SDS) and a head circumference of 44.5 cm (-1.0 SDS). She was suspected

of having SRS, with a NH-CSS = 4/6 and fifth finger clinodactyly. At 5 years of age, she experienced premature adrenarche without precocious puberty, responsible for catch-up growth, with a height of 105.4 cm (-0.8 SDS). NGS sequencing of *DLK1* revealed that she carried a heterozygous NM\_003836.6: c.194 A > G variation in exon 3 of *DLK1*, predicting an amino acid substitution at codon 65 (p.(His65Arg)). His65 is located within the second EGF-like motif of the extracellular domain of *DLK1*. This variant was inherited from her healthy mother who carried the same heterozygous variant (Fig. 2).

### In silico analysis of the two *DLK1* variations

The two variants NM\_003836.6: c.103 G > C p.(Gly35Arg) and NM\_003836.6: c.194 A > G p.(His65Arg) are described in GnomAD and dbSNP (rs762558665 and rs147224004) with an allele frequency in the general population of  $7.0 \times 10^{-6}$  and  $4.7 \times 10^{-4}$ , respectively. Interspecies alignment of the amino acid sequences of *DLK1* showed that residue Gly35 is invariant in vertebrates. The variation NM\_003836.6: c.103 G > C p.(Gly35Arg) is predicted to be probably damaging, with a score of 1.000 by the Polyphen-2 bioinformatic tools of variation damage prediction. This variant is classified as a variant of uncertain significance (class 3) according to the ACMG/AMP classification (PM2-PP3).

Residue His65 is conserved only within Pan Troglodytes. Polyphen-2 predicted the variation p.His65Arg to be benign, with a score of 0.215. Variant NM\_003836.6: c.194 A > G p.(His65Arg) is classified as likely benign (class 1) according to the ACMG/AMP classification (PM2-BP4-BS4).

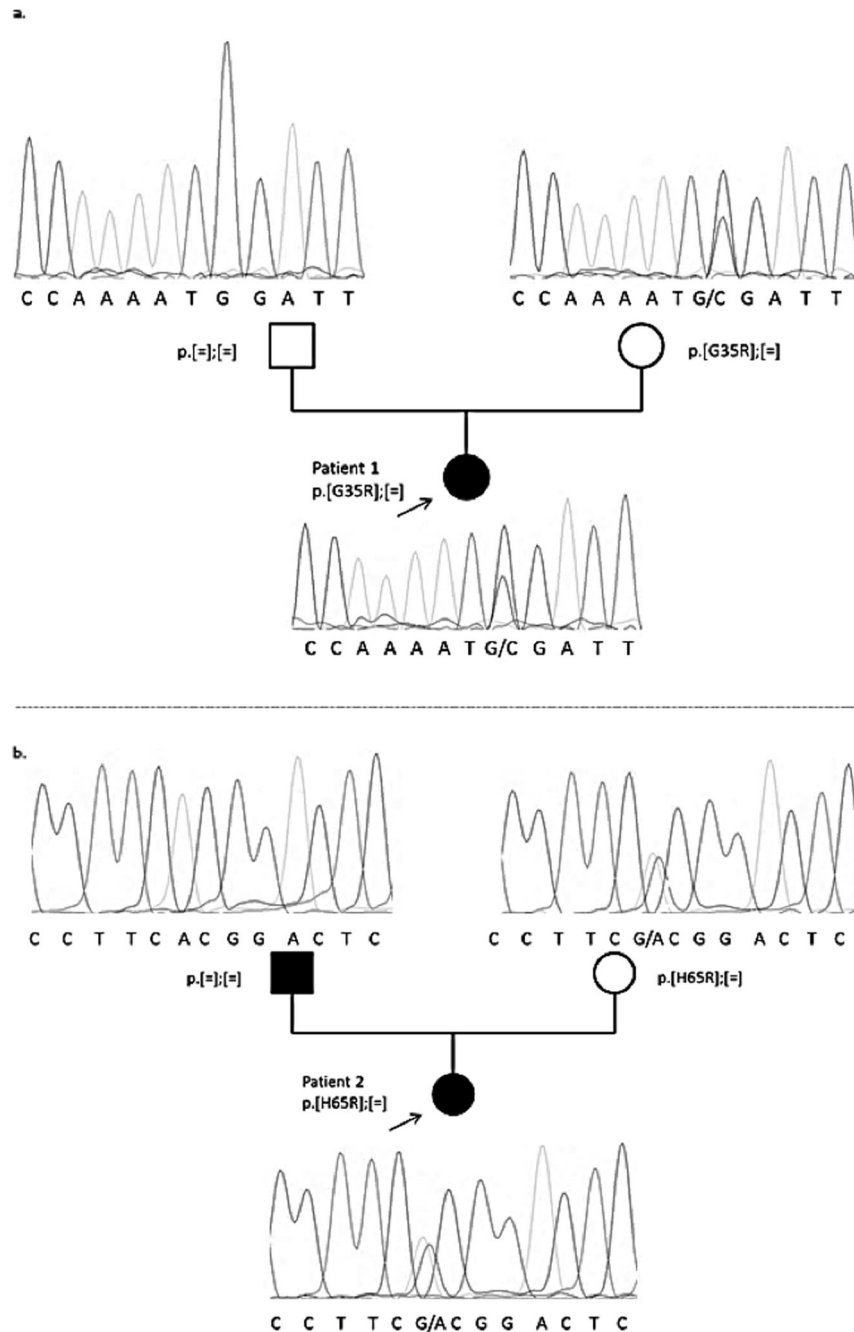
The two variants NM\_003836.6: c.103 G > C p.(Gly35Arg) and NM\_003836.6: c.194 A > G p.(His65Arg) were not described in ClinVar. We submitted it (submission SUB9482112 and SUB9433818).

### DISCUSSION

We found two rare heterozygous variants of *DLK1* in a cohort of 132 SGA patients with clinical suspicion of SRS and no identified molecular defects. The variants have already been reported in databases but with a low frequency. However, caution should be paid about variants frequencies regarding imprinted genes, as such a variant might have a different clinical impact depending on the maternal or paternal inheritance. Segregation analysis did not favor a pathogenic effect of these two variants, as they were both on the maternal allele, which is silent due to the maternal imprint of this gene. Thus, we did not identify any pathogenic *DLK1* variants in our cohort.

No variants of *DLK1* have been reported in SGA patients. Dauber et al. identified a complex defect of *DLK1* (14-kb deletion and 269-bp duplication) in four patients with familial CPP. The four patients did not show prenatal or postnatal growth failure, and other classical clinical features of Temple or SRS, such as feeding difficulties, facial dysmorphism, precocious obesity, and relative macrocephaly, were excluded [24]. Gomes et al. identified three frameshift variants of *DLK1* (NM\_003836: c.594\_594delC p.(Gly199Alafs\*11), NM\_003836: c.810\_810delT p.(Val271Cysfs\*14), and NM\_003836: c.479\_479delC p.(Pro160Leufs\*50)) in five women from three families with CPP. Among them, three experienced postnatal growth failure, but no data were available about birth weight or length [25]. Montenegro et al. described a deletion (c.401\_404 + 8del) in the splice-site junction of *DLK1* in a girl with sporadic CPP without postnatal growth failure. No data about prenatal growth were available for this patient [32].

The role of *DLK1* in fetal growth is not well established. Murine models have suggested a role for *Dlk1* in fetal and postnatal growth. Indeed, *Dlk1*-null mice and heterozygous mice with paternal inheritance of the *Dlk1*-knockout allele showed prenatal and postnatal growth restriction [23, 33]. By contrast, heterozygous mice with maternal inheritance of the *Dlk1*-knockout allele did not experience growth restriction. Moreover, it has been demonstrated



**Fig. 2 Intrafamilial segregation of variants.** Intrafamilial segregation of variants NM\_003836.6:c.103 G > C p.(Gly35Arg) of *DLK1* in family 1 (a) and NM\_003836.6: c.194 A > G p.(His65Arg) of *DLK1* in family 2 (b). The two variants were inherited from the mother of the patients. In black, patients born SGA.

that *Dlk1* promotes *Gh* expression. *Dlk1*-null mice showed reduced pituitary GH content and mice overexpressing *Dlk1* had excessive pituitary and circulating levels of GH [33, 34]. The modulation of GH levels could explain, at least in part, the postnatal growth failure of mice lacking *Dlk1*, but not the prenatal growth failure. During fetal life, *Dlk1* is expressed in the placenta in the endothelial cells of the placental labyrinth but is not required for its development [18]. Mice with a conditional deletion of *Dlk1* in placental endothelial cells did not show FGR [35]. Reduced *DLK1* levels in maternal blood samples have been shown in the second and third trimester of gestation with FGR [36, 37]. However, a causal relationship between low *DLK1* levels and FGR has not been demonstrated or whether *DLK1* levels simply reflect fetal weight.

To date, less is known about the contribution of individual genes of the 14q32 domain in the TS phenotype and the overlapping features with SRS. FGR could, for example, be explained by the action of several genes of the 14q32 domain in concert with genes in other imprinted domains [38]. Indeed, Abi Habib et al. demonstrated that overexpression of *MEG3* and *MEG8* in TS patients with 14q32 hypomethylation is associated with downregulation of *IGF2* transcription from the 11p15 imprinting region [28].

In conclusion, we did not identify any variants in *DLK1* in a cohort of 132 patients with suspected SRS. Although we screened a large cohort of patients for *DLK1* variants, we cannot rule out the possibility of a role of *DLK1* in fetal growth and the SRS phenotype. However, a frequent contribution of *DLK1* variants among the molecular causes of

SRS is unlikely. We did not identify a new molecular cause of SRS by the targeted NGS approach. Whole exome and genome sequencing and characterization of the entire methylome offer promising perspectives for the identification of new molecular causes of SRS.

## REFERENCES

- Gaccioli F, ILMH Aye, Sovio U, Charnock-Jones DS, GCS Smith. Screening for fetal growth restriction using fetal biometry combined with maternal biomarkers. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218:5725–37.
- Giabicani E, Pham A, Brioude F, Mitanchez D, Netchine I. Diagnosis and management of postnatal fetal growth restriction. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(Aug):523–34.
- Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, O'Connell SM, Salem J, Bliet J, et al. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:105–24.
- Azzi S, Salem J, Thibaud N, Chantot-Bastaraud S, Lieber E, Netchine I, et al. A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypic-genotypic correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2015;52(Jul):446–53.
- Netchine I, Rossignol S, Dufourg M-N, Azzi S, Rousseau A, Perin L, et al. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3148–54.
- Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet.* 2005;37:1003–7.
- Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, et al. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet.* 1995;4:583–7.
- Begemann M, Zirn B, Santen G, Wirthgen E, Soellner L, Büttel H-M, et al. Paternally inherited IGF2 mutation and growth restriction. *N Engl J Med.* 2015;373:349–56.
- Brioude F, Oliver-Petit I, Blaise A, Praz F, Rossignol S, Le Jule M, et al. CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J Med Genet.* 2013;50:823–30.
- Abi Habib W, Brioude F, Edouard T, Bennett JT, Lienhardt-Roussie A, Tixier F, et al. Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet Med.* 2018;20:250–8.
- De Crescenzo A, Citro V, Freschi A, Sparago A, Palumbo O, Cubellis MV, et al. A splicing mutation of the HMGA2 gene is associated with Silver-Russell syndrome phenotype. *J Hum Genet.* 2015;60:287–93.
- Akawi NA, Ali BR, Hamamy H, Al-Hadidy A, Al-Gazali L. Is autosomal recessive Silver-Russell syndrome a separate entity or is it part of the 3-M syndrome spectrum? *Am J Med Genet A.* 2011;155A:1236–45.
- Inoue T, Nakamura A, Iwahashi-Odano M, Tanase-Nakao K, Matsubara K, Nishioka J, et al. Contribution of gene mutations to Silver-Russell syndrome phenotype: multigene sequencing analysis in 92 etiology-unknown patients. *Clin Epigenetics.* 2020;12:86.
- Meyer R, Begemann M, Hübner CT, Dey D, Kuechler A, Elgizouli M, et al. One test for all: whole exome sequencing significantly improves the diagnostic yield in growth retarded patients referred for molecular testing for Silver-Russell syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16:42.
- Meyer R, Soellner L, Begemann M, Dicks S, Fekete G, Rahner N, et al. Targeted next generation sequencing approach in patients referred for Silver-Russell syndrome testing increases the mutation detection rate and provides decisive information for clinical management. *J Pediatr.* 2017;187:206–212.e1.
- Neuheuser L, Meyer R, Begemann M, Elbracht M, Eggermann T. Next generation sequencing and imprinting disorders: current applications and future perspectives: lessons from Silver-Russell syndrome. *Mol Cell Probes.* 2019;44:1–7.
- Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet.* 1991;28:511–4.
- Traustadóttir GÁ, Lagoni LV, Ankerstjerne LBS, Bisgaard HC, Jensen CH, Andersen DC. The imprinted gene *Delta* like non-canonical Notch ligand 1 (*Dlk1*) is conserved in mammals, and serves a growth modulatory role during tissue development and regeneration through Notch dependent and independent mechanisms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;46:17–27.
- Geoffron S, Abi Habib W, Chantot-Bastaraud S, Dubern B, Steunou V, Azzi S, et al. Chromosome 14q32.2 imprinted region disruption as an alternative molecular diagnosis of Silver-Russell syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103:2436–46.
- Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, et al. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet Med.* 2017;19:1356–66.
- Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, et al. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell Syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:1062–7.
- Poole RL, Docherty LE, Al Sayegh A, Caliebe A, Turner C, Baple E, et al. Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders. *Am J Med Genet A.* 2013;161:2174–82.
- Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim K-H, Yun EJ, et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol.* 2002;22:5585–92.
- Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:1557–67.
- Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, Ramos CO, Montenegro LR, Canton A, et al. DLK1 is a novel link between reproduction and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104:2112–20.
- Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr.* 1969;74:901–10.
- Sempé (M). — Auxologie, méthode et séquences. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris.* 1980;7:77–77.
- Abi Habib W, Brioude F, Azzi S, Rossignol S, Linglart A, Sobrier M-L, et al. Transcriptional profiling at the *DLK1/MEG3* domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci Adv.* 2019;5:eau9425.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7:248–9.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24.
- Montenegro L, Labarta JJ, Piovesan M, Canton APM, Corripio R, Soriano-Guillén L, et al. Novel genetic and biochemical findings of DLK1 in children with central precocious puberty: a Brazilian-Spanish study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:dgaa461.
- Cheung LYM, Rizzotti K, Lovell-Badge R, Le Tissier PR. Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *J Neuroendocrinol.* 2013;25:391–401.
- Charalambous M, Da Rocha ST, Radford EJ, Medina-Gomez G, Curran S, Pinnock SB, et al. DLK1/PREF1 regulates nutrient metabolism and protects from steatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:16088–93.
- Appelbe OK, Yevtodiyenko A, Muniz-Talavera H, Schmidt JV. Conditional deletions refine the embryonic requirement for *Dlk1*. *Mech Dev.* 2013;130:143–59.
- Cleaton MAM, Dent CL, Howard M, Corish JA, Gutteridge I, Sovio U, et al. Fetus-derived DLK1 is required for maternal metabolic adaptations to pregnancy and is associated with fetal growth restriction. *Nat Genet.* 2016;48:1473–80.
- MacDonald TM, Walker SP, Hiscock R, Cannon P, Harper A, Murray E, et al. Circulating delta-like homolog 1 (*DLK1*) at 36 weeks is correlated with birthweight and is of placental origin. *Placenta.* 2020;91:24–30.
- Howard M, Charalambous M. Molecular basis of imprinting disorders affecting chromosome 14: lessons from murine models. *Reproduction.* 2015;149:R237–249.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients, their families and physicians, and the « Association Française des Familles ayant un enfant atteint du Syndrome Silver-Russell ou le Petit pour l'âge Gestationnel (AFIF/PAG) ». We thank Cristina DAS NEVES and Nathalie THIBAUD for their contribution of this work.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.P.: conception of the work, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript, and final approval of the published version. M.-L.S., D.M., E.G., F.B., and I.N.: conception of the work, analysis and interpretation of the data, critical revision of the work for important intellectual content, and final approval of the published version. M.L.J.F.: Acquisition of the data and final approval of the published version.

## FUNDING

This study received collaborative grant funding from the Agence Nationale de la Recherche (project "IMP-REGULOME", ANR-18-CE12-0022-02).



### COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

### ETHICAL APPROVAL

Written informed consent for participation was received from all patients or parents, in accordance with national ethics rules (Assistance Publique–Hôpitaux de Paris authorization no. 681).

### ADDITIONAL INFORMATION

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to I.N.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**III. Article original en cours de relecture par les différents partenaires européens :**

**Genes to be evaluated when using NGS based technologies in Silver-Russell  
syndrome and its differential diagnoses : a joint strategy**

PHAM A., TEMPLE K., TUMER Z., MACKAY D., WAKELING E., NETCHINE I.,  
EGGERMANN T., BRIOUDE F.

1 **Genes to be evaluated when using NGS based technologies in Silver-Russell syndrome and**  
2 **its differential diagnoses: a joint strategy**

3 A. Pham<sup>1</sup>, K. Temple<sup>2</sup>, Z. Tümer<sup>3</sup>, D. MacKay<sup>4</sup>, E. Wakeling<sup>5</sup>, I. Netchine<sup>6</sup>, T. Eggermann<sup>7</sup>, F.  
4 Brioude<sup>6</sup>

5 1. INSERM U938, Centre de recherche Saint Antoine, 184 rue du Faubourg Saint Antoine,  
6 75012 PARIS, France

7 2. Human Genetics and Genomics Medicine, Faculty of Medicine, University of Southampton  
8 and Wessex Clinical Genetics Service, University Hospital Southampton.

9 3. Kennedy Center, Department of Clinical Genetics, Copenhagen University Hospital,  
10 Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Department of Clinical Medicine, Faculty of Health  
11 and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

12 4. Human Development and Health, Faculty of Medicine, University of Southampton,  
13 Southampton SO17 1BJ, UK.

14 5. North West Thames Regional Genetics Service, London North West Healthcare NHS Trust,  
15 Watford Road, Harrow HA1 3UJ, UK.

16 6. INSERM U938, Centre de recherche Saint Antoine, 184 rue du Faubourg Saint Antoine,  
17 75012 PARIS, APHP, Hôpital Trousseau, Explorations fonctionnelles endocriniennes, 75012  
18 PARIS, France

19 7. Department for Imprinting Disorders, Institute of Human Genetics, Medical Faculty, RWTH  
20 Aachen University, Aachen, Germany

21

22

## 23 INTRODUCTION

24 Imprinting disorders are a group of diseases which commonly impact growth, pubertal and  
25 cognitive development, metabolism and behaviour (Eggermann et al., 2015). They are caused  
26 by disruption of imprinted genes, i.e. genes which are expressed in a mono-allelic manner,  
27 depending on the parental origin of the allele (DeChiara et al., 1991). Abnormal expression or  
28 function of these genes can be secondary to structural variations (such as micro-deletions/-  
29 duplications), intragenic variants, uniparental disomy (UPD) or epigenetic defects such as gain  
30 or loss of methylation at the differentially methylated regions in imprinting centres.

31 One of the most studied imprinting disorders is Silver Russell syndrome (SRS, OMIM  
32 #180860). Six criteria have been selected for a clinical definition of SRS: small for gestational  
33 age, postnatal growth retardation, feeding difficulties and/or low body mass index (BMI) in  
34 early life, relative macrocephaly at birth, protruding forehead and body asymmetry (Azzi et al.,  
35 2015; Wakeling et al., 2017). SRS is a clinical diagnosis, and it is considered if a patient scores  
36 at least four of these six criteria (Netchine Harbinson clinical scoring system (NH-CSS)). If  
37 molecular tests are normal and differential diagnoses have been ruled out, patients scoring at  
38 least four, including both prominent forehead and relative macrocephaly at birth should be  
39 diagnosed as clinical Silver–Russell syndrome (supplementary table 1) (Azzi et al., 2015;  
40 Wakeling et al., 2017).

41 In about 60% of patients with a clinical diagnosis of SRS, methylation testing at the 11p15  
42 locus and chromosome 7 will identify the underlying mechanism. The recent international  
43 consensus about SRS (Wakeling et al., 2017) stipulated that methylation testing at these two  
44 loci should be the first line molecular test to be performed. In patients with a clinical diagnosis  
45 of SRS, numerous publications have reported anomalies at chromosome 14q32 (*DLK1/MEG3*  
46 locus) including maternal uniparental disomy, paternal deletions or loss of methylation at the  
47 *DLK1/MEG3:IG-DMR*, that have been until recently associated mostly with the diagnosis of

48 Temple Syndrome. Additionally, further molecular tests including testing for UPD of  
49 chromosomes 16 and 20, *IGF2* and *CDKN1C* variants or methylation defects of 11p15 in an  
50 alternative tissue have been proposed. Since the first consensus on SRS, new molecular defects  
51 have been identified in patients with a clinical presentation of SRS.

52 The clinical diagnosis of SRS might be obvious for some patients who fulfil all the clinical  
53 criteria. However, a growing number of patients are referred for molecular testing of this rare  
54 disorder because of a clinical suspicion of SRS, though they do not meet the consensus criteria  
55 for diagnosis. Moreover, with the exception of body asymmetry, individual features of SRS can  
56 been seen in a wide range of conditions, and some are subjective (especially the facial  
57 dysmorphism). Finally, the diagnosis can be difficult in adolescents and adults as some of the  
58 features, including prominent forehead, become less obvious with time.

59 In the case of syndromic growth retardation, molecular confirmation is of particular importance.  
60 Clinical management, recommendations are established for patients with SRS, and optimise its  
61 outcomes. Furthermore, SRS is not associated with an increased risk of cancer unlike several  
62 differential diagnoses of SRS. This includes Bloom (OMIM #210900), Nijmegen breakage  
63 (OMIM #251260) or Mulibrey nanism (OMIM #253250) syndromes, which are sometimes  
64 difficult to diagnose clinically. Therefore, distinguishing these rare diseases from SRS is  
65 important, especially with regards to growth hormone therapy.

66 Considering the growing number of genes that have been identified in patients with a clinical  
67 diagnosis evocative of SRS, and the need for distinguishing SRS from alternative diagnoses,  
68 next generation sequencing (NGS) strategies, including virtual gene panels, exome sequencing  
69 (ES) or whole genome sequencing (WGS), have been established in molecular laboratories  
70 offering molecular diagnostic testing of imprinting disorders. Taking into account the published  
71 articles and the unpublished data obtained in their respective laboratories, a network of

72 European experts determined a list of genes that should be included for evaluation in NGS  
73 strategies where first line methylation analysis is normal.

74

## 75 **METHODS**

76 A review of the literature in PubMed has been performed with the following key words: “small  
77 for gestational age (SGA)” or “short stature” or “growth failure” or “SRS” and  
78 “mutation/variant” or “NGS” or “Whole exome sequencing/WES” or “Whole genome  
79 sequencing/WGS” or “molecular defect”. We selected genes in which variants have been  
80 identified in patients referred for SRS, or patients referred for SGA or short stature with a  
81 clinical score for SRS (NH-CSS)  $\geq 4/6$  (according to clinical data provided in the articles), or  
82 genes implicated in diseases already listed as differential diagnoses of SRS in the international  
83 consensus about SRS. After determining a first list of genes from three reference molecular  
84 laboratories (Aachen, Copenhagen and Paris), web-conferences have been conducted with  
85 paediatricians (E.G, A.P., I.N), clinical geneticists (E.W., K.T.) and molecular geneticists (F.B.,  
86 T.E., K.G., D.M., Z.T.). Genes have been sorted as “diagnosis genes” when variants have  
87 already been identified in referred patients for SRS, or “candidate genes” investigated for  
88 research purposes based on their physiological functions. For the genes included in the  
89 diagnosis group, the longest open reading frame transcripts and all coding exons have been  
90 considered in term of molecular diagnosis, in accordance with the European Society of Human  
91 Genetics recommendations.

## 92 **RESULTS**

93 The list of genes, variations of which should be evaluated in the diagnostic context of SRS, is  
94 represented in table 1.

95 By reviewing the literature, we identified 24 genes in which variants have been identified in  
96 patients with clinical features overlapping to those found in SRS patients fulfilling the  
97 consensus NH-CSS clinical criteria. We have divided these genes in four subgroups. We first  
98 identified genes that are associated with the *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway (group 1) or genes  
99 associated with the imprinted network (group 2). All these genes are associated with SRS and  
100 should all be included in the panel. Considering their clinical overlap with SRS, some  
101 monogenic disorders have been referred to in the consensus paper and mentioned thereafter as  
102 “differential diagnoses for SRS” (group 3) (review in (Wakeling et al., 2017)). Aside these  
103 disorders, some genes have been identified in patients initially diagnosed as SRS/ in patients  
104 with NH-CSS  $\geq 4$  (group 4). This subgroup of disorders includes conditions with additional  
105 features not typical of SRS such as skeletal dysplasias, chromatinopathies (such as KBG,  
106 Kabuki, Cornelia de Lange, Wiedemann Steiner syndromes), Rasopathies or Fanconi anemia.  
107 Considering this stratification, we proposed an adaptation of the consensus flow chart for  
108 investigation and diagnosis of SRS (Wakeling et al., 2017), including an NGS sequencing  
109 strategy (figure 1). Patients scoring positively for a clinical diagnosis of SRS (NH-CSS $\geq 4/6$ , or  
110  $=3/6$  with continued clinical suspicion of SRS) without body asymmetry and with a negative  
111 molecular test for 11p15 or 14q32 disturbances and upd(7)mat, should benefit from this  
112 strategy. With the exception of Fanconi syndrome, this list includes the main differential  
113 diagnoses with contraindication to GH treatment: Bloom syndrome, Nijmegen syndrome,  
114 Mullibrey Nannism.

## 115 **DISCUSSION**

116 The international consensus about SRS recommended screening for intragenic *IGF2* and  
117 *CDKN1C* variants in SRS patients in case of an absent methylation defect. Since the

118 international consensus, variants in several genes have been identified in patients with a NH-  
119 CSS $\geq$ 4/6 expanding the list of single genes associated with a diagnosis of SRS.

120 De Crescenzo et al. reported the first loss-of-function variant of *HMGA2* in an SRS patient (De  
121 Crescenzo et al., 2015). Several other teams reported *HMGA2* variants in patients with a  
122 clinically diagnostic score for SRS (Abi Habib et al., 2018; Hübner et al., 2020; Leszinski et  
123 al., 2018). To improve the molecular diagnosis of SRS, several teams have used NGS inpatients  
124 referred with possible SRS. Using ES, Abi Habib et al. reported the first variants of *PLAG1* in  
125 humans in four patients with clinical SRS (Abi Habib et al., 2018), emphasizing the role of the  
126 *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway in the regulation of fetal growth. In a cohort of 15 patients with  
127 a NH-CSS $\geq$ 4/6, Meyer et al. identified pathogenic or likely pathogenic variants in *BLM* (Bloom  
128 syndrome OMIM#210900), *ANKRD11* (KBG syndrome, OMIM#148050), *IGF1R*  
129 (OMIM#270450) and *TRIM37* (Mulibrey nanism, OMIM #273250) in four patients, using a  
130 targeted NGS approach (Meyer et al., 2017). Using the same approach, Inoue et al. identified  
131 three pathogenic variants in *IGF1R* (OMIM#270450), *PIK3R1* (SHORT syndrome, OMIM  
132 #269880) and *SRCAP* (Floating Harbor syndrome, OMIM #136140) in patients scoring for SRS  
133 (Inoue et al., 2020). Neuheuser et al. performed ES in 47 patients referred for SRS with negative  
134 molecular testing for 11p15, upd(7) and 14q32 and identified likely pathogenic variants in  
135 *PCNT* (MOPDII, OMIM#210720) and in *NF1* in two patents, respectively (Neuheuser et al.,  
136 2019). Using Sanger sequencing, differential diagnoses have been identified in patients referred  
137 for SRS, like variants in *COL1A1* (type 1 collagenopathy) (Cianci et al., 2013; Parker et al.,  
138 2011), *IGF1R* (Giabicani et al., 2020; Soellner et al., 2013), *OBSL1* and *CUL7* (3M syndrome,  
139 OMIM #612921) (Akawi et al., 2011; Shaikh et al., 2019), and *TRIM37* (Mulibrey nanism  
140 OMIM #253250) (Jobic et al., 2017; Mozzillo et al., 2016).

141 A review of the literature allowed identification of some patients who were screened for  
142 prenatal and/or postnatal short stature without a diagnosis of SRS, but for whom the NH-CSS



143 was retrospectively evocative of SRS. These include an *HRAS* variant (Costello syndrome,  
144 OMIM#218040) identified in a patient with a NH-CSS of 4/6 and with GH-deficiency (N and  
145 D, 2004), and *ORC4* variants (Meier Gorlin syndrome, OMIM#224690) identified in several  
146 patients with a NH-CSS=4/6 (Guernsey et al., 2011). In 2021, supporting previous findings,  
147 Alhendi et al used WGS in a cohort of 72 patients referred with suspected SRS and identified  
148 plausible causative variants in *CDKN1C*, *IGF2*, *IGF1R* and *ORC1* in 27% of the patients (Meier  
149 Gorlin syndrome) (Alhendi et al., 2021).

150 These results illustrate the range of growth disorders that can fall within the differential  
151 diagnosis of SRS. They reflect the difficulty of using only clinical criteria to predict genotype  
152 in this condition because of the relative lack of specificity of some of the clinical criteria for a  
153 diagnosis of SRS. As discussed in the SRS consensus (Wakeling et al., 2017) there are clinical  
154 pointers that are more discriminatory, such as relative macrocephaly at birth and body  
155 asymmetry. The latter is not expected in patients with constitutional pathogenic variants (except  
156 in patients with *COL1A1* variants because of the risk of multiple bone fractures (Cianci et al.,  
157 2013)). Thus one of the six criteria of the NH-CSS will be lacking in every case, making NH-  
158 CSS less sensitive for the detection of gene variants compared to methylation anomalies.

159 The importance of identifying other genetic causes, however, is clear. Several cancer  
160 predisposition syndromes, such as Bloom (OMIM #210900), Nijmegen syndrome (OMIM  
161 #251260) and Mulibrey nanism (OMIM #253250) have already been identified as differential  
162 diagnoses of SRS (Wakeling et al., 2017). A clinical diagnosis of these syndromes can be  
163 difficult but is of importance because of the increased risk of tumor development which might  
164 contraindicate GH therapy. Renes et al. identified variants in *BLM* in two patients with prenatal  
165 and postnatal growth failure and feeding difficulties, with a NH-CSS score compatible with  
166 SRS (Renes et al., 2013). These two patients received GH therapy starting at ages 5 and 4 years,  
167 respectively. The first patient developed B cell non-Hodgkin lymphoma and died at age 16

168 years. The second patient developed photosensitive skin lesions but not tumor. The two patients  
169 did not present with characteristic clinical features of Bloom syndrome, except prenatal and  
170 postnatal growth failure. Meyer et al. identified a homozygous variant in *BLM* in a patient  
171 referred for SRS with a NH-CSS of 5/6. GH therapy was initiated at 2 years, before the  
172 diagnosis of Bloom syndrome, and pursued until the age of 9 years when the patient developed  
173 a Burkitt lymphoma (Meyer et al., 2017). Hämämäinen et al. reported a patient with prenatal  
174 growth failure and an initial diagnosis of SRS or 3-M syndrome, in whom the occurrence of  
175 Wilms' tumor before initiating GH therapy led to the diagnosis of Mulibrey nanism (*TRIM37*  
176 variant) (Rh et al., 2006).

177 To improve molecular diagnostics in SRS patients, we provide in this study a list of genes to  
178 evaluate when employing NGS technologies, when a common molecular defect (11p15,  
179 upd(7)mat, 14q32 disturbances, upd(20 and 16)) could not be identified. When using NGS the  
180 first group of genes to be targeted (using virtual gene panels) should be the 24 genes associated  
181 with SRS or differential diagnoses of SRS, to avoid the difficulty of interpreting variants of  
182 unknown significance and to avoid incidental findings. .

183 From a research perspective, WES and WGS are promising as they enable identification of  
184 novel causes in an unbiased manner. The key for a successful and efficient NGS data analysis  
185 is the stringent filtering by bioinformatic pipelines which commonly refer to databases of  
186 genetic variants in normal or affected individuals, pathogenicity prediction tools and different  
187 modes of genetic inheritance. With the guidelines for interpretation of genomic variants  
188 suggested by the American College of Medical Genetics (ACMG) a widely accepted system  
189 for variant classification has been developed. Whereas the classification of a variant as  
190 benign/likely benign or pathogenic/likely pathogenic either excludes or confirms its  
191 pathogenicity, the prediction of a considerable number of variants remains ambiguous (so-  
192 called variants of unknown significance – VUS) (Richards et al., 2015). This difficulty to

193 provide a reliable prediction estimation of these variants can be due to unambiguously  
194 functional and/or bioinformatic predictions, to their lack in databases or to their localization in  
195 genes which have finally not been proven to cause a disease. Given that a laboratory offering  
196 diagnostic genetic testing should provide evidence-based information on the correlation  
197 between genetic variants in specific genes and clinical features a virtual panel approach is thus,  
198 reasonable.

199 Finally, laboratories offering genetic tests have to implement a quality management system  
200 covering all steps of the diagnostic workup, starting with pre-analytics (information for the  
201 customers, identification of samples) and continues with wet-lab and bioinformatic data  
202 analyses, data interpretation, participation in external quality assessments, comprehensive  
203 reporting and post-analytics (sample and data management/storage) (Berwouts et al., 2010).  
204 Quality management systems should follow national rules, but it should be based on the latest  
205 version of the ISO15189 standard, which specifies requirements for quality and competence in  
206 medical laboratories.

## 207 **CONCLUSION**

208 Since the international consensus in 2015, research programs have allowed the identification of  
209 new genes and genetic variants in patients with a clinical suspicion of SRS. Thus, aside  
210 epigenetic anomalies or uniparental maternal disomies, the number of genes that can potentially  
211 be tested has increased, justifying new approaches based on NGS and an adaptation of the  
212 diagnostic procedures that should be proposed.

213 Despite these recent advances, some patients will remain without a molecular diagnosis,  
214 underlining the importance of continuing research in imprinting disorders. Discovery of new  
215 gene associations will, in turn, feedback into iterative updates of the recommended NGS gene  
216 panel for investigation of patients referred for a possible diagnosis of SRS.

217 **REFERENCES**

- 218 Abi Habib, W., Brioude, F., Edouard, T., Bennett, J.T., Lienhardt-Roussie, A., Tixier, F., Salem, J.,  
219 Yuen, T., Azzi, S., Le Bouc, Y., et al. (2018). Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-  
220 IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet. Med.* *20*, 250–258.
- 221 Akawi, N.A., Ali, B.R., Hamamy, H., Al-Hadidy, A., and Al-Gazali, L. (2011). Is autosomal recessive  
222 Silver-Russell syndrome a separate entity or is it part of the 3-M syndrome spectrum? *Am. J. Med. Genet.*  
223 *A 155A*, 1236–1245.
- 224 Alhendi, A.S.N., Lim, D., McKee, S., McEntagart, M., Tatton-Brown, K., Temple, I.K., Davies, J.H.,  
225 and Mackay, D.J.G. (2021). Whole-genome analysis as a diagnostic tool for patients referred for  
226 diagnosis of Silver-Russell syndrome: a real-world study. *J Med Genet jmedgenet-2021-107699*.
- 227 Azzi, S., Salem, J., Thibaud, N., Chantot-Bastaraud, S., Lieber, E., Netchine, I., and Harbison, M.D.  
228 (2015). A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypical-  
229 genotypical correlations in Silver-Russell syndrome. *J. Med. Genet.* *52*, 446–453.
- 230 Berwouts, S., Morris, M.A., and Dequeker, E. (2010). Approaches to quality management and  
231 accreditation in a genetic testing laboratory. *Eur J Hum Genet 18 Suppl 1*, S1-19.
- 232 Cianci, P., Paterlini, G., Tagliabue, P., Verderio, M., Vergani, P., Bianchi, M.L., Giussani, C., Kullmann,  
233 G., Mazzoleni, F., Bozzetti, A., et al. (2013). Collagenopathy with a phenotype resembling Silver-  
234 Russell syndrome phenotype. *Am. J. Med. Genet. A 161A*, 2681–2684.
- 235 De Crescenzo, A., Citro, V., Freschi, A., Sparago, A., Palumbo, O., Cubellis, M.V., Carella, M.,  
236 Castelluccio, P., Cavaliere, M.L., Cerrato, F., et al. (2015). A splicing mutation of the HMGA2 gene is  
237 associated with Silver-Russell syndrome phenotype. *J. Hum. Genet.* *60*, 287–293.
- 238 DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-  
239 like growth factor II gene. *Cell 64*, 849–859.
- 240 Eggermann, T., Perez de Nanclares, G., Maher, E.R., Temple, I.K., Tümer, Z., Monk, D., Mackay,  
241 D.J.G., Grønskov, K., Riccio, A., Linglart, A., et al. (2015). Imprinting disorders: a group of congenital  
242 disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics 7*,  
243 123.
- 244 Giabicani, E., Willems, M., Steunou, V., Chantot-Bastaraud, S., Thibaud, N., Abi Habib, W., Azzi, S.,  
245 Lam, B., Bérard, L., Bony-Trifunovic, H., et al. (2020). Increasing knowledge in IGF1R defects: lessons  
246 from 35 new patients. *J Med Genet 57*, 160–168.
- 247 Guernsey, D.L., Matsuoka, M., Jiang, H., Evans, S., Macgillivray, C., Nightingale, M., Perry, S.,  
248 Ferguson, M., LeBlanc, M., Paquette, J., et al. (2011). Mutations in origin recognition complex gene  
249 ORC4 cause Meier-Gorlin syndrome. *Nat. Genet.* *43*, 360–364.
- 250 Hübner, C.T., Meyer, R., Kenawy, A., Ambrozaityte, L., Matuleviciene, A., Kraft, F., Begemann, M.,  
251 Elbracht, M., and Eggermann, T. (2020). HMGA2 Variants in Silver-Russell Syndrome: Homozygous  
252 and Heterozygous Occurrence. *J Clin Endocrinol Metab 105*, dgaa273.
- 253 Inoue, T., Nakamura, A., Iwahashi-Odano, M., Tanase-Nakao, K., Matsubara, K., Nishioka, J., Maruo,  
254 Y., Hasegawa, Y., Suzumura, H., Sato, S., et al. (2020). Contribution of gene mutations to Silver-Russell  
255 syndrome phenotype: multigene sequencing analysis in 92 etiology-unknown patients. *Clin Epigenetics*  
256 *12*, 86.

257 Jobic, F., Morin, G., Vincent-Delorme, C., Cadet, E., Cabry, R., Mathieu-Dramard, M., Copin, H.,  
258 Rochette, J., and Jedraszak, G. (2017). New intragenic rearrangements in non-Finnish mulibrey nanism.  
259 *Am. J. Med. Genet. A* 173, 2782–2788.

260 Leszinski, G.S., Warncke, K., Hoefele, J., and Wagner, M. (2018). A case report and review of the  
261 literature indicate that HMGA2 should be added as a disease gene for Silver-Russell syndrome. *Gene*  
262 663, 110–114.

263 Meyer, R., Soellner, L., Begemann, M., Dicks, S., Fekete, G., Rahner, N., Zerres, K., Elbracht, M., and  
264 Eggermann, T. (2017). Targeted Next Generation Sequencing Approach in Patients Referred for Silver-  
265 Russell Syndrome Testing Increases the Mutation Detection Rate and Provides Decisive Information  
266 for Clinical Management. *J. Pediatr.* 187, 206-212.e1.

267 Mozzillo, E., Cozzolino, C., Genesisio, R., Melis, D., Frisso, G., Orrico, A., Lombardo, B., Fattorusso,  
268 V., Discepolo, V., Della Casa, R., et al. (2016). Mulibrey nanism: Two novel mutations in a child  
269 identified by Array CGH and DNA sequencing. *Am. J. Med. Genet. A* 170, 2196–2199.

270 N, G., and D, V. (2004). Costello syndrome with growth hormone deficiency and hypoglycemia: a new  
271 report and review of the endocrine associations. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 129A.

272 Neuheuser, L., Meyer, R., Begemann, M., Elbracht, M., and Eggermann, T. (2019). Next generation  
273 sequencing and imprinting disorders: Current applications and future perspectives: Lessons from Silver-  
274 Russell syndrome. *Molecular and Cellular Probes* 44, 1–7.

275 Parker, M.J., Deshpande, C., Rankin, J., Wilson, L.C., Balasubramanian, M., Hall, C.M., Wagner, B.E.,  
276 Pollitt, R., Dalton, A., and Bishop, N.J. (2011). Type 1 collagenopathy presenting with a Russell-Silver  
277 phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* 155A, 1414–1418.

278 Renes, J.S., Willemsen, R.H., Wagner, A., Finken, M.J.J., and Hokken-Koelega, A.C.S. (2013). Bloom  
279 syndrome in short children born small for gestational age: a challenging diagnosis. *J. Clin. Endocrinol.*  
280 *Metab.* 98, 3932–3938.

281 Rh, H., D, M., Mt, G., Ta, O., J, K., and Ae, L. (2006). Wilms' tumor and novel TRIM37 mutations in  
282 an Australian patient with mulibrey nanism. *Clinical Genetics* 70.

283 Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon,  
284 E., Spector, E., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint  
285 consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the  
286 Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–424.

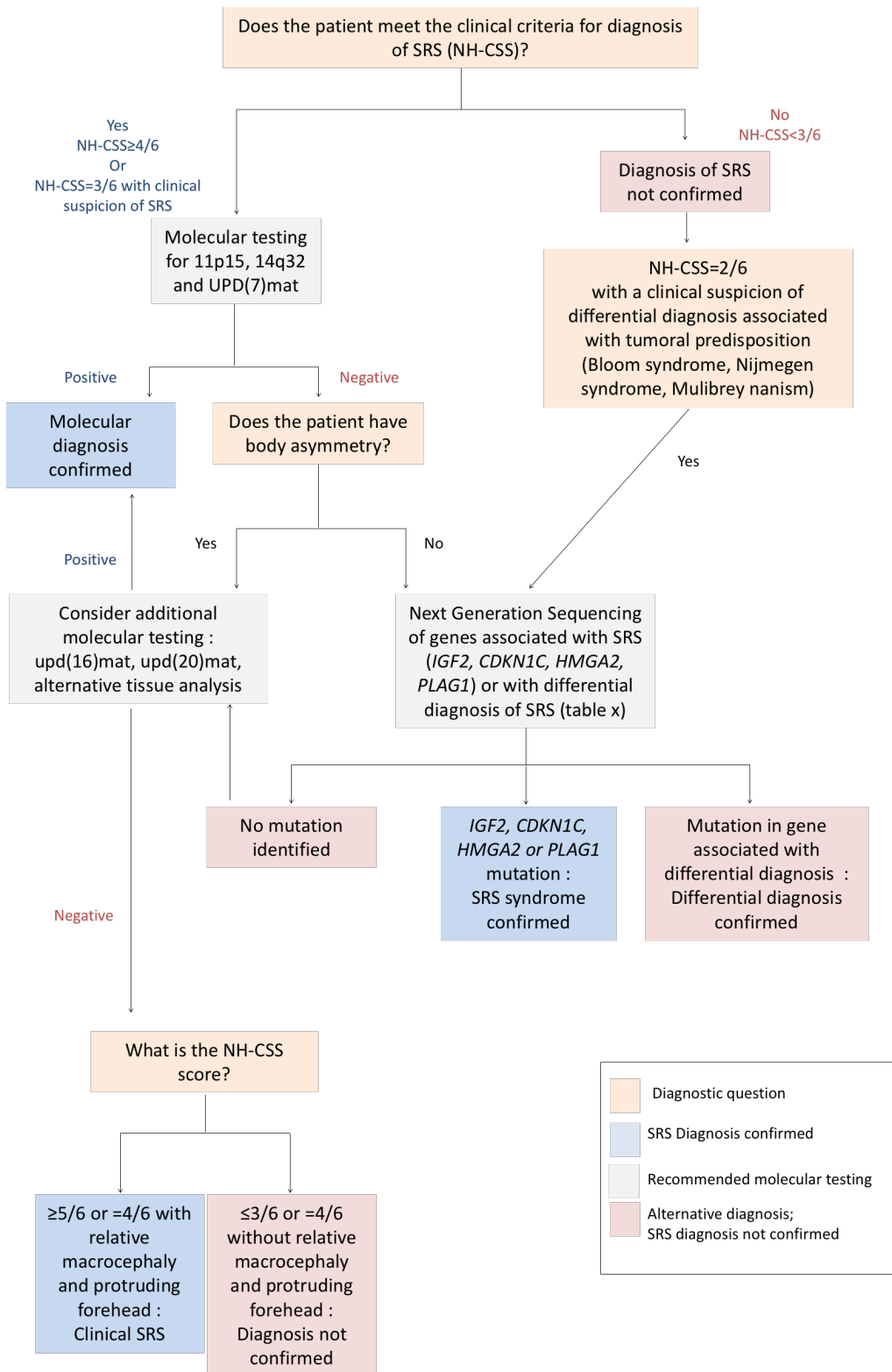
287 Shaikh, S., Shettigar, S.K.G., Kumar, S., Kantharia, S., Kurva, J., and Cherian, S. (2019). Novel  
288 mutation in Cul7 gene in a family diagnosed with 3M syndrome. *J. Genet.* 98.

289 Soellner, L., Spengler, S., Begemann, M., Wollmann, H.A., Binder, G., and Eggermann, T. (2013).  
290 IGF1R mutation analysis in short children with Silver-Russell syndrome features. *J Pediatr Genet* 2,  
291 113–117.

292 Wakeling, E.L., Brioude, F., Lokulo-Sodipe, O., O'Connell, S.M., Salem, J., Bliiek, J., Canton, A.P.M.,  
293 Chrzanowska, K.H., Davies, J.H., Dias, R.P., et al. (2017). Diagnosis and management of Silver-Russell  
294 syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 13, 105–124.

295

296



297

298

299 **Figure 1** : Adaptation of the flow chart for investigation and diagnosis of SRS of the  
 300 international SRS consensus (Ref Wakeling), including NG sequencing strategy. SRS Silver-  
 301 Rusell syndrome, NGS : New Generation Sequencing, NH-CSS : Netchine-Harbitson clinical  
 302 scoring system.

Gene	HGNC ID	SRS or differential diagnosis	LRG	Gene Location (GRCh38)	HGMD transcript	Transcript size (bp)	References
<i>ANKRD11</i>	HGNC:21316	KBG syndrome (OMIM # 148050)	No LRG	<u>Chromosome 16:</u> <u>89,267,630-</u> <u>89,490,561</u> reverse strand	<u>NM_013275.5</u>	9310	Spengler et al. Mol Syndromol 2013 Meyer et al. J. of Ped. 2017
<i>BLM</i>	HGNC:1058	Bloom syndrome (OMIM #210900)	LRG_20	<u>Chromosome 15:</u> <u>90,717,346-</u> <u>90,816,166</u> forward strand	NM_000057.3	4555	Renes et al. JCEM 2013 Meyer et al. J. of Ped. 2017
<i>CCDC8</i>	HGNC:25367	3M syndrome (OMIM #614205 #273750 #612921)	LRG_1258	<u>Chromosome 19:</u> <u>46,410,329-</u> <u>46,413,564</u> reverse strand.	NM_032040.4	3334	Akawi et al. Am J Med Genet 2011 Takizaki et al. Hum Gen Var. 2018 Shagufta et al. J of Genet. 2019 Hu et al. J Clin Lab Annals 2020 Takizaki et al. Hum Gen Var. 2020
<i>CUL7</i>	HGNC:21024		No LRG	<u>Chromosome 6:</u> <u>43,037,617-</u> <u>43,053,945</u> reverse strand.	<u>NM_014780.4</u>	3053	
<i>OBSL1</i>	HGNC:29092		No LRG	<u>Chromosome 2:</u> <u>219,550,728-</u> <u>219,571,859</u> reverse strand	NM_015311.2	1943	
<i>CDC6</i>	HGNC:1744	Meier-Gorlin syndrome (OMIM #224690 #613800 #613803 #613805 #613804)	LRG_1257	<u>Chromosome 17:</u> <u>40,287,879-</u> <u>40,304,657</u> forward strand	NM_001254.3	2742	Guernsey et al. Nat Genet. 2011 Bicknell et al. Nat Genet. 2011 Vojtková et al. Endokrynol Pol. 2019
<i>CDTI</i>	HGNC:24576		No LRG	<u>Chromosome 16:</u> <u>88,803,789-</u>	NM_030928.3	5927	

				<u>88,809,258</u> forward strand			
<i>ORC1</i>	HGNC:8487		No LRG	<u>Chromosome 1:</u> <u>52,372,829-</u> <u>52,404,423</u> reverse strand	NM_004153.3	5520	
<i>ORC4</i>	HGNC:8490		No LRG	<u>Chromosome 2:</u> <u>147,930,396-</u> <u>148,021,604</u> reverse strand	<u>NM_002552.4</u>	4150	
<i>ORC6</i>	HGNC:17151		No LRG	<u>Chromosome 16:</u> <u>46,689,643-</u> <u>46,698,394</u> forward strand.	NM_014321.3	1091	
<i>CDKN1C</i>	HGNC:1786	SRS	LRG_533	<u>Chromosome 11:</u> <u>2,883,213-</u> <u>2,885,775</u> reverse strand	NM_000076.2	7366	Brioude et al. J Med Genet 2013 Eggermann et al. Trends Mol Med 2014 Wakeling et al. Nature reviews 2017
<i>COL1A1</i>	HGNC:2197	Osteogenesis Imperfecta/ type 1 collagenopathy (OMIM #166200)	LRG_1	<u>Chromosome 17:</u> <u>50,184,101-</u> <u>50,201,632</u> reverse strand	NM_000088.3	12262	Cianci et al. Am J Med Genet 2013 Parker et al. Am J Med Genet A 2011
<i>HMGA2</i>	HGNC:5009	SRS	No LRG	<u>Chromosome 12:</u> <u>65,824,460-</u>	NM_003483.4	5188	De Crescenzo et al. J Hum Genet 2015 Abi Habib et al. Genet Med 2018



				<u>65,966,291</u> forward strand			
<i>HRAS</i>	HGNC:5173	Costello syndrome (OMIM #218040)	LRG_506	<u>Chromosome 11:</u> <u>532,242-</u> <u>537,287</u> reverse strand	NM_005343.3	4639	Stein et al. Am J of Med Genets 2004 Gregersen et al. Am J of Med Genets 2004 Sovik et al. BMJ Case report 2009 Blachowska et al. Italian J of Peds 2016 Choi et al. Cytogenet Genom Research 2019
<i>IGF1</i>	HGNC:5464	IGF1 deficiency (OMIM #608747)	No LRG	<u>Chromosome 12:</u> <u>102,395,874-</u> <u>102,481,744</u> reverse strand	<u>NM_000618.4</u>	6118	Woods et al. NEJM 1996 Bonapace et al. JMG 2003 Wakeling et al. Nature reviews 2017
<i>IGF1R</i>	HGNC:5465	IGF1 resistance (OMIM #270450)	LRG_1055	<u>Chromosome 15:</u> <u>98,648,539-</u> <u>98,964,530</u> forward strand	NM_000875.4	3192	Soellner J of ped genet 2013 Meyer. Jpeds 2017 Inoue et al. Clin Epigenetics 2020
<i>IGF2</i>	HGNC:5466	SRS	LRG_1031	<u>Chromosome 11:</u> <u>2,129,112-</u> <u>2,141,238</u> reverse strand	NM_000612.5	6594	Begeman. N Engl J Med 2015 Yamoto. Hum Mut. 2017 Wakeling et al. Nature reviews 2017 Liu. Frontiers in genetics 2017

							Poulton. Am J Med Genet A 2018 Abi Habib. Genet Med 2018 Xia. Front Genet 2019 Rockstroh. Eur J Endocrinol 2019 Masunaga. J Clin Endocrinol Metab 2020
<i>MBTPSI</i>	HGNC:15456	Kondo-Fu type of spondyloepiphyseal dysplasia	No LRG	<u>Chromosome 16:</u> <u>84,053,761-</u> <u>84,116,942</u> reverse strand			Meyer et al. Am J Med Genet 2020 Kondo Yet al. <i>JCI Insight</i> . 2018
<i>NBN</i>	HGNC:7652	Nijmegen syndrome (OMIM #251260)	LRG_158	<u>Chromosome 8:</u> <u>89,933,331-</u> <u>90,003,228</u> reverse strand	NM_002485.4	1644	Tekin. Clinical Genet 2002 Seeman. Pediatr Neurol 2004 Wakeling et al. Nature reviews 2017
<i>PCNT</i>	HGNC:16068	MOPDII (OMIM #210720)	No LRG	<u>Chromosome 21:</u> <u>46,324,141-</u> <u>46,445,769</u> forward strand	NM_006031.5	10573	Piane M. Am J Med Genet 2009 Muller E. Plos One 2012 Neuheuser. Mol Cell Probes 2019
<i>PIK3R1</i>	HGNC:8979	SHORT syndrome (OMIM #269880)	LRG_453	<u>Chromosome 5:</u> <u>68,215,756-</u> <u>68,301,821</u> forward strand	NM_181523.2	6991	Verge. Acta Ped 1994 Thauvin-Robinet. Am J Med Genet 2013 Klatka. Ital J Pediatr 2017 Inoue et al. Clin Epigenetics 2020

<i>PLAG1</i>	HGNC:9045	SRS	No LRG	<u>Chromosome 8:</u> <u>56,160,909-</u> <u>56,211,324</u> reverse strand	NM_002655.2	7338	Abi Habib. Genet Med 2018
<i>SRCAP</i>	HGNC:16974	Floating Harbor syndrome (OMIM #136140)	No LRG	<u>Chromosome 16:</u> <u>30,698,209-</u> <u>30,741,409</u> forward strand	NM_006662.2	10491	Seifert et al. BMC Medical Genetics 2014 Guo Hormon research Ped 2014 Homa Horm Research Ped 2019 Inoue et al. Clin Epigenetics 2020
<i>TRIM37</i>	HGNC:7523	Mulibrey nanism (OMIM #253250)	No LRG	<u>Chromosome 17:</u> <u>58,982,638-</u> <u>59,106,921</u> reverse strand	NM_015294.5	4579	Mozillo. Am J Med Genet 2016 Hamalainen. Clin Genet 2006 Meyer. Jpeds 2017 Jobic. Am J Med Genet 2017

**Table 1. List of diagnosis genes for SRS patients. SRS Silver Russell Syndrome. LRG Locus Reference Gene. HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee. Gene's names are given according to HUGO Gene Nomenclature Committee.**

Differential diagnosis	Genes	SGA	Relative macrocephaly at birth	Postnatal growth failure	Protruding forehead	Feeding difficulties and/or low BMI	NH-CSS	Listed as differential diagnosis of SRS in Consensus	Tumor predisposition syndrome
Bloom syndrome (OMIM #210900)	<i>BLM/RECQL3</i>	+	-	+	+/-	+	3-5	Yes	Yes
IGF1 deficiency (OMIM #608747)	<i>IGF1</i>	+	-	+	-	-	2	Yes	No
IGF1 resistance (OMIM #270450)	<i>IGF1R</i>	+/-	-	+	+/-	+	2-4	Yes	No
Nijmegen syndrome (OMIM #251260)	<i>NBN</i>	+	-	+	-	-	2	Yes	Yes
MOPDII (OMIM #210720)	<i>PCNT</i>	+	-	+	-	+/-	2-3	Yes	No
SHORT syndrome (OMIM #269880)	<i>PIK3R1</i>	+/-	-	+	+/-	+/-	2-4	Yes	No
Floating Harbor syndrome (OMIM #136140)	<i>SRCAP</i>	+/-	-	+	-	+/-	1-3	Yes	No
Mulibrey nanism (OMIM #253250)	<i>TRIM37</i>	+	-	+	+	+	4	Yes	Yes
KBG syndrome (OMIM # 148050)	<i>ANKRD11</i>	+/-	+/-	+	+	+	3-4	No	No

3M syndrome (OMIM #614205 #273750 #612921)	<i>CCDC8, CUL7, OBSLI</i>	+	+/-	+	+	+/-	4-5	Yes	No
Meier-Gorlin syndrome (OMIM #224690 #613800 #613803 #613805 #613804)	<i>CDC6, CDT1, ORC1, ORC4, ORC6</i>	+/-	+/-	+	-	+	2-4	Yes	No
Osteogenesis Imperfecta/ type 1 collagenopathy (OMIM #166200)	<i>COL1A1</i>	+/-	+	+	+	+	4-6	No	No
Costello syndrome (OMIM #218040)	<i>HRAS</i>	+/-	+/-	+	+/-	+	2-4	No	Yes
Kondo-Fu type of spondyloepiphyseal dysplasia	<i>MBTPSI</i>	+	+	+	-	+	4	No	No

**Table 2 : NH-CSS of patients referred for SRS or short stature in whom differential diagnosis of SRS was identified.**

**Clinical features (+) always, (+/-) sometimes, or (-) never associated with the differential diagnosis of SRS**

303 **Supplementary table 1 : Netchine–Harbison clinical scoring system.** LLD, leg length discrepancy;  
 304 SDS, SD score; SGA, small for gestational age  
 305

<b>Clinical criteria</b>	<b>Definition</b>
SGA (birth weight and/or birth length)	$\leq -2$ SDS for gestational age
Postnatal growth failure	Height at $24 \pm 1$ months $\leq -2$ SDS or height $\leq -2$ SDS below mid-parental target height
Relative macrocephaly at birth	Head circumference at birth $\geq 1.5$ SDS above birth weight and/or length SDS
Protruding forehead*	Forehead projecting beyond the facial plane on a side view as a toddler (1–3 years)
Body asymmetry	LLD of $\geq 0.5$ cm or arm asymmetry or LLD $< 0.5$ cm with at least two other asymmetrical body parts (one non-face)
Feeding difficulties and/or low BMI	BMI $\leq -2$ SDS at 24 months or current use of a feeding tube or cyproheptadine for appetite stimulation

306

#### IV. Conclusions et perspectives

Nous n'avons pas identifié de variation pathogène de *DLK1* au sein d'une cohorte de 132 patients nés PAG avec un diagnostic clinique de SRS selon le score de Netchine-Harbison. Cette étude menée dans une cohorte de 132 patients ne permet pas d'éliminer totalement les mutations de *DLK1* comme étiologie moléculaire de SRS, mais si elle existe, la contribution de *DLK1* serait peu fréquente.

Nous avons choisi de rechercher des mutations de *DLK1* chez des patients nés PAG et ayant un diagnostic clinique de SRS selon le score de Netchine-Harbison, ce syndrome étant un modèle pour l'étude de la régulation épigénétique de la croissance fœtale. Les patients avec un SRS présentent un retard de croissance pré et postnatal et une macrocéphalie relative (Wakeling et al., 2017). Dans l'hypothèse d'une contribution de *DLK1* dans la croissance fœtale et non pas postnatale, l'expression de *DLK1* étant ubiquitaire chez le fœtus mais beaucoup plus restreinte en période postnatale (Traustadóttir et al., 2017), la recherche de mutations de *DLK1* pourrait être élargie à une cohorte de patients nés PAG ne répondant pas aux critères cliniques du SRS.

Enfin, nous avons fait le choix d'une approche basée sur le séquençage d'un panel de gènes afin d'éviter de générer des données secondaires comme l'identification de mutations au sein de gènes de prédisposition tumorale sans lien avec la croissance fœtale. En revanche, ce choix limite la possibilité d'adapter rapidement la liste des gènes séquencés et de s'adapter aux publications de nouveaux gènes impliqués dans la croissance fœtale. Notre choix limite également l'identification de variants dans des gènes de recherche à la liste des gènes candidats que nous avons définis au préalable. En effet, l'ajout de nouveaux gènes à un panel de gènes nécessite de réadapter les étapes préalables au séquençage, à savoir la préparation de la librairie avec le choix des amorces de séquençage. Une solution intermédiaire choisie par certains de

nos collaborateurs européens consiste à séquencer chez tous les patients un exome complet, et de faire une analyse bioinformatique des données de séquençage restreinte aux gènes choisis (Meyer et al., 2021; Neuheuser et al., 2019). Cette technique offre ainsi la possibilité de revenir ultérieurement aux données brutes de séquençage pour l'analyse de nouveaux gènes.



**APPROCHE FONDAMENTALE : Recherche d'un modèle  
d'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale**

## I. Étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale

Les syndromes de Silver-Russell et de Temple, de par certaines caractéristiques cliniques et moléculaires communes, constituent un modèle pour l'étude de la régulation épigénétique de la croissance fœtale. Les patients avec un SRS ou un TS présentent un chevauchement clinique puisque 73% des patients avec un TS ont un score de Netchine-Harbison  $\geq 4/6$ , répondant donc à la définition clinique du SRS (Geoffron et al., 2018). Notre laboratoire a mis en évidence, par des études d'expression par PCR quantitative dans des fibroblastes de patients avec un SRS ou un TS un chevauchement moléculaire entre ces deux syndromes (Abi Habib et al., 2019). En effet, les fibroblastes de patients avec un TS avec anomalies épigénétiques isolées de la région 14q32 présentent une diminution de l'expression d'*IGF2* comme les patients avec un SRS. Le chevauchement clinique et moléculaire observé en cas d'anomalies de ces deux régions (11p15 et 14q32) illustre l'organisation en réseau des gènes soumis à empreinte parentale. Ces études d'expression constituent une grande avancée dans la compréhension de la régulation du réseau de gènes soumis à empreinte. Cependant, la plupart des gènes soumis à empreinte parentale sont très peu exprimés dans les fibroblastes ou les leucocytes, rendant difficile l'étude de ce réseau (Azzi et al., 2011). Par ailleurs, les cellules facilement accessibles comme les leucocytes, les cellules urinaires ou les fibroblastes sont peu impliquées dans la physiopathologie des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale, contrairement à des cellules d'intérêt impliquées dans la croissance et le métabolisme, comme les cellules du cartilage de croissance, les adipocytes, les hépatocytes, etc.... Ces cellules étant peu ou pas accessibles, l'objectif de ce travail expérimental était de rechercher un modèle cellulaire d'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale.

## **II. Cellules souches pluripotentes induites comme modèle cellulaire d'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale**

### **II.1. Historique des cellules souches pluripotentes induites**

Les cellules souches pluripotentes induites, ou iPSCs (induced pluripotent stem cells), sont des cellules obtenues par reprogrammation de cellules différenciées et qui ont la capacité d'être redifférenciées en tous types cellulaires (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007) (Fig.29). Ces cellules souches induites, qui ont valu l'obtention du prix Nobel de médecine en 2012 au chercheur japonais Shinya Yamanaka, constituent une formidable source de modélisation cellulaire et une véritable avancée pour les techniques de thérapie régénérative. Les iPSCs possèdent une pluripotence comparable aux cellules souches embryonnaires (ESCs), et sont reprogrammées à partir de cellules somatiques (Takahashi and Yamanaka, 2006). La reprogrammation consiste en la réexpression dans les cellules différenciées de quatre gènes de pluripotence que sont *OCT3/4*, *SOX3*, *c-MYC* et *KFL4* (Takahashi and Yamanaka, 2006). La réexpression de ces quatre gènes par les cellules différenciées leur confère une pluripotence avec la possibilité de les redifférencier en de nombreux types cellulaires matures. Les techniques initiales d'intégration rétro ou lentivirale de ces quatre gènes dans les cellules différenciées ont laissé la place à des techniques de transfection non intégrative épisomale ou par virus Sendaï (Bayart and Cohen-Haguenaer, 2013; Cho et al., 2010; Fus-Kujawa et al., 2021; Warren et al., 2010; Yu et al., 2009). Ces techniques ont pour principal avantage de permettre une expression transitoire des quatre gènes de pluripotence, sans intégration dans le génome de la cellule de départ, afin d'éviter le risque de transformation tumorale et diminuent le risque de mutations du génome des cellules hôtes (Bayart and Cohen-Haguenaer, 2013; Fus-Kujawa et al., 2021; Warren et al., 2010). L'étape de reprogrammation a un rendement très faible avec environ 0.5 à 5% des cellules de départ qui acquièrent la pluripotence (Takahashi and Yamanaka, 2006; Velychko et al., 2019).

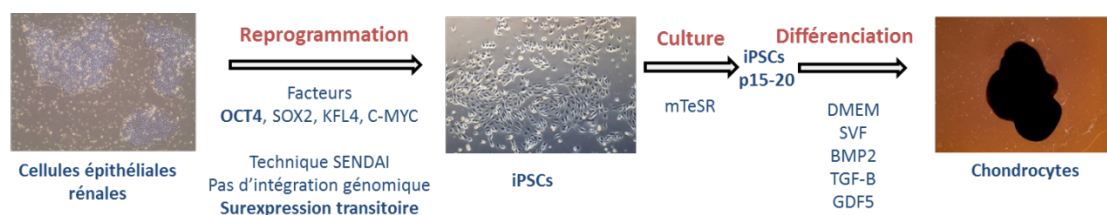


Figure 29 : Exemple de reprogrammation d'une cellule différenciée (cellule épithéliale rénale) en iPSC puis redifférenciée en chondrocyte. MTesR : exemple de milieu de culture pour iPSCs.

## II.2. Les iPSCs comme modèles d'étude des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale

Plusieurs équipes ont précédemment utilisé la reprogrammation de cellules somatiques en iPSCs pour établir un modèle cellulaire des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale. Les équipes de Nissim Benvenisty et Rudolph Leibel ont reprogrammé des iPSCs à partir de fibroblastes de patients présentant une délétion de l'allèle paternel de l'ICR de la région 15q11 impliquée dans le syndrome de Prader-Willi et ont montré que les anomalies de méthylation étaient maintenues lors de la reprogrammation en iPSCs (Burnett et al., 2016; Stelzer et al., 2014). Chamberlain *et al.* ont obtenu des neurones par redifférenciation d'iPSCs reprogrammés à partir de patients présentant une délétion de l'allèle maternel de l'ICR de la région 15q11 impliquée dans le syndrome d'Angelman et ont montré que les anomalies de méthylation de la région 15q11 étaient maintenues lors de la reprogrammation en iPSCs (Chamberlain et al., 2010). En 2020, Chang *et al.* ont reprogrammé pour la première fois des iPSCs à partir de fibroblastes de patients atteints de syndrome de Beckwith-Wiedemann par disomie uniparentale paternelle du chromosome 11 (Chang et al., 2020). Cette équipe a pu obtenir des iPSCs avec un gain de méthylation de l'ICR *IGF2/H19*:IG-DMR de la région 11p15, reproduisant ainsi l'anomalie épigénétique à l'origine de ce syndrome (Chang et al.,

2020). Aucune équipe n'a rapporté à l'heure actuelle la reprogrammation d'iPSCs à partir de patients avec un SRS ou un TS.

La majorité des publications portant sur la reprogrammation d'iPSCs à partir de cellules somatiques de patients atteints de maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale se concentrent sur la région soumise à empreinte responsable de la maladie, sans donner d'information concernant les niveaux de méthylation ou l'expression mono ou biallélique des gènes des autres régions soumises à empreinte parentale. Or, des premiers doutes sur le maintien de l'empreinte parentale lors de la reprogrammation ont été émis par Benvenisty *et al.* (Bar and Benvenisty, 2019a; Bar et al., 2017). En effet, cette équipe a mis en évidence dans certains clones d'iPSCs une expression biallélique de plusieurs gènes soumis à empreinte parentale, comme *H19* ou *KCNQ1OT1*, en lien avec des anomalies de méthylation des centres d'empreinte (Bar and Benvenisty, 2019a). Des analyses de RNA-seq dans des iPSCs ont montré une perte du caractère mono-allélique de l'expression d'un grand nombre de gènes soumis à empreinte parentale (Bar et al., 2017; Stadtfeld et al., 2010).

Les gènes soumis à empreinte parentale étant organisés en réseau, la dérégulation d'une région peut modifier l'expression des gènes d'une autre région de ce réseau. Il nous est donc paru essentiel de vérifier que les niveaux de méthylation des centres d'empreinte étaient équilibrés dans tous les centres d'empreinte parentale après reprogrammation des cellules somatiques de témoins en iPSCs. Nous avons donc mené une étude extensive des niveaux de méthylation des centres d'empreinte parentale dans des iPSCs témoins afin de nous assurer que les iPSCs constituaient un bon modèle cellulaire d'étude des maladies de l'empreinte parentale.

Cette étude a fait l'objet de la rédaction de l'article '**How to rescue methylation profile of imprinted control region in human induced pluripotent stem cells.** Pham A. *et al.*' qui sera soumis au journal '*Clinical Epigenetics*' après accord des différentes plateformes ayant participé à ce travail. En effet, ce volet du travail expérimental a fait l'objet d'une collaboration

avec les plateformes iPSCs de l'université de Nantes et de l'institut hospitalo-universitaire ICAN (institut de cardiométabolisme et nutrition, Sorbonne Université) pour la reprogrammation des iPSCs et la redifférenciation. Toutes les analyses moléculaires (analyse des niveaux de méthylation et de l'expression mono ou biallélique des gènes soumis à empreinte parentale) ont été effectuées au sein de notre laboratoire et ont constitué une partie majeure de mon travail expérimental. Une demande de brevet concernant le milieu de culture des iPSCs que nous avons mis au point au cours de ce travail expérimental est actuellement à l'étude.

**II.3. Article original en cours de relecture par l'équipe iPSCs de ICAN : How to rescue methylation profile of imprinted control region in human induced pluripotent stem cells**

PHAM A, SELENOU C, GIABICANI E, FONTAINE V, MARTEAU S, BRIOUDE F,  
DAVID L, MITANCHEZ D, SOBRIER ML\*, NETCHINE I\*.

\* contributions égales

1 **Rescue of the methylation profile of the imprinted control region in human induced pluripotent**  
2 **stem cells**

3 PHAM A<sup>1</sup>, SELENOU C<sup>2</sup>, GIABICANI E<sup>3</sup>, FONTAINE V<sup>4</sup>, MARTEAU S<sup>4</sup>, BRIOUDE F<sup>3</sup>, DAVID  
4 L<sup>5</sup>, MITANCHEZ D<sup>6</sup>, SOBRIER ML<sup>2\*</sup>, and NETCHINE I<sup>4\*</sup>.

5 1. Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand  
6 Trousseau, Service de Néonatalogie, 75012, Paris, France

7 2. Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, 75012, Paris, France

8 3. Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand  
9 Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, F-75012, Paris, France

10 4. Sorbonne Université, Institut de Cardiométabolisme et Nutrition, 75013 Paris, France

11 5. Université de Nantes, CHU Nantes, INSERM, Centre de Recherche en Transplantation et  
12 Immunologie, UMR 1064, ITUN, 44000 Nantes, France ; Université de Nantes, CHU Nantes,  
13 SFR Santé, FED 4203, INSERM UMS 016, CNRS UMS 3556, Nantes, France

14 6. Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, 75012, Paris, France ;  
15 Service de Néonatalogie, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, Tours, France

16 \* equal contribution

17 Corresponding author: irene.netchine@aphp.fr

18



19 **ABSTRACT**

20 **Background.** Parental imprinting is an epigenetic mechanism that leads to monoallelic expression of a  
21 subset of genes depending on their parental origin. Imprinting disorders (IDs), caused by disturbances  
22 of imprinted genes, are a set of rare congenital diseases that mainly affect growth and metabolism. To  
23 date, there is no accurate model to study the physiopathology of IDs or test therapeutic strategies. Human  
24 induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a promising cellular approach to model human diseases and  
25 complex genetic disorders. However, aberrant hypermethylation of imprinting control regions (ICRs)  
26 may appear during the reprogramming process and subsequent culture of iPSCs. Therefore, we tested  
27 various conditions of reprogramming and culture of iPSCs and performed an extensive analysis of  
28 methylation marks at the ICRs to develop a cellular model that can be used to study IDs.

29 **Results.** We assessed the methylation levels at eight imprinted loci in iPSCs before differentiation, at  
30 various passages of cell culture, and during chondrogenic differentiation. Abnormal methylation levels  
31 were found, with hypermethylation at 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR and 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR,  
32 independently of the reprogramming method and cells of origin. Hypermethylation at these two loci led  
33 to the loss of parental imprinting (LOI), with biallelic expression of the imprinted genes *IGF2* and *DLK1*,  
34 respectively. The addition of ascorbic acid (50 µg/mL) to the culture medium combined with culturing  
35 of the cells under hypoxic conditions prevented hypermethylation at *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) and  
36 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR, as well as at other imprinted loci.

37 **Conclusions.** An extensive and quantitative analysis of methylation levels of ICRs in iPSCs showed  
38 hypermethylation of certain ICRs in human iPSCs, especially paternally methylated ICRs, and  
39 subsequent LOI of certain imprinted genes. The addition of ascorbic acid to the culture medium and  
40 culturing of the cells under hypoxic conditions prevented hypermethylation of ICRs in iPSCs. As  
41 balanced methylation is maintained during the reprogramming and culture of iPSCs under these  
42 conditions, human iPSCs are a promising cellular model to study the physiopathology of IDs and test  
43 therapies in tissues of interest.

44 **Keywords:** induced pluripotent stem cells, imprinting disorders, parental imprinting, methylation,  
45 Silver-Russell syndrome, Temple syndrome, chondrogenic differentiation

46 **BACKGROUND**

47 Parental imprinting is an epigenetic mechanism that leads to the monoallelic expression of a subset of  
48 genes depending on their parental origin (1). Differential methylation of imprinting center regions  
49 (ICRs) is among the most studied mechanisms controlling such monoallelic expression. Imprinting  
50 disorders (IDs), caused by disturbances of imprinted genes, are a set of rare congenital diseases that  
51 mainly affect growth and metabolism (2). Silver-Russell syndrome (SRS, MIM#180860), characterized  
52 by intra-uterine and postnatal growth retardation (3), is one such rare disease. Loss of methylation at the  
53 *H19/IGF2:IG-DMR* (differentially methylated region) (also called ICR1) at chromosome 11p15 is the  
54 principal molecular anomaly identified in these patients. Other imprinting regions are involved in human  
55 IDs, such as 15q11-13 for Prader-Willi syndrome (PWS, MIM#176266) and 14q32 for Temple  
56 syndrome (TS, MIM#616222), leading to diseases with overlapping features, regardless of the genomic  
57 region affected (4).

58 The low expression of imprinted genes in human tissues available for biological research, such as  
59 leucocytes and fibroblasts, is a major bottleneck for studying IDs and testing therapies at the cellular  
60 level (5). In addition, tissues of interest in these diseases, such as cartilage, bone, liver, and brain, are  
61 not easily accessible. For all these reasons, many groups have attempted to develop cellular models to  
62 approach the mechanisms underlying the physiopathology of IDs (6–9).

63 Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a promising cellular approach to model human  
64 diseases and complex genetic disorders due to their ability to self-renew and to differentiate into all three  
65 germ layers in culture (10,11). Human iPSCs can be directly reprogrammed from somatic cells (12) and  
66 have been derived from patients with certain IDs (6,8,11,13,14). However, epigenetic modifications and  
67 the erasure of imprinting can appear during the reprogramming process and subsequent culture of iPSCs  
68 (7,9,10). Therefore, we extensively analyzed methylation marks at imprinted loci in iPSCs before and  
69 after adjustment of the culture medium to develop a cellular model of IDs with balanced methylation.

70

71

## 72 RESULTS

### 73 Cell culture for chondrogenic differentiation

74 Urine-derived iPSC clones were available from five controls (named C1 to C5). Three of the clones  
75 were cultured in chondrogenic differentiation medium (C1-3). The efficiency of chondrogenic  
76 differentiation is depicted in Figure 1, showing an increase in the quantitative expression of the specific  
77 markers *Aggrecan*, *COL2A1*, *COL10A1*, and *SOX9* at day 28 of differentiation.

### 78 Methylation of ICRs in urine-derived iPSCs and during chondrogenic differentiation

79 We studied methylation levels at eight imprinted loci in epithelial renal cells (ERCs) before iPSC  
80 reprogramming in five urine-derived iPSC clones (C1-5) at various passages of cell culture and in three  
81 of the clones (C1-3) during chondrogenic differentiation. Certain iPSC clones showed hypermethylation  
82 before chondrogenic differentiation at loci *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1), 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR,  
83 15q11 *PWS/AS*:DMR, and 20q13 *GNAS/NESP*:DMR. Methylation was normal for all the urine-derived  
84 iPSCs at 6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR, 7q12 *GRB10*:DMR, the 7q32 *MEST* promoter DMR, and 11p15  
85 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2) (Figure 2, Figure SD1, and Table SD2 in Supplementary Data). The  
86 methylation levels remained stable during and after chondrogenic differentiation. No clone showed  
87 balanced methylation at all loci (Figure 3).

### 88 Extensive analysis of the *IGF2/H19* imprinting control region

89 We studied the methylation profile of the *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) domain at six CTCF binding sites  
90 (CBS 1, 2, 3, 4, 5, 7) in the urine-derived iPSCs clones before chondrogenic differentiation (Figure 4).  
91 One clone (C1) was hypermethylated at all CBSs and the others were almost all normal at all CBSs,  
92 except at CBS2, for which all clones showed an abnormal and higher level of methylation.

### 93 Imprint relaxation

94 We identified polymorphisms in *IGF2* (rs3168310) and *DLK1* (rs1802710) in the genomic DNA of C1,  
95 allowing us to study the mono or biallelic expression of these imprinted genes. Both *IGF2* and *DLK1*  
96 showed biallelic expression (Figure 5), indicating a loss of imprinting (LOI) at these two loci.

### 97 Impact of the method and cell type on iPSC reprogramming

98 We studied the methylation levels at *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) in 10 iPSC clones from different  
99 somatic cells of origin reprogrammed by various methods and cultured in feeder-free medium. All iPSC  
100 clones showed aberrant hypermethylation at 11p15 ICR1, independently of the reprogramming method  
101 (mRNA transfection or episomal vector) or somatic cell of origin (skin fibroblast or peripheral blood  
102 mononuclear cells-PBMCs) (Figure 5).

### 103 **Impact of culture medium on methylation at imprinted loci**

104 As similar hypermethylation was observed independently of the cell type of origin and reprogramming  
105 method, we suspected the culture medium to have a major influence. We tested this hypothesis by adding  
106 ascorbic acid (50 µg/mL) to a classic culture medium for iPSCs (mTeSR) and culturing the iPSCs under  
107 conditions of hypoxia. We carried out the reprogramming experiments from PBMCs, which are easier  
108 to obtain, cultivate, and amplify than ERCs. We studied the methylation levels at *H19/IGF2*:IG-DMR  
109 (ICR1) and 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR (Figure 6 and Table SD4 in Supplementary Data), as well as  
110 in six other imprinted loci (Table SD4 and Figure SD5 in Supplementary Data) in three PBMC-derived  
111 iPSC clones. No clone displayed aberrant hypermethylation at any of the studied loci.

## 112 DISCUSSION

113 With the goal of developing a cellular model of IDs, we performed an extensive quantitative analysis of  
114 methylation levels of several ICRs to assess whether parental imprinting is maintained during the  
115 reprogramming and culture of human iPSCs. We found abnormal methylation levels at the two  
116 imprinted loci governed by a paternally methylated DMR in human feeder-free iPSCs derived from  
117 controls with no IDs, independently of the reprogramming method or somatic cell of origin.  
118 Hypermethylation at 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR and 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR led to the loss of  
119 parental imprinting, with biallelic expression of the imprinted genes *IGF2* and *DLK1*, respectively. We  
120 adjusted the culture medium with the addition of ascorbic acid to correct the aberrant methylation at  
121 these two ICRs. Analysis of the methylation of eight ICRs showed that the addition of ascorbic acid and  
122 culturing the cells under hypoxia prevented the hypermethylation of ICRs in iPSCs and, thus, offering  
123 a promising perspective to develop a human cellular model of ID.

124 Our results and those of several other previous studies suggest a trend towards hypermethylation of  
125 certain ICRs in human iPSCs when cultured in the absence of ascorbic acid, especially paternally  
126 methylated ICRs, and LOI of certain imprinted genes. Several groups have reported aberrant DNA  
127 methylation or LOI at 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR and 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR in mouse and  
128 human pluripotent stem cells, which persisted after differentiation into various cell types, but they  
129 focused exclusively on these two loci (10,15–17). We tested these and several other loci and found that  
130 imprinted genes governed by a paternally methylated DMRs appear to be more frequently affected by  
131 LOI in iPSCs than those controlled by a maternally methylated DMR (10). Bar and Benvenisty  
132 hypothesized that paternally imprinted methylated regions are more sensitive to aberrations during  
133 reprogramming due to different mechanisms for protecting imprinted regions from demethylation and  
134 *de novo* methylation in paternally versus maternally methylated regions (10). We thus studied the  
135 methylation profile at the *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) domain at six CBSs (CTCF binding sites) and  
136 found the highest level of methylation in the most distal CBS to the OCT4 and SOX2 binding sites  
137 (CBS2), which are known to protect the maternal allele against *de novo* methylation during early  
138 embryogenesis (18,19), consistent with the hypothesis of Bar and Benvenisty. On the other hand, several

139 groups have suggested that clones with aberrant hypermethylation are selected during the culture of  
140 iPSCs due to the upregulation of growth-promoting genes, such as *IGF2*, or the silencing of growth-  
141 restricting genes, which promote self-renewal, growth, and survival of iPSCs in culture (20,21).

142 In contrast to embryonic stem cells (ESCs), global hypermethylation of gDNA of the entire genome has  
143 been described in iPSCs at early passages (i.e., p3-p5), which then disappeared during subsequent  
144 passages (22–24). By contrast, we found that abnormal methylation in ICRs persisted during *in vitro*  
145 culture up to 43 passages and the differentiation of iPSCs. Recent studies in mouse and human iPSCs  
146 have suggested that DNA methylation of the genome in these cells is highly dynamic, cycling between  
147 *de novo* methylation and its erasure (25,26). However, such turnover was not observed in imprinted  
148 regions, which is consistent with our results (26).

149 Several iPSC models derived from patients with IDs have been described in the literature. For example,  
150 Chamberlain and Burnett derived iPSCs from patients with Prader-Willi syndrome due to a paternally  
151 inherited deletion of chromosome 15q11-q13 and Chang et al. derived iPSCs from patients with  
152 Beckwith-Wiedemann syndrome with paternal uniparental disomy of chromosome 11. In these studies,  
153 human iPSCs derived from controls and patients showed the same methylation patterns as the fibroblast  
154 lines from which they were derived (6–8). However, the authors studied neither methylation levels in  
155 patient and control iPSCs in other ICRs nor mono- or biallelic expression of imprinted genes, and their  
156 results are not in accordance with those of other studies. Indeed, Okuno et al. demonstrated that a fully  
157 methylated status for chromosome 15q11 in fibroblasts could be reversed to a partially unmethylated  
158 status in at least some of the iPSCs after reprogramming (27), and Nazor et al. demonstrated a loss of  
159 methylation at the 15q11 locus in a subset of control iPSC lines (28). As imprinted genes are co-  
160 regulated and organized in an imprinted-gene network (IGN), abnormal methylation at one locus can  
161 modify the expression of imprinted genes of other imprinted loci, even if the methylation of the  
162 corresponding ICR is not affected (4,29–33). This is why the level of methylation at all ICRs has to be  
163 studied in iPSCs derived from patients with IDs.

164 With the addition of ascorbic acid during the culture of human iPSCs under hypoxia, we prevented  
165 aberrant methylation of ICRs. Stadtfeld et al. have shown that ascorbic acid treatment can efficiently  
166 protect the 14q32 imprinted region from LOI during the derivation of mouse iPSCs (34). They suggested  
167 that ascorbic acid may prevent the loss of H3K4 methylation at the maternal IG-DMR during  
168 reprogramming and then prevent the recruitment of Dnmt3a, which is essential for 14q32  
169 *MEG3/DLKI*:IG-DMR DNA hypermethylation. However, they did not examine the methylation levels  
170 at other ICRs. Moreover, although it has long been accepted that hypoxia enhances the generation of  
171 iPSCs (35), its combination with ascorbic acid has never been reported. Our extensive and quantitative  
172 analysis of ICR methylation levels in iPSCs derived from controls and cultured with the addition of  
173 ascorbic acid and under hypoxia showed balanced methylation at all loci.

174 Here, we report, for the first time, an extensive analysis of methylation levels of several ICRs involved  
175 in human IDs in iPSCs. Because of the organization of imprinted loci in an IGN, the level of methylation  
176 needs to be studied at all imprinted loci before using iPSCs as a cellular model of IDs. We show that the  
177 culture of iPSCs under hypoxia prevents aberrant hypermethylation of ICRs in iPSCs derived from  
178 controls. However, we have yet to study methylation levels in iPSCs derived from patients with IDs.

179

## 180 **CONCLUSIONS**

181 Through an extensive and quantitative analysis of the methylation levels of ICRs in iPSCs, we found  
182 hypermethylation of certain ICRs in human iPSCs, particularly paternally methylated ICRs, and  
183 subsequent LOI of certain imprinted genes. The addition of ascorbic acid during the culture of iPSCs  
184 under hypoxia prevented the hypermethylation of ICRs. As balanced methylation is maintained during  
185 the reprogramming and culture of iPSCs in the presence of ascorbic acid, human iPSCs are a promising  
186 cellular model to study the physiopathology of IDs and test therapies, after differentiation, in tissues of  
187 interest. Further studies are needed to assess the levels of methylation of ICRs in iPSCs derived from  
188 controls with the addition of ascorbic acid and culturing of the cells under hypoxia. As imprinted genes  
189 are organized in an IGN, methylation levels need to be studied in ICRs involved in imprinting diseases  
190 before using iPSCs as a cellular model of IDs.

## 191 **METHODS**

### 192 **Human urine-derived iPSC reprogramming**

193 Urine-derived iPSCs from controls were kindly provided by SFR-SANTE, iPSC core facility, INSERM,  
194 CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, France.

195 *Isolation of ERCs (epithelial renal cells) and reprogramming.* Urine samples were collected and ERCs  
196 isolated by the iPSC core facility (INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, France) from urine  
197 samples and cultures, as previously described (36). Briefly, cells were seeded on Matrigel-coated wells  
198 on day -1 in their usual culture media and transfected daily, from day 0 to day 10, with 625 ng of an  
199 mRNA cocktail (38% Oct4, 11.4% Sox2, 12.7% Klf4, 10.1% Lin28, 12.7% Myc, 10.1% Nanog, 5.1%  
200 nGFP, Milenyi Biotec) in Pluriton media (Reprocell, Glasgow, G20 0XA  
201 United Kingdom) supplemented with 4 ng/ml FGF2 (Peprotech, Neuilly sur Seine, France) and 200  
202 ng/ml B18R (eBioscience, ThermoFisher scientific). From day 11, cells were cultured in Pluriton media  
203 supplemented with 4 ng/ml FGF2. Colonies were picked and expanded on feeders in KSR + FGF2 media  
204 or directly on Matrigel-coated dishes in TeSR1 or iPS Brew. The expression of pluripotency genes  
205 (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) was verified by qPCR (Figure SD6 and Table SD7 in Supplementary Data). Assays  
206 were performed to assess the ability of each iPSC clone to differentiate into the three germ line lineages  
207 (36). The karyotype of each iPSC cell line was normal.

### 208 **iPSC culture**

209 Human urine-derived iPSCs were initially cultured in feeder-free KSR medium (DMEM/F-12, 20%  
210 Knockout™ serum replacement, 1% non-essential amino acids, 1% Glutamax, 50 μM 2-  
211 mercaptoethanol, and 10 ng/ml fibroblast growth factor 2 [Peprotech Neuilly sur Seine, France]) at the  
212 iPSC core facility (INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, France). They were mechanically  
213 passaged by cutting colonies with a needle. All cells were cultured at 37°C under 20% O<sub>2</sub> and 5%CO<sub>2</sub>.  
214 Then, iPSCs were cultured at the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN, F-75013 Paris,  
215 France). Colonies were picked and expanded in mTeSR1 (Stemcell technologies, Vancouver, BC,  
216 Canada) on Matrigel matrix-coated plates. The iPSCs were passed manually once a week using a Lynx



217 microscope (Vision Engineering, New Milford, CT, USA) and the culture medium was changed daily.  
218 The cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>.

### 219 **Chondrogenic differentiation**

220 Chondrogenic differentiation of iPSCs was performed using a published protocol (37). Briefly, iPSCs  
221 were subjected to differentiation by changing the medium to a mesendodermal differentiation medium  
222 (DMEM/F12 with 10 ng/ml Wnt3a [R&D Systems], 10 ng/ml Activin A [R&D], 1% ITS [Invitrogen],  
223 1% FBS [Invitrogen]) (day 0). At day 3, the medium was changed to basal medium (DMEM with 1%  
224 ITS and 1% FBS) supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid (Nacalai), 10 ng/ml BMP-2 (Osteapharma),  
225 10 ng/ml GDF5, 10 ng/ml TGFβ (Peprotech), and 10 ng/ml FGF-2. Fourteen days after starting the  
226 differentiation of the iPSCs (day 14), the cartilaginous nodules were physically separated from the  
227 bottom of the dishes to form particles, which were then transferred to a suspension culture in 3.5-cm  
228 petri dishes. To increase proliferation, 50 µg/ml ascorbic acid (Nacalai), 10 ng/ml BMP-2  
229 (Osteapharma), 10 ng/ml GDF5, and 10 ng/ml TGFβ (Peprotech) was added to the chondrogenic  
230 medium from day 3 to day 14. The medium was changed to conventional medium (DMEM with 10%  
231 FBS) on day 42. The medium was changed every 2 to 7 days.

### 232 **Human fibroblast-derived iPSCs and PBMC-derived iPSC reprogramming**

233 Fibroblast- or PMBC-derived iPSCs were kindly provided by the Institute of Cardiometabolism and  
234 Nutrition (ICAN, F-75013 Paris, France) or the iPSC core facility (INSERM, CNRS, UNIV Nantes,  
235 CHU Nantes, France) after reprogramming by various methods (episomal vector, mRNA transfection)  
236 as previously described (36,38,39).

### 237 **Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture and reprogramming with ascorbic acid**

238 After the recuperation of PBMCs, they were allowed to proliferate for seven days in blood medium  
239 (StemPro34 SFM medium with 100 µg/mL SCF, 100 µg/mL FLT3, 100 µg/mL IL3, 100 µg/mLIL6,  
240 and 54 U/µL EPO). For reprogramming, 2 x 10<sup>5</sup> cells were cultured in 24-well plates with a virus  
241 cocktail using the Sendai 2.0 CytoTuneiPS reprogramming kit (Life Technologies) for 24 h in 5% CO<sub>2</sub>,  
242 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>. The virus was removed (centrifugation at 300 x g for 7 min) and the cells transferred

243 to 12-well plates in 1 ml blood media. After three days in culture, the cells were transferred to matrix  
244 gel-coated plates. At seven days post-transduction, the cells were cultured in mTeSR1 medium and half-  
245 was renewed daily. Fifteen days post-transduction, the iPSC clones appeared, were picked, and cultured  
246 in mTeSR1 complemented with ascorbic acid (50 µg/ml).

#### 247 **Immunofluorescence staining**

248 iPSCs were cultured in four-well culture slides (Corning) for three days and then fixed in  
249 paraformaldehyde (4%) and permeabilized in blocking/permeabilization buffer (2% BSA, 0.5% Triton-  
250 X-100 in PBS) for 45 min and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in  
251 blocking/permeabilization buffer. The cells were washed three times in PBS and incubated with Alexa-  
252 conjugated secondary antibodies and DAPI, both diluted 1:1000 in blocking/permeabilization buffer,  
253 for 45 min at room temperature. The images were acquired using an epifluorescence microscope  
254 (Eclipse TE300, Nikon, Amsterdam, the Netherlands). The following antibodies were used: rabbit anti-  
255 Nanog (#4903S, 1:200, Cell Signaling-Ozyme, Beverly, MA, USA), rabbit anti-Oct4 (#3576-100,  
256 1:200, Biovision, Cliniscience, Mountain View, CA, USA), rabbit anti-Sox2 (#AB5603, 1:200,  
257 Millipore, Ballerica, MA, USA), mouse anti-Tra-1-60 (#MAB4360, 1:100, Millipore), mouse anti-Tra-  
258 1-81 (#MAB4381, 1:100, Millipore), and mouse anti-SSEA4 (#sc-21704, 1:100, Santa Cruz, Dallas,  
259 TX, USA) (Figure SD6).

#### 260 **Karyotype analysis**

261 Conventional cytogenetic studies on cell cultures at passage 20 were performed by Trousseau Hospital  
262 to verify chromosomal integrity. Fifteen metaphases were analyzed (Figure SD6).

#### 263 **Embryoid body formation and scorecard**

264 Generated iPSCs were grown on Matrigel, dispensed into small clumps with a cell scraper, and  
265 cultured in suspension for 10 days in TeSR-E6 medium (Stemcell). At day 8, RNA was isolated from  
266 the embryoid bodies (Ambion). A scorecard kit (Life Technologies) was used to evaluate the gene  
267 expression of the three germ layers. The scorecard plate was analysed using a StepOneplus™ system  
268 real time PCR (Life Technologies) (Figure SD6).

269 **Alkaline phosphatase**

270 AP activity was measured using an AP detection kit (Sigma Aldrich) and performed following the  
271 manufacturer's instructions.

272 **RNA extraction and reverse transcription**

273 RNA was extracted from iPSCs before and on days 7, 14, 21, 28, and 74 of chondrogenic differentiation.  
274 Total RNA was extracted using the NucleoSpin miRNA Kit for the isolation of small and large RNA  
275 (Macherey-Nagel, France). Both DNA and RNA were quantified using a DS-11 spectrophotometer  
276 (DeNovix). cDNA was synthesized from total RNA using the miScript PCR System (Qiagen, France)  
277 and used for quantitative PCR.

278 **Quantitative expression of chondrogenic differentiation-specific markers**

279 Quantitative expression of chondrogenic differentiation-specific markers (*Aggrecan*, *COL2A1*,  
280 *COL10A1*, *SOX9*) was assessed for all samples using SyBR Select Master Mix (Applied Biosystems,  
281 ThermoFisher Scientific) and a Light Cycler LC480 instrument (Roche LifeSciences). The primers are  
282 listed in Table SD8 in Supplementary Data.

283 **DNA extraction**

284 DNA was extracted from iPSCs before and on days 7, 14, 21, 28, and 74 of chondrogenic differentiation  
285 using an in-house protocol after cell lysis by a salting-out procedure, as previously described (40,41).

286 **Bisulfite treatment of DNA**

287 Sodium bisulfite treatment of DNA converts all unmethylated cytosine residues to uracil residues. The  
288 methylated cytosine residues are unaffected. This process thus generates C/T polymorphisms, which  
289 can be used to distinguish between the methylated and unmethylated allele. Genomic DNA (400 ng)  
290 was treated with sodium bisulfite using the EZ DNA Methylation Lighting kit (Zymo Research, USA),  
291 according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was eluted using 40 µl RNase-free H<sub>2</sub>O  
292 and conserved at -20°C.

293 **TaqMan allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR)**  
294 **and methylation analysis.**

295 The methylation status of seven imprinted loci (eight DMRs: 6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR, 7q12  
296 *GRB10*:DMR, 7q32 *MEST* promoter DMR, 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1), 11p15  
297 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2), 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR, 15q11 *PWS/AS*:DMR, 20q13  
298 *GNAS/NESP*:DMR) were assessed by ASMM RTQ-PCR, as previously described (42). The  
299 methylation index (MI) at each locus was assigned by calculating the ratio between the methylated and  
300 unmethylated alleles as follows: (amount of methylated allele/sum of both methylated and unmethylated  
301 alleles) x 100. The ASMM RTQ-PCR primers and probe sequences are provided in Supplementary  
302 Methods (Table SD9).

303 **gDNA and cDNA sequencing**

304 To assess the mono or biallelic expression of imprinted genes, two single nucleotide polymorphisms  
305 from the *H19* (rs217727) and *DLK1* (rs1802710) gDNA and cDNA were sequenced by standard Sanger  
306 sequencing by Eurofins Genomics (Germany). The primers used for gDNA and cDNA amplification  
307 and sequencing are provided in Supplementary Methods (Table SD10). The sequencing products were  
308 then analyzed using Sequencing Analysis 5.2.

309 **Statistics**

310 Data in the figures are presented as means. All graphs were generated and statistical analysis  
311 performed using GraphPad Prism 6 (USA) or Excel.

312

313 **ACKNOWLEDGEMENTS**

314 We thank the « Association Française des Familles ayant un enfant atteint du Syndrome Silver-  
315 Russell » (AFIF).

316 This study received a grant funding from Pfizer (project ID-STEM) and a collaborative grant funding  
317 from the Agence Nationale de la Recherche (project “IMP-REGULOME”, ANR-18-CE12-0022-02).

318 AP thanks « Fondation pour la Recherche Médicale » (FRM) which awarded her a scholarship.

319 We thank Sandra Chantot-Bastaraud for karyotype analysis.

320

321 **DECLARATIONS**

322 **Ethical approval and consent to participate**

323 All experiments were carried out in accordance with French guidelines and regulations. All controls  
324 gave informed consent. The reprogramming of control samples was approved by the French Ministry  
325 of Higher Education and Research, under No. DC-2011-1399.

326 **Availability of data and materials**

327 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding  
328 author on reasonable request.

329 **Competing interests**

330 The authors declare that they have no competing interests

331

332• **REFERENCES**

333 1. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like  
334 growth factor II gene. *Cell*. 1991 Feb 22;64(4):849–59.

335 2. Eggermann T, Perez de Nanclares G, Maher ER, Temple IK, Tümer Z, Monk D, et al.  
336 Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes  
337 affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics*. 2015;7:123.

338 3. Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, O’Connell SM, Salem J, Bliiek J, et al. Diagnosis  
339 and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev*

- 340 Endocrinol. 2017;13(2):105–24.
- 341 4. Abi Habib W, Brioude F, Azzi S, Rossignol S, Linglart A, Sobrier M-L, et al. Transcriptional  
342 profiling at the *DLK1/MEG3* domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci Adv.*  
343 2019 Feb;5(2):eaau9425.
- 344 5. Abi Habib W, Brioude F, Azzi S, Rossignol S, Linglart A, Sobrier M-L, et al. Transcriptional  
345 profiling at the *DLK1/MEG3* domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci Adv.*  
346 2019;5(2):eaau9425.
- 347 6. Burnett LC, LeDuc CA, Sulsona CR, Paull D, Eddiry S, Levy B, et al. Induced pluripotent  
348 stem cells (iPSC) created from skin fibroblasts of patients with Prader-Willi syndrome (PWS) retain  
349 the molecular signature of PWS. *Stem Cell Res.* 2016;17(3):526–30.
- 350 7. Chamberlain SJ, Chen P-F, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, et al.  
351 Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi  
352 syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 12;107(41):17668–73.
- 353 8. Chang S, Hur SK, Naveh NSS, Thorvaldsen JL, French DL, Gagne AL, et al. Derivation and  
354 investigation of the first human cell-based model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Epigenetics.*  
355 2020 Dec 29;1–11.
- 356 9. Grybek V, Aubry L, Maupetit-Méhouas S, Le Stunff C, Denis C, Girard M, et al. Methylation  
357 and transcripts expression at the imprinted *GNAS* locus in human embryonic and induced pluripotent  
358 stem cells and their derivatives. *Stem Cell Reports.* 2014 Sep 9;3(3):432–43.
- 359 10. Bar S, Benvenisty N. Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *EMBO J.* 2019  
360 17;38(12).
- 361 11. Chamberlain SJ, Li X-J, Lalande M. Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of  
362 human neurogenetic disorders. *Neurogenetics.* 2008 Oct;9(4):227–35.
- 363 12. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell.* 2012  
364 Jun 14;10(6):678–84.
- 365 13. Germain ND, Levine ES, Chamberlain SJ. iPSC Models of Chromosome 15Q Imprinting  
366 Disorders: From Disease Modeling to Therapeutic Strategies. *Adv Neurobiol.* 2020;25:55–77.
- 367 14. Sabitha KR, Shetty AK, Upadhyaya D. Patient-derived iPSC modeling of rare  
368 neurodevelopmental disorders: Molecular pathophysiology and prospective therapies. *Neuroscience &*  
369 *Biobehavioral Reviews.* 2021 Feb 1;121:201–19.
- 370 15. Bar S, Schachter M, Eldar-Geva T, Benvenisty N. Large-Scale Analysis of Loss of Imprinting  
371 in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 2017 02;19(5):957–68.
- 372 16. Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, et al. Aberrant silencing  
373 of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010 May  
374 13;465(7295):175–81.
- 375 17. Takikawa S, Ray C, Wang X, Shamis Y, Wu T-Y, Li X. Genomic imprinting is variably lost  
376 during reprogramming of mouse iPS cells. *Stem Cell Res.* 2013 Sep;11(2):861–73.

- 377 18. Abi Habib W, Azzi S, Brioude F, Steunou V, Thibaud N, Das Neves C, et al. Extensive  
378 investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site  
379 defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol*  
380 *Genet.* 2014 Nov 1;23(21):5763–73.
- 381 19. Demars J, Shmela ME, Rossignol S, Okabe J, Netchine I, Azzi S, et al. Analysis of the  
382 IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-  
383 binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet.* 2010 Mar  
384 1;19(5):803–14.
- 385 20. Barroca V, Lewandowski D, Jaracz-Ros A, Hardouin S-N. Paternal Insulin-like Growth Factor  
386 2 (Igf2) Regulates Stem Cell Activity During Adulthood. *EBioMedicine.* 2017 Feb;15:150–62.
- 387 21. Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T,  
388 et al. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in  
389 vitro. *Nature.* 2007 Aug 30;448(7157):1015–21.
- 390 22. Nishino K, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells.  
391 *Hum Cell.* 2016 Jul;29(3):97–100.
- 392 23. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, et al.  
393 DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 2011  
394 May;7(5):e1002085.
- 395 24. Tesarova L, Simara P, Stejskal S, Koutna I. The Aberrant DNA Methylation Profile of Human  
396 Induced Pluripotent Stem Cells Is Connected to the Reprogramming Process and Is Normalized  
397 During In Vitro Culture. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157974.
- 398 25. Rulands S, Lee HJ, Clark SJ, Angermueller C, Smallwood SA, Krueger F, et al. Genome-  
399 Scale Oscillations in DNA Methylation during Exit from Pluripotency. *Cell Syst.* 2018 Jul 25;7(1):63-  
400 76.e12.
- 401 26. Shipony Z, Mukamel Z, Cohen NM, Landan G, Chomsky E, Zeliger SR, et al. Dynamic and  
402 static maintenance of epigenetic memory in pluripotent and somatic cells. *Nature.* 2014 Sep  
403 4;513(7516):115–9.
- 404 27. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, et al. Changeability of  
405 the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a  
406 patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto).* 2017 Jul;57(4):96–103.
- 407 28. Nazor KL, Altun G, Lynch C, Tran H, Harness JV, Slavin I, et al. Recurrent variations in  
408 DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell.*  
409 2012 May 4;10(5):620–34.
- 410 29. Gabory A, Ripoche M-A, Le Digarcher A, Watrin F, Ziyyat A, Forné T, et al. H19 acts as a  
411 trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development.* 2009  
412 Oct;136(20):3413–21.
- 413 30. Monnier P, Martinet C, Pontis J, Stancheva I, Ait-Si-Ali S, Dandolo L. H19 lncRNA controls  
414 gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013  
415 Dec 17;110(51):20693–8.

- 416 31. Patten MM, Cowley M, Oakey RJ, Feil R. Regulatory links between imprinted genes:  
417 evolutionary predictions and consequences. *Proc Biol Sci.* 2016 Feb 10;283(1824).
- 418 32. Stelzer Y, Sagi I, Yanuka O, Eiges R, Benvenisty N. The noncoding RNA IPW regulates the  
419 imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. *Nat*  
420 *Genet.* 2014 Jun;46(6):551–7.
- 421 33. Whipple AJ, Breton-Provencher V, Jacobs HN, Chitta UK, Sur M, Sharp PA. Imprinted  
422 Maternally Expressed microRNAs Antagonize Paternally Driven Gene Programs in Neurons. *Mol*  
423 *Cell.* 2020 02;78(1):85-95.e8.
- 424 34. Stadtfeld M, Apostolou E, Ferrari F, Choi J, Walsh RM, Chen T, et al. Ascorbic acid prevents  
425 loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally  
426 differentiated B cells. *Nat Genet.* 2012 Mar 4;44(4):398–405, S1-2.
- 427 35. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation  
428 of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009 Sep 4;5(3):237–41.
- 429 36. Gaignerie A, Lefort N, Rousselle M, Forest-Choquet V, Flippe L, Francois-Campion V, et al.  
430 Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming. *Sci*  
431 *Rep.* 2018 25;8(1):14363.
- 432 37. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation  
433 of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015 Mar  
434 10;4(3):404–18.
- 435 38. Jeziorowska D, Fontaine V, Jouve C, Villard E, Dussaud S, Akbar D, et al. Differential  
436 Sarcomere and Electrophysiological Maturation of Human iPSC-Derived Cardiac Myocytes in  
437 Monolayer vs. Aggregation-Based Differentiation Protocols. *Int J Mol Sci [Internet].* 2017 Jun 1 [cited  
438 2021 Jan 11];18(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485997/>
- 439 39. Fontaine V, Duboscq-Bidot L, Jouve C, Hamlin M, Curjol A, Briand V, et al. Generation of  
440 iPSC line from MYH7 R403L mutation carrier with severe hypertrophic cardiomyopathy and isogenic  
441 CRISPR/Cas9 corrected control. *Stem Cell Res.* 2021 Apr;52:102245.
- 442 40. Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, et al. Analysis of the  
443 methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and  
444 prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2001 Jun;9(6):409–18.
- 445 41. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from  
446 human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- 447 42. Azzi S, Steunou V, Rousseau A, Rossignol S, Thibaud N, Danton F, et al. Allele-specific  
448 methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR), a powerful method for  
449 diagnosing loss of imprinting of the 11p15 region in Russell Silver and Beckwith Wiedemann  
450 syndromes. *Hum Mutat.* 2011 Feb;32(2):249–58.



452 **TABLE WITH LEGEND**

453 **Table 1.** Methylation index at 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) of 10 iPSC clones (C6-C15). C6-C12  
454 were reprogrammed from skin fibroblasts and C13-C15 from peripheral blood mononuclear cells  
455 (PBMCs). The reprogramming of somatic cells into iPSCs was carried out using mRNA transfection  
456 (C6-C11) or an episomal vector (C12-C15).

Clone	Somatic cells of origin	Technic of reprogramming	11p15 ICR1 MI (%)
C6	Skin fibroblast	mRNA transfection	96
C7	Skin fibroblast	mRNA transfection	80
C8	Skin fibroblast	mRNA transfection	70
C9	Skin fibroblast	mRNA transfection	68
C10	Skin fibroblast	mRNA transfection	89
C11	Skin fibroblast	mRNA transfection	66
C12	Skin fibroblast	Episomal vector	67
C13	PBMC	Episomal vector	64
C14	PBMC	Episomal vector	67
C15	PBMC	Episomal vector	68

457

458

459

460 **FIGURE LEGENDS**

461 **Figure 1.** Quantitative expression of chondrogenic markers in iPSCs by qPCR at day 28 of their  
462 chondrogenic differentiation (C1-d28, C2-d28, C3-d28). Mature chondrocytes were used as positive  
463 controls. C: clone, d: day, FC: fold change

464 **Figure 2.** Methylation levels of five iPSC clones (C1-5) at (a) 11p15 *H19/IGF2:IG-DMR* (ICR1) and  
465 (b) 14q32 *DLK1/MEG3:IG-DMR* (IG-DMR). D: day, MI: methylation index, p: passage, ERC:  
466 epithelial renal cells

467 **Figure 3.** Methylation levels of three iPSC clones (C1-3) at (a) 11p15 *H19/IGF2:IG-DMR* (ICR1) and  
468 (b) 14q32 *DLK1/MEG3:IG-DMR* (IG-DMR) before (D0), during (D7-D28), and after (D74)  
469 chondrogenic differentiation). D: day, MI: methylation index

470 **Figure 4.** Extensive investigation of methylation levels at *H19/IGF2:IG-DMR* (ICR1) in urine-derived  
471 iPSCs. The methylation index was studied at six CTCF binding sites. MI: methylation index, Cbs: CTCF  
472 binding site

473 **Figure 5.** Electropherograms of genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA) for one  
474 clone (Clone 1) carrying polymorphisms in *IGF2* (*rs3168310*) and *DLK1* (*rs1802710*), allowing the  
475 analysis of allelic-type expression of these genes.

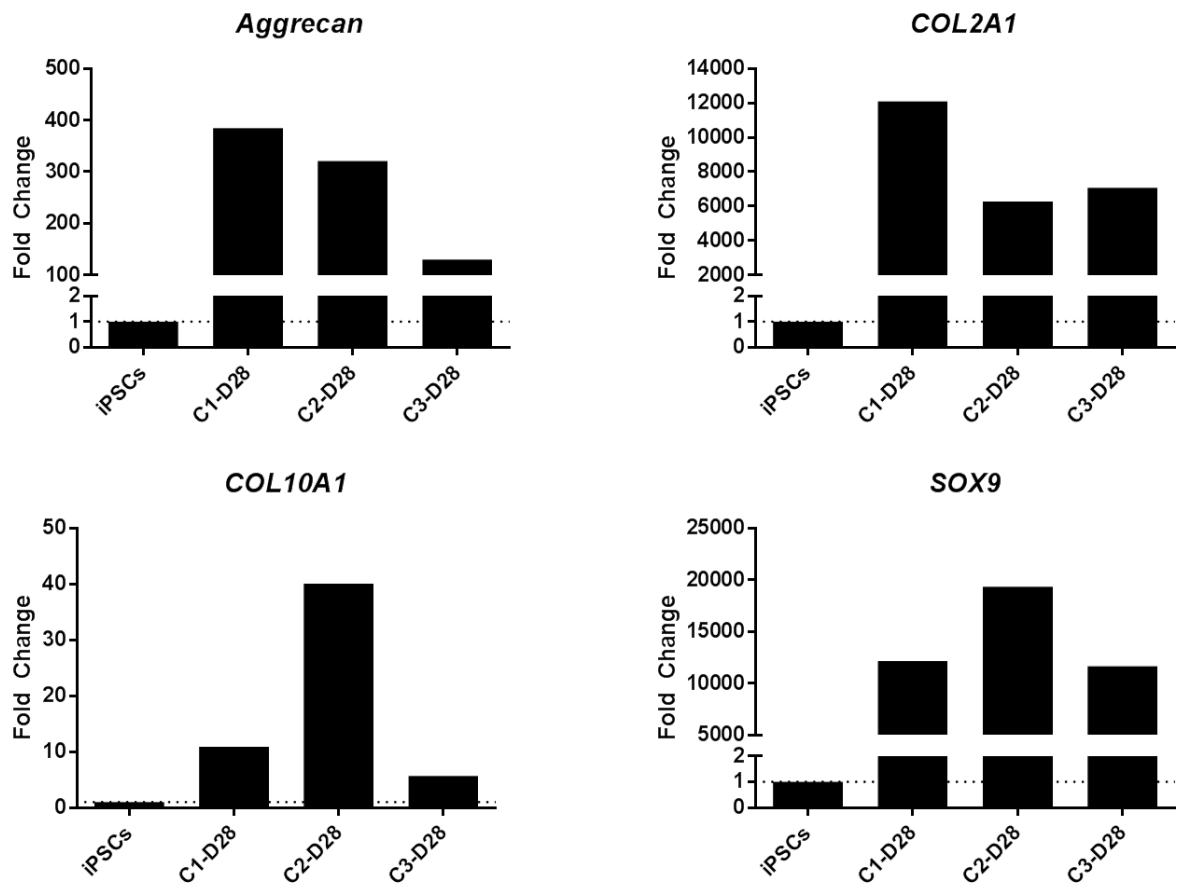
476 **Figure 6.** Methylation levels of three PBMC-derived iPSC clones cultured with addition of ascorbic  
477 acid in the culture medium at (a) 11p15 *H19/IGF2:IG-DMR* (ICR1) and (b) 14q32 *DLK1/MEG3:IG-*  
478 *DMR* (IG-DMR). D: days, MI: methylation index, p: passage

479

480 **Figure 1.** Quantitative expression of chondrogenic markers in chondrogenic iPSCs by qPCR at day 28  
481 of differentiation (C1-d28, C2-d28, C3-d28). C: clone, d: day

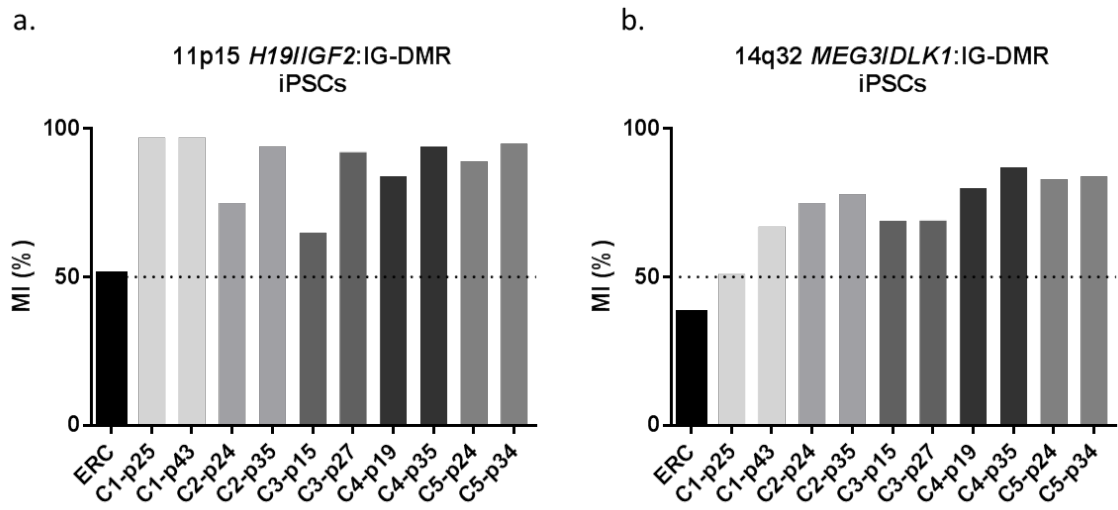
482

483



484

485 **Figure 2.** Methylation levels of five iPSC clones (C1-5) at (a) 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR and (b) 14q32  
486 *DLK1/MEG3*:IG-DMR. D: day, MI: methylation index, p: passage, ERC: epithelial renal cells



487

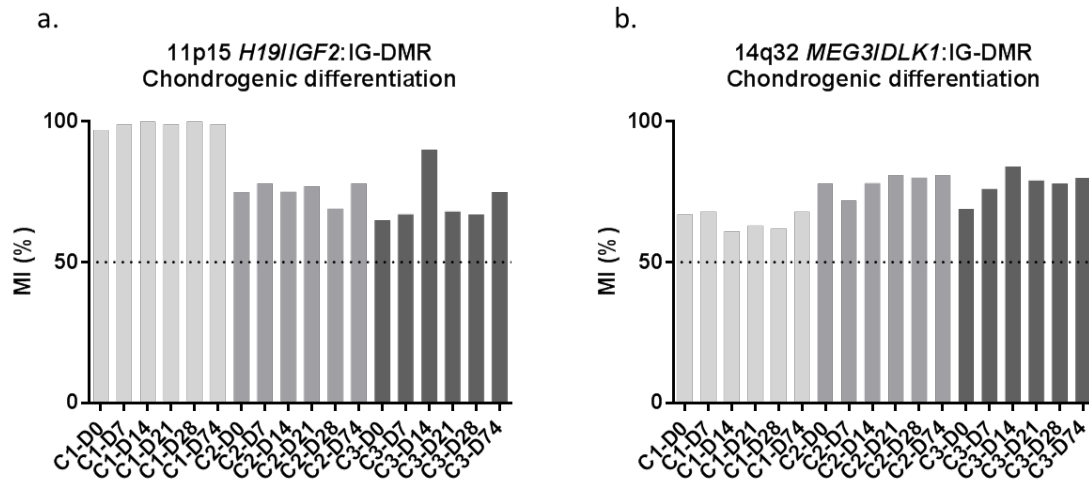
488

489

490

491 **Figure 3.** Methylation levels of three iPSC clones (C1-3) at (a) 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR and (b) 14q32  
 492 *DLK1/MEG3*:IG-DMR before (D0), during (D7-D28), and after (D74) chondrogenic differentiation. D:  
 493 day, MI: methylation Index

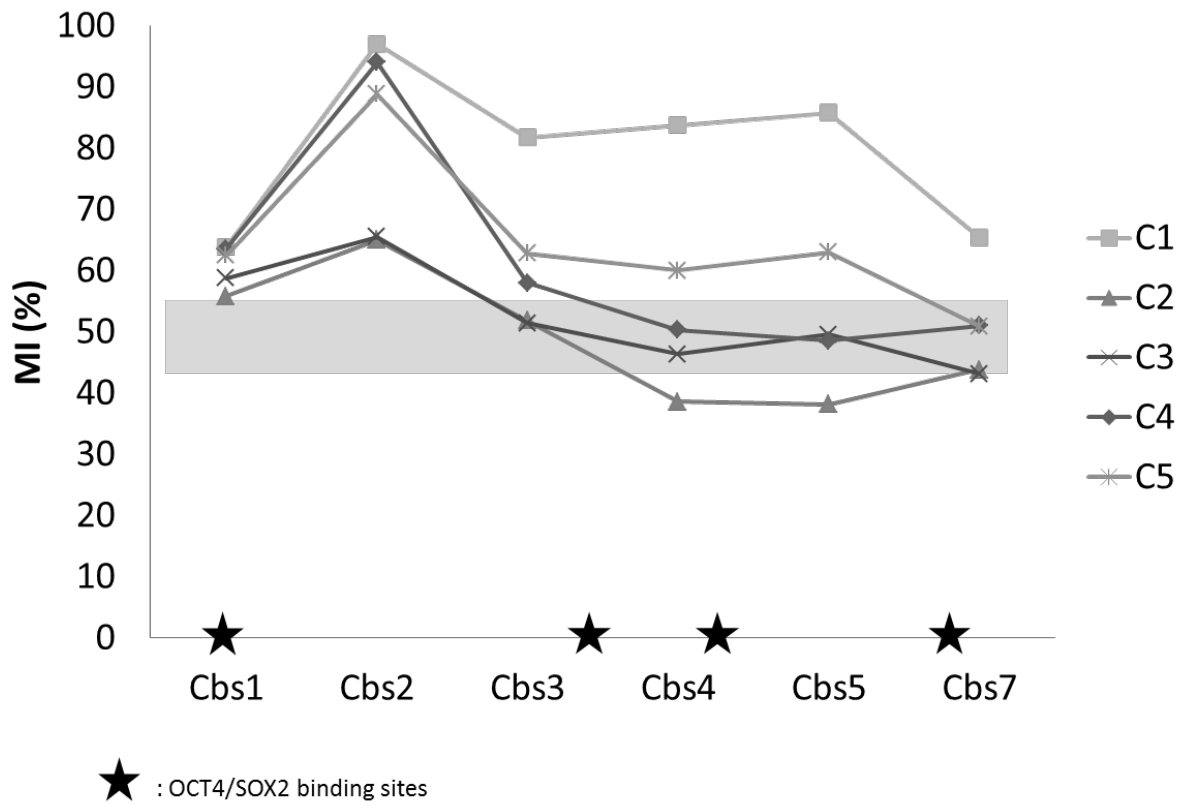
494



495

496

497 **Figure 4.** Extensive investigation of methylation levels at the 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR in urine  
498 derived iPSCs. The methylation index was studied at six CTCF binding sites. MI: methylation index,  
499 Cbs: CTCF binding site



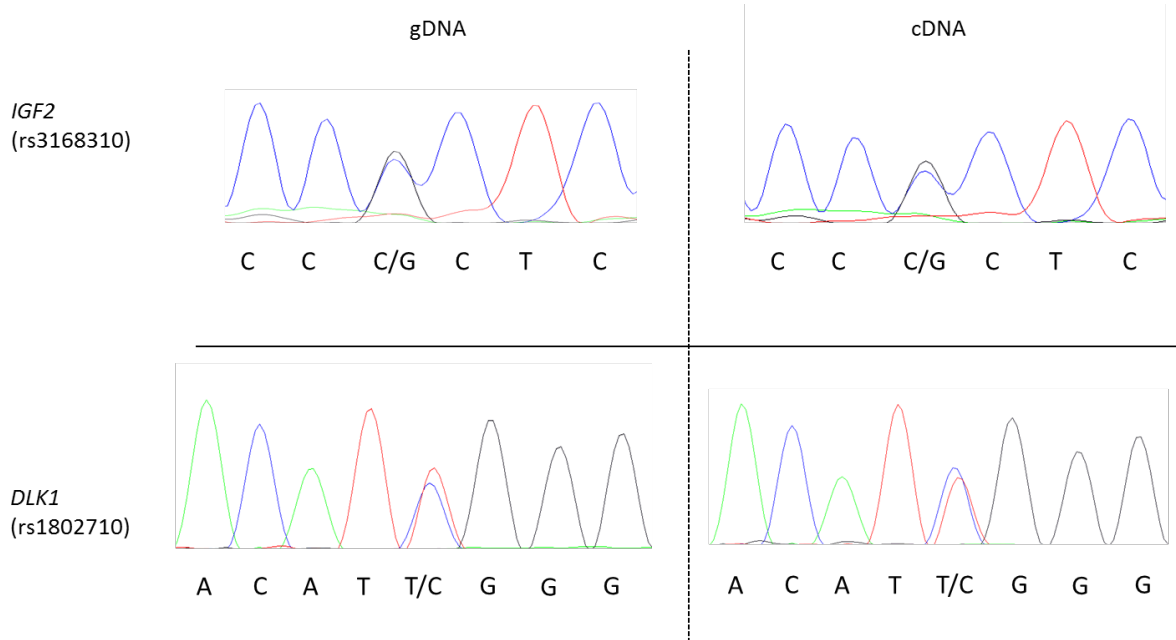
500

501

502 **Figure 5.** Electropherograms of genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA) for one clone  
503 (Clone 1) carrying polymorphisms in *IGF2* (rs3168310) and *DLK1* (rs1802710), allowing the analysis of  
504 allelic-type expression of these genes.

505

506

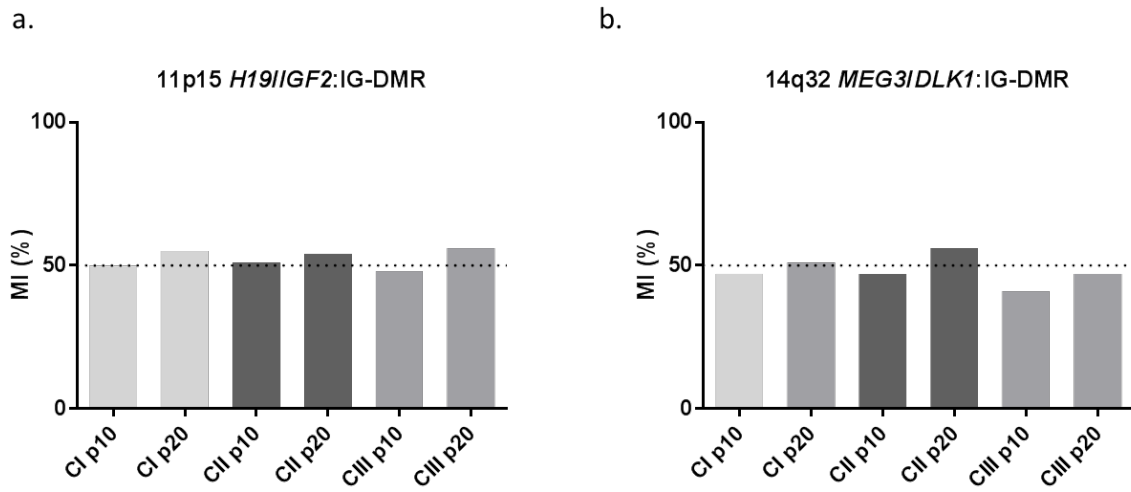


507

508

509 **Figure 6.** Methylation levels of three PBMC-derived iPSC clones cultured with the addition of ascorbic  
510 acid to the culture medium at (a) 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) and (b) 14q32 *DLK1/MEG3*:IG-DMR.  
511 D: day, MI: methylation index, p: passage

512



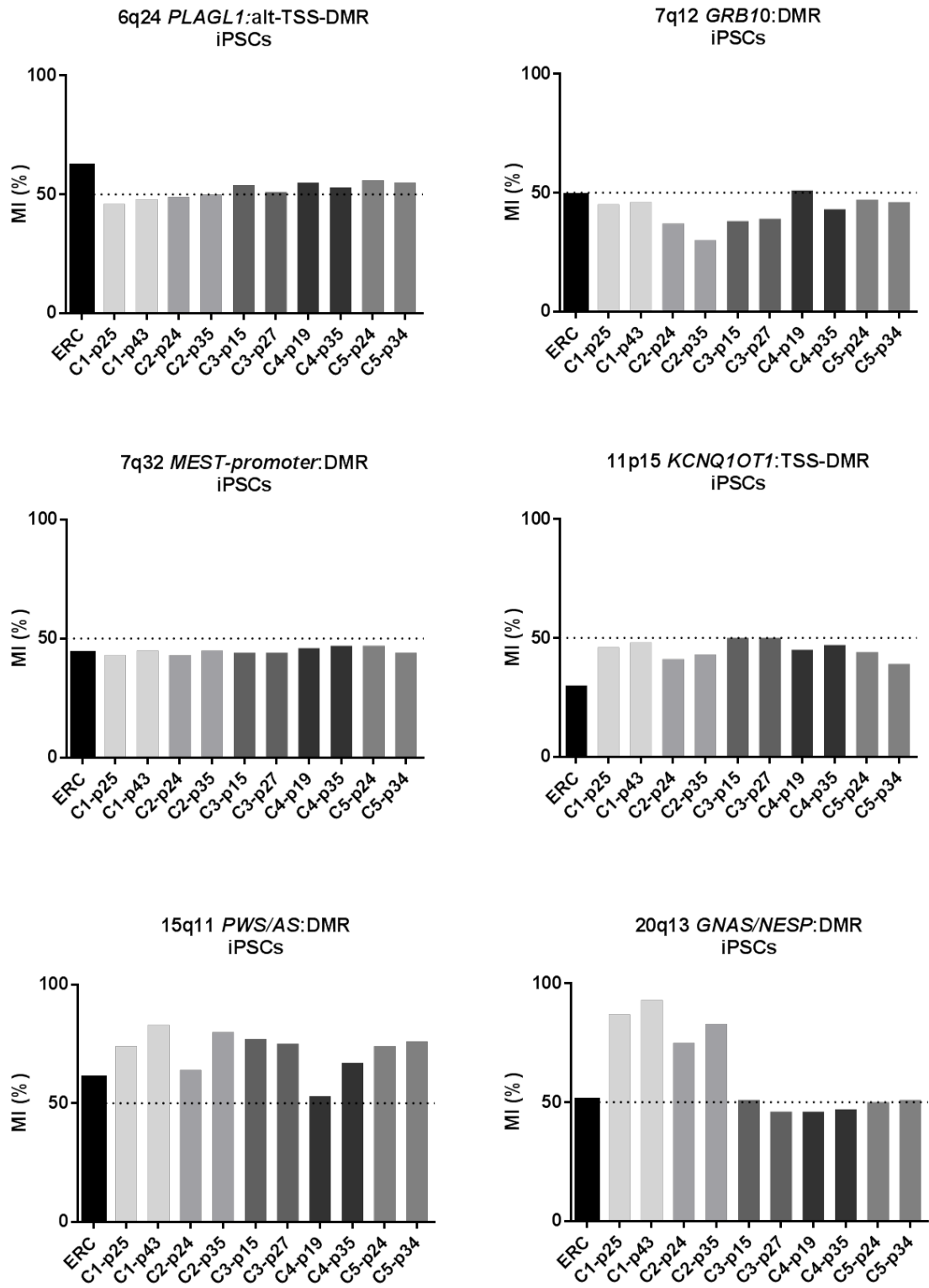
513

514



515 **SUPPLEMENTARY RESULTS**

516 **Figure SD1.** Methylation levels of five iPSC clones (C1-5) at 6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR, 7q12  
 517 *GRB10*:DMR, 7q32 *MEST* promoter DMR, 11p15 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR, 15q11 *PWS/AS*:DMR, and  
 518 20q13 *GNAS/NESP*:DMR. D: day, MI: methylation index. p: passage, ERC: epithelial renal cells



520 **Table SD2.** Methylation index at eight imprinting loci in one epithelial renal cell (ERC) clone and five  
 521 iPSC clones (C1-C5). iPSC clones were reprogrammed from ERCs using mRNA transfection and initially  
 522 cultured in feeder-free KSR medium and then mTESR medium without the addition of ascorbic acid.

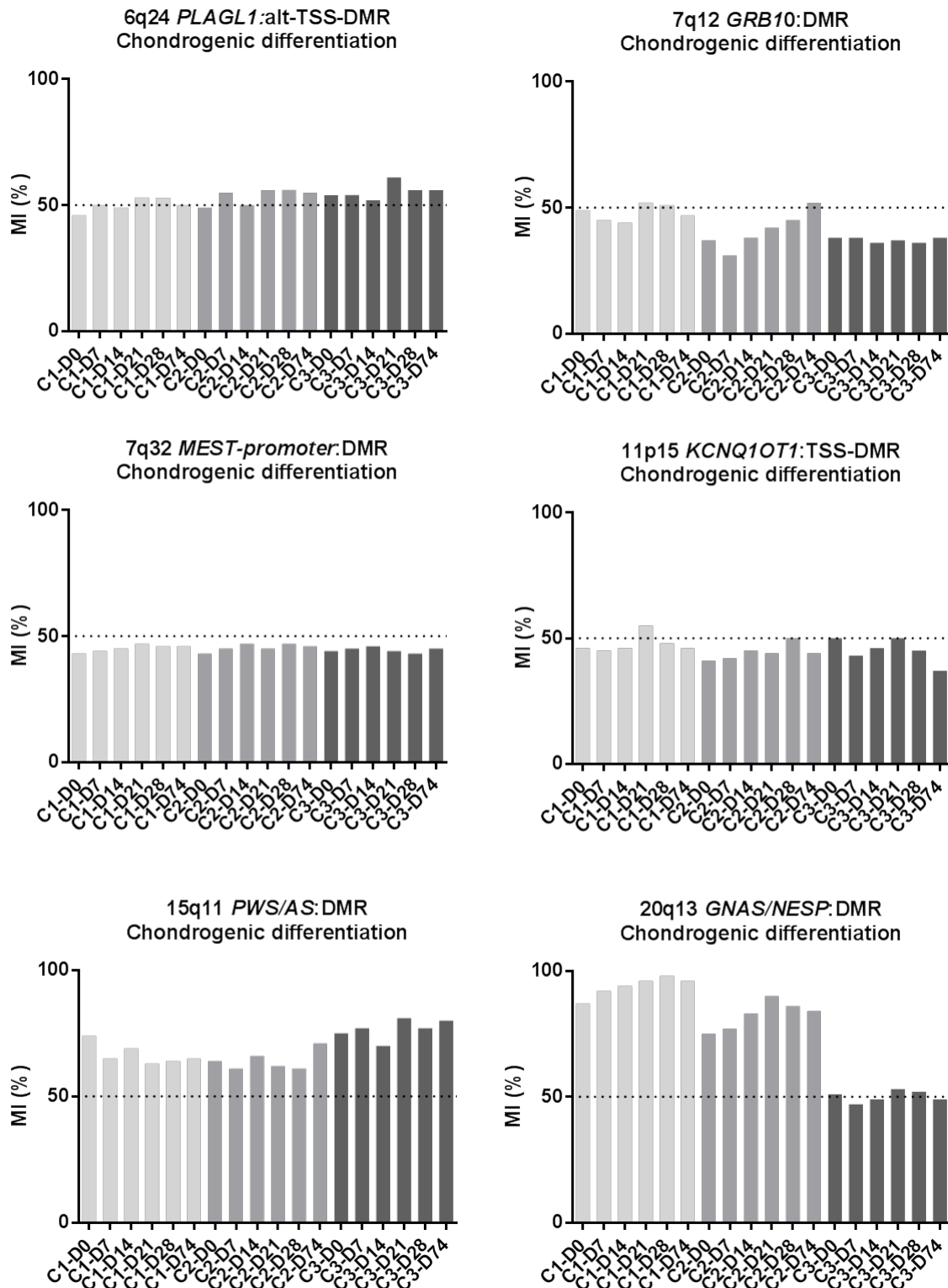
	11p15 ICR1	11p15 ICR2	14q32 IG-DMR	7p12 GRB10	7q32 MEST	15q11 PWS/AS	6q24 PLAGL1	20q13 GNAS- NESP
ERC	51	30	38	49	44	61	62	51
C1-p25	97	46	51	45	43	74	46	87
C1-p43	97	48	67	46	45	83	48	93
C1-D7	99	45	68	45	44	65	50	92
C1-D14	100	46	61	44	45	69	49	94
C1-D21	99	55	63	52	47	63	53	96
C1-D28	100	48	62	51	46	64	53	98
C1-D74	99	46	68	47	46	65	50	96
C2-p24	75	41	75	37	43	64	49	75
C2-p35	94	43	78	30	45	80	50	83
C2-D7	78	42	72	31	45	61	55	77
C2-D14	75	45	78	38	47	66	50	83
C2-D21	77	44	81	42	45	62	56	90
C2-D28	69	50	80	45	47	61	56	86
C2-D74	78	44	81	52	46	71	55	84
C3-p15	65	50	69	38	44	77	54	51
C3-p27	90	50	69	39	44	75	51	46
C3-D7	67	43	76	38	45	77	54	47
C3-D14	90	46	84	37	46	70	52	49
C3-D21	68	50	79	36	44	81	61	53
C3-D28	67	45	78	37	43	77	56	52
C3-D74	75	37	80	38	45	80	56	49
C4-p19	84	45	80	51	46	53	55	46
C4-p35	94	47	87	43	47	67	53	47
C5-p24	89	44	83	47	47	74	56	50
C5-p34	95	39	84	46	44	76	55	51

523

524

525 **Figure SD3.** Methylation levels of three urine-derived iPSC clones (C1-3) at 6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR,  
 526 7q12 *GRB10*:DMR, 7q32 *MEST* promoter DMR, 11p15 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2), 15q11  
 527 *PWS/AS*:DMR, and 20q13 *GNAS/NESP*:DMR before (D0), during (D7-D28), and after (D74)  
 528 chondrogenic differentiation. D: day, MI: methylation index

529



530

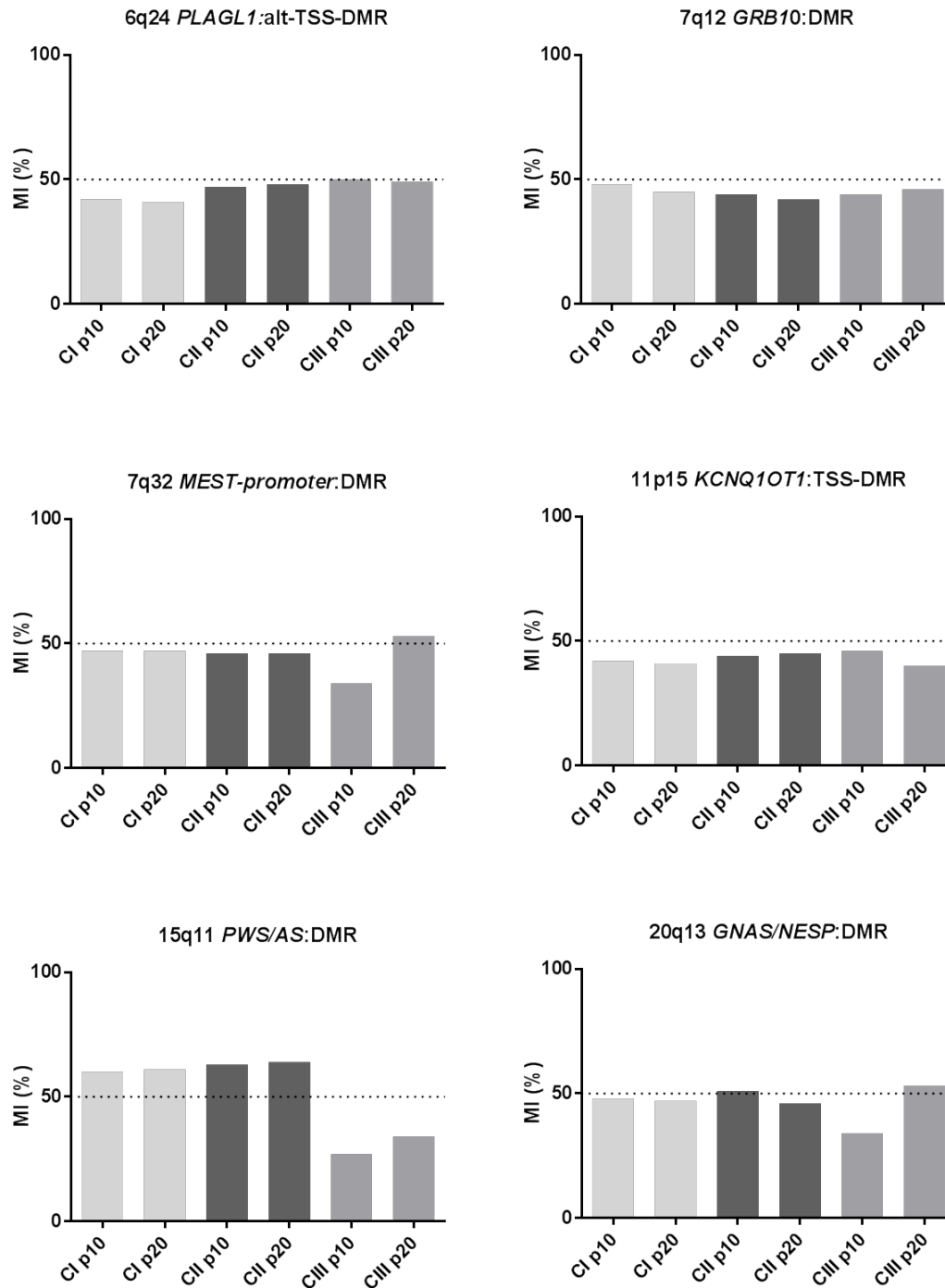
531 **Table SD4.** Methylation index at eight imprinting loci in three iPSC clones. Clones 1, 7, and 14 were  
532 reprogrammed from PBMCs using episomal vectors with the addition of ascorbic acid to the culture  
533 medium.

	<b>11p15 ICR1</b>	<b>11p15 ICR2</b>	<b>14q32 IG-DMR</b>	<b>7q32 MEST</b>	<b>7q12 GRB10</b>	<b>6q24 PLAGL1</b>	<b>15q11 AS-PW</b>	<b>20q13 NESP</b>
Clone 1 p10	50	42	47	47	48	42	60	48
Clone 1 p20	55	41	51	47	45	41	61	47
Clone 7 p10	51	44	47	46	44	47	63	51
Clone 7 p20	54	45	56	46	42	48	64	46
Clone 14 p10	48	46	41	34	44	50	27	34
Clone 14 p20	56	40	47	53	46	49	34	53

534

535

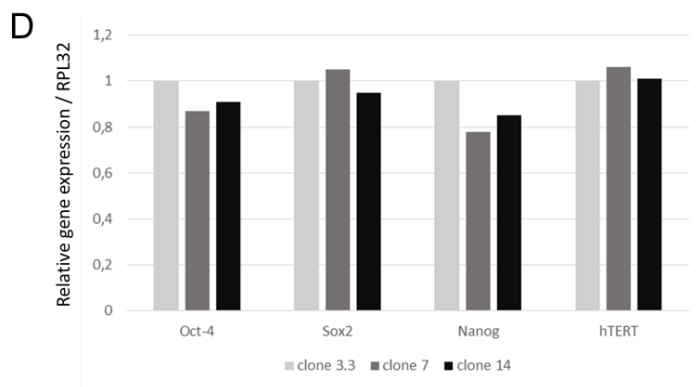
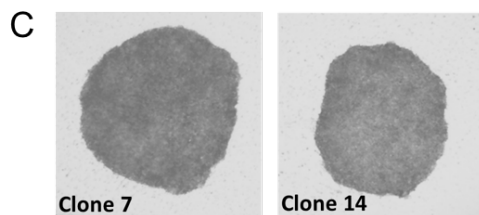
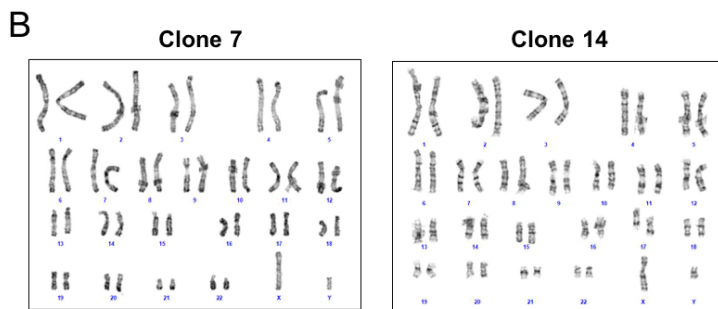
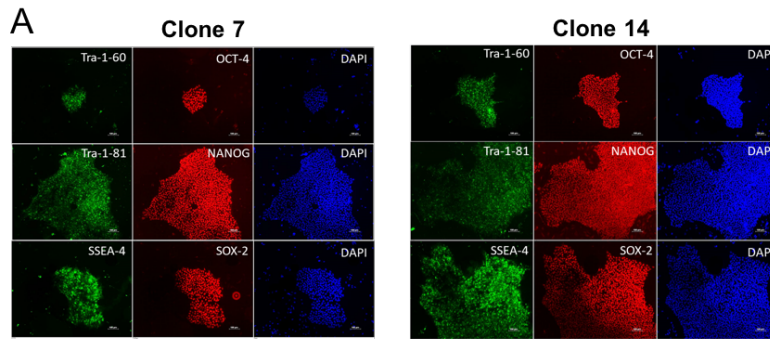
536 **Figure SD5.** Methylation levels of three PBMC-derived iPSC clones cultured with the addition of  
 537 ascorbic acid to the culture medium at 6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR, 7q12 *GRB10*:DMR, 7q32 *MEST*  
 538 promoter DMR, 11p15 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2), 15q11 *PWS/AS*:DMR, and 20q13 *GNAS/NESP*:DMR.  
 539 MI: methylation index, p: passage



540

541

542 **Figure SD6.** Pluripotency of iPSC control cell lines and karyotype. A. Immunostaining of iPSCs with  
 543 antibodies directed against the pluripotency markers NANOG, OCT4, SOX2 (red), TRA1-60, TRA1-81,  
 544 and SSEA-4 (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). B. Normal karyotyping of cell lines. C. Positive  
 545 alkaline phosphatase staining. D. RT-PCR showing the expression of the pluripotency genes of clones 7  
 546 and 14 relative to a control iPSC cell line. E. Scorecards. TM analysis assessing pluripotency and  
 547 trilineage differentiation.



**E**

Sample Name	Self-renewal	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
Clone 7	-5,19	1,93	2,24	2,,04
Clone 14	-3,38	1,64	2,87	2,46

549 **SUPPLEMENTARY METHODS**

550 **Table SD7. Primer sequences for pluripotent genes.**

551 F: forward, R: reverse

Gene	Primer F	Primer R
OCT-4	GTACTCCTCGGTCCCTTTCC	CAAAAACCCTGGCACAAACT
Sox2	TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA	CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC
Nanog	CTCCAACATCCTGAACCTCAGC	CGTCACACCATTGCTATTCTTCG
hTERT	CCTGGGTGGCACGGCTTTTGTC	CAGCCTTGAAGCCGCGGTTGA
RPL32	AGTTCCTGGTCCACAACGTC	GTGACTCTGATGGCCAGTTG

552

553 **Table SD8. Primer sequences for qPCR of chondrogenic differentiation-specific markers**

554 F: forward, R: reverse

Gene	Primers
<i>Aggrecan</i>	F : AGGCAGCGTGATCCTTACC
	R : GGCCTCTCCAGTCTCATTCTC
<i>COL2A1</i>	F : CGTCCAGATGACCTTCTACG
	R : TGAGCAGGGCCTTCTTGAG
<i>COL10A1</i>	F : GCAACTAAGGGCCTCAATGG
	R : CTCAGGCATGACTGCTTGAC
<i>SOX9</i>	F : TGGGCAAGCTCTGGACACTTC
	R : ATCCGGGTGGTCTTCTCTG
<i>RPLP2</i>	F : GCACACTGACTACAGCCTTGA
	R : TACCAGGTTTGGAGGTGTG

555

556 **Table SD9. Primer and probe sequences for ASMM RTQ-PCR**

557 F: forward, R: reverse, M: methylated allele, UM: unmethylated allele

Locus	Primers	Probes
11p15 H19/IGF2:IG-DMR ICR1	F : GTTTTATATTATAGTTTAAAGTGYTTTTAGTTGAGGT	M : ACGTAACCCGAAACGT
	R : TCCATAAATATTCTATCCCTCACTACC	UM : CTTACATAACCCAAAACATT
11p15 KCNQ1OT1:TSS-DMR ICR2	F : GGGTTAGTTTTTGYGTGATGTGTTT	M : ATAGCGGTCGTATTTGATAT
	R : ACCTCCACACCRAAAACCCA	UM : TGTGTGAGGATAGTGTTGT
14q32 MEG3/DLK1:IG-DMR	F : AGTTTTATGTTAAGATGTTAATTATTTTTGGA	M : TAGTTCGCGTTTCGTTAT
	R : ACCAAAAACCTAACAAATCAAAACA	UM : TAGTAGTTTGTGGTTTGTAT
7q32 MEST promoter DMR	F : GTATTAGGGTGAGATTAGGGTTATTATGG	M : TATTACGACGATTTCCGG
	R : AAATATCACTCCTACCCRAATAAAAT	UM : AAATTTATTATGATGATTTT
7q12 GRB10:DMR	F : GGTTGTAATTTTAGTTTTYGAGGGATTG	M : ACGGAGTAGCGTTCCGGT
	R : CRTACATAAATTTAATCCTAAAATTCCTAT	UM : ATGGAGTAGTGTGGTTTTT
15q11 PWS/AS:DMR	F : GATTTTGAGYGGTGTATAGTTTAGGTT	M : AACGCATTTACTACGAAC
	R : TCCTATAACCTCCACAACRCAC	UM : TAACACATTTACTACAAACCA
6q24 PLAGL1:alt-TSS-DMR	F : AYGGGTTGAATGATAATGGTAGATGT	M : CCGTTCGACTCCCGA
	R : AACCCCAACRCCTCCTC	UM : CACCATTCCAACTCCCAAA
20q13 GNAS/AB:DMR	F : AGTAGGGGAGGTTTTGTATTTTTATYGTA	M : TCGTAAATAATTCGAATTCGGT
	R : TCCTTACCTCCAACCACCCAC	UM : TTGGTGGGTGTGTGTTGT
20q13 GNAS/NESP:DMR	F : TGTTTGGGAGAGGATAGAGGAGA	M : AGTTCGCGTTCCGA
	R : ACCCCACCTCCTTACTACACA	UM : TGTGAAGTTGTGTGTTTGA

558 **Table SD10. Primers used for gDNA and cDNA amplification and sequencing** F: forward, R:  
559 reverse

<b>Primer</b>	<b>5' Sequence 3'</b>
H19-ex1F	CAGTCACCCGGCCCAGAT
H19-ex1R	AAGACACCATCGGAACAGCA
H19-ex4-5R	GCTCTGGAAGGTGAAGCTAG
H19-ex5-F2	AGGCCGTCTCCACA ACTCC
DLK1-ex5-F	TGCGTGGATGATGAGGGC
DLK1-ex5R	CTTGACAGACACTCGTAGC
DLK1-ex4-5F	TGATCAACGGCTCCCCCTGC

560

561

562



## II.4. Conclusions

L'analyse des niveaux de méthylation des clones d'iPSCs témoins a montré une hyperméthylation au niveau des centres d'empreinte *H19/IGF2*:IG-DMR (11p15) et *MEG3/DLK1*:IG-DMR (14q32) qui sont normalement uniquement méthylés sur l'allèle paternel. Les centres d'empreinte *H19/IGF2* :IG-DMR en 11p15 et *MEG3/DLK1* :IG-DMR en 14q32 sont les seuls centres d'empreinte parentale méthylés dans tous les tissus sur l'allèle paternel chez l'humain. Les régions habituellement méthylées uniquement sur l'allèle maternel ont des niveaux de méthylation normaux (6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR, 7q12 *GRB10*:DMR, 7q32 *MEST*:promoteur-DMR et 11p15 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR) dans les iPSCs étudiées. Cette hyperméthylation des iPSCs en 11p15 et 14q32 semble indépendante de la technique de reprogrammation et du type cellulaire à l'origine de la reprogrammation en iPSCs. Cette hyperméthylation persiste après redifférenciation des iPSCs en chondrocytes, cardiomyocytes ou cellules épithéliales rénales. Les cellules différenciées conservent des niveaux de méthylation équivalents à ceux de l'iPSCs ayant servi à la différenciation. À des stades très précoces de la reprogrammation (passages P3 et P5 de la reprogrammation), les iPSCs semblent avoir une méthylation normale. Cependant, les iPSCs ne peuvent être redifférenciées en cellules d'intérêt à des passages si précoces du fait de leur instabilité (les iPSCs nécessitent au moins une dizaine de passages avant de pouvoir être différenciées).

Nos résultats rejoignent les données récentes de la littérature en faveur d'une relaxation de l'empreinte des iPSCs dans des régions normalement méthylées uniquement sur l'allèle paternel (Bar and Benvenisty, 2019b). Plusieurs équipes ont tenté de corriger ces anomalies de méthylation. Stadtfeld *et al.* ont montré que l'ajout de vitamine C (acide ascorbique) dans le milieu de culture d'iPSCs reprogrammées à partir de cellules somatiques murines modifie l'action de l'ADN methyltransférase Dnmt3a et permet de corriger au moins partiellement les anomalies de méthylation constatées en 14q32 (Stadtfeld *et al.*, 2012). Cependant, Stadtfeld *et*

*al.* n'ont pas montré de correction des anomalies de méthylation dans les autres régions soumises à empreinte parentale, notamment dans la région 11p15, avec l'ajout d'acide ascorbique (Stadtfeld et al., 2012). Nous avons montré au cours de ce travail expérimental que l'ajout d'acide ascorbique dans le milieu de culture des iPSCs associé à une culture en hypoxie permet de prévenir la survenue d'une hyperméthylation des ICRs étudiés. L'hypoxie améliore l'efficacité de la culture cellulaire des iPSCs (Yoshida et al., 2009). En revanche, son rôle dans le maintien de l'empreinte parentale n'avait jamais été documenté auparavant.

Velychko *et al.* ont également tenté de corriger les anomalies de méthylation par reprogrammation de cellules somatiques murines en iPSCs en réexprimant uniquement trois facteurs de pluripotence habituellement utilisés pour la reprogrammation en iPSCs (c-Myc, Klf4, Sox2) sans surexpression de Oct4 (Velychko et al., 2019). Velychko *et al.* ont réussi à reprogrammer des iPSCs avec ces trois facteurs de pluripotence sans Oct4. L'analyse non quantitative de la méthylation des clones obtenus a montré un niveau de méthylation normale de la DMR secondaire du promoteur de *Meg3* et de plusieurs autres loci soumis à empreinte mais les auteurs ne donnent pas d'information concernant la DMR primaire *Meg3/Dkl1*:IG-DMR ni du centre d'empreinte *H19/Igf2*:IG-DMR. Enfin, la reprogrammation sans Oct4 est techniquement difficile et présente un rendement très faible (Velychko et al., 2019).

L'étude de Velychko *et al.* renforce l'hypothèse d'un rôle très important d'Oct4 dans la survenue des anomalies de méthylation des iPSCs contrôles. En l'absence de surexpression transitoire d'Oct4 lors de la reprogrammation des iPSCs, les niveaux d'expression d'Oct4 endogènes atteignent en quelques jours dans les iPSCs reprogrammées avec seulement trois facteurs de pluripotence des niveaux d'expression comparables à ceux obtenus habituellement par la surexpression exogène de Oct4 dans les clones reprogrammés avec les quatre facteurs. Le rôle d'Oct4 dans la mise en place de la méthylation est mal connu mais il a été rapporté dans des modèles murins une modulation du niveau d'expression de l'ADN méthyltransferase

Dnmt1 et une modulation de l'effet du facteur CTCF par Oct4 (Weth and Renkawitz, 2011). En conditions physiologiques, CTCF se fixe sur le centre d'empreinte *H19/Igf2*:IG-DMR et engendre une modification de la conformation chromatinienne, prévenant ainsi la méthylation de l'allèle maternel (Sakaguchi et al., 2013; Zimmerman et al., 2013). En pathologie humaine, des délétions emportant des sites de fixation d'OCT4 et des mutations ponctuelles de ces sites de fixation ont été décrites chez des patients présentant un gain de méthylation en 11p15 (Abi Habib et al., 2014; Beygo et al., 2013; Demars et al., 2010).

Nous avons montré lors de l'étude des niveaux de méthylation des différents CBS du centre d'empreinte *H19/IGF2*:IG-DMR que les niveaux de méthylation étaient plus élevés à distance des sites de fixation d'OCT4. Nous formulons l'hypothèse que le niveau d'expression d'*OCT4* et son maintien à un niveau d'expression élevé au cours de la reprogrammation et de la culture *in vitro* a un impact sur la protection de l'allèle maternel contre la méthylation.

### **III. Étude d'un deuxième modèle cellulaire : les cellules souches pluripotentes mésenchymateuses de la pulpe dentaire**

Les premiers résultats des études portant sur les iPSCs ayant révélé un niveau de méthylation aberrant des centres d'empreinte parental, nous avons étudié un second modèle cellulaire en parallèle des différents essais de mise au point des milieux de culture des iPSCs.

Un modèle de différenciation de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes issues de la pulpe dentaire (Dental Pulp Stem Cells, DPSC) en ostéoblastes a été développé en collaboration avec le laboratoire du Pr Catherine Chaussain (Gronthos et al., 2000). Les DPSCs issues des dents permanentes et les SHED (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth) issues de la pulpe des dents temporaires sont des cellules souches mésenchymateuses mises en évidence dans les années 2000 (Gronthos et al., 2000). Elles ont la capacité à être différenciées en de nombreux types cellulaires. Ce modèle d'étude a l'avantage d'être non invasif car il est possible de récupérer les dents extraites lors du soin (pour encombrement dentaire par exemple, fréquemment présent chez les patients avec un SRS ou lors de l'avulsion de dents de sagesse). Ce projet collaboratif a été mené entre les deux laboratoires : culture et différenciation cellulaire réalisée au sein du laboratoire du Pr Catherine Chaussain par le Docteur Eloïse Giabicani à l'occasion de son post-doctorat, et analyses moléculaires des niveaux de méthylation et de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale réalisées au sein de notre laboratoire par moi-même.

Ce travail collaboratif a fait l'objet de la rédaction de l'article '**From dental pulp stem cell to osteogenic differentiation : new insight in parental imprinting. Pham A. et al.**' soumis au journal '*International Journal of Oral Science* », accepté sous réserve de modifications mineures (resoumis).

**III.1. Article original soumis à ‘*International Journal of Oral Science*’, accepté sous réserve de modifications mineures (resoumis) : From dental pulp stem cell to osteogenic differentiation : new insight in parental imprinting.**

Aurélie Pham \*, Eloïse Giabicani\*, Marie-Laure Sobrier, Caroline Andrique, Julie Lesieur, Virginie Steunou, Agnès Linglart, Anne Poliard, Catherine Chaussain and Irène Netchine.

\*Co-first authors

## **Title: Dental pulp stem cells as a promising model to study imprinting diseases**

**Running title:** Dental pulp stem cells to study imprinting defects

**Authors :** Eloïse Giabicani<sup>1,2\*¤</sup>, Aurélie Pham<sup>2\*¤</sup>, Céline Sélénou<sup>2</sup>, Marie-Laure Sobrier<sup>2</sup>, Caroline Andrique<sup>1</sup>, Julie Lesieur<sup>1</sup>, Agnès Linglart<sup>3</sup>, Anne Poliard<sup>1</sup>, Catherine Chaussain<sup>1,4\*</sup>, and Irène Netchine<sup>5\*</sup>.

¤Co-first authors

Authors'emails : [eloise.giabicani@aphp.fr](mailto:eloise.giabicani@aphp.fr), [aurelie.pham@aphp.fr](mailto:aurelie.pham@aphp.fr), [celine.selenou@inserm.fr](mailto:celine.selenou@inserm.fr), [caroline.andrique@u-paris.fr](mailto:caroline.andrique@u-paris.fr), [julie.lesieur@u-paris.fr](mailto:julie.lesieur@u-paris.fr), [agnes.linglart@aphp.fr](mailto:agnes.linglart@aphp.fr), [anne.poliard@u-paris.fr](mailto:anne.poliard@u-paris.fr), [catherine.chaussain@u-paris.fr](mailto:catherine.chaussain@u-paris.fr), [irene.netchine@aphp.fr](mailto:irene.netchine@aphp.fr)

### **Affiliations**

1. Université de Paris, URP2496, Laboratoire Pathologies, imagerie et biothérapies oro-faciales, 92120 Montrouge, France
2. INSERM, UMRS\_938 Centre de Recherche Saint Antoine, F-75012, Paris, France
3. APHP, Hôpital de Bicêtre, Endocrinologie et Diabétologie de l'Enfant, Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme du Calcium et du Phosphate, Le Kremlin-Bicêtre, France
4. APHP, Hôpital Bretonneau, Centre de Référence des Maladies Rares du Métabolisme du Calcium et du Phosphate et FHU DDS-net, Paris, France
5. Sorbonne Université, INSERM, UMRS\_938, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, F-75012, Paris, France

### **\*Corresponding authors:**

Pr Irène Netchine  
Centre de Recherche Saint Antoine  
Sorbonne Université  
184 rue du Faubourg Saint-Antoine,  
75012 Paris, France  
Email : [irene.netchine@aphp.fr](mailto:irene.netchine@aphp.fr)  
phone: +33144736621

Pr Catherine Chaussain  
URP2496 – Laboratoire pathologies, imagerie et  
biothérapies oro-faciales  
Université de Paris, UFR d'Odontologie  
1 rue Maurice Arnoux, 92120 Montrouge, France  
[catherine.chaussain@u-paris.fr](mailto:catherine.chaussain@u-paris.fr)  
phone: +33158076724

**Word count:** abstract word count: 250. Total word count: 3331.

This manuscript contains **5** figures, **no** table and **40** references

**Keywords:** dental pulp stem cells, imprinting diseases, Silver-Russell syndrome, Beckwith-Wiedemann syndrome, osteogenic differentiation, methylation, allelic expression, cellular model.

## Abstract

Parental imprinting is an epigenetic process leading to monoallelic expression of certain genes depending on their parental origin. Imprinting diseases are characterized by growth and metabolic issues starting from birth to adulthood. They are mainly due to methylation defects in imprinting control region that drive the abnormal expression of imprinted genes. We currently lack relevant animal or cellular models to unravel the pathophysiology of growth failure in these diseases. We aimed to characterize the methylation of imprinting regions in dental pulp stem cells and during their differentiation in osteogenic cells (involved in growth regulation) to assess the interest of this cells in modelling imprinting diseases. We collected dental pulp stem cells from five controls and four patients (three with Silver-Russell syndrome and one with Beckwith-Wiedemann syndrome). Methylation analysis of imprinting control regions involved in these syndromes showed a normal profile in controls and the imprinting defect in patients. These results were maintained in dental pulp stem cells cultured under osteogenic conditions. Furthermore, we confirmed the same pattern in six other loci involved in imprinting diseases in humans. We also confirmed monoallelic expression of *H19* (an imprinted gene) in controls and its biallelic expression in one patient. Extensive imprinting control regions methylation analysis shows the strong potential of dental pulp stem cells in modelling imprinting diseases, in which imprinting regions are preserved in culture and during osteogenic differentiation. This will allow to perform *in vitro* functional and therapeutic tests in cells derived from dental pulp stem cells and generate other cell-types.

## Introduction

Imprinting diseases (IDs) are a set of rare diseases that mainly affect growth and metabolism <sup>1</sup>. The phenomenon of parental imprinting results in the monoallelic expression of a gene, depending on its parental origin <sup>2</sup>. One of the most studied mechanisms controlling such selective expression is the differential methylation of the imprinting control region (ICR). The region located in chromosome 11p15 is of particular interest, as it contains two ICRs and defects in this region can cause two IDs: Silver-Russell syndrome (SRS, MIM#180860) and Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS, MIM#130650). Patients with SRS present with intra-uterine growth retardation, with no catch-up growth after birth, relative macrocephaly at birth, severe feeding difficulties, a protruding forehead, and body asymmetry <sup>3-5</sup>. The main molecular anomaly identified in these patients is the loss of methylation (LOM) at the *H19/IGF2:IG-DMR* (ICR1) of the paternal allele, resulting in a loss of expression of *insulin-like growth factor 2* (*IGF2*, normally expressed only from the paternal allele during fetal life), a growth factor known to be essential for growth, mainly in the prenatal period (Figure 1) <sup>6,7</sup>. BWS patients, instead, are usually born with macrosomia, macroglossia, body asymmetry, and an increased risk of developing embryonic tumors in childhood <sup>8,9</sup>. BWS is either due to a gain of methylation on the maternal ICR1, resulting in overexpression of *IGF2* from the maternal allele, or a LOM of the maternal *KCNQ1OT1:TSS-DMR* (ICR2), resulting in the lack of *cyclin D kinase inhibitor 1c* (*CDKN1c*) expression from the maternal allele. This gene is involved in cycle-cell inhibition (and growth restriction) (Figure 1) <sup>7</sup>. Patients with IDs present overlapping clinical features that can be explained by the co-regulation of imprinted genes that belong to a dynamic imprinted gene network <sup>10,11</sup>. Indeed, previous studies have shown that hypomethylation at one locus can affect the expression of

maternally or paternally expressed genes of other imprinting loci without affecting methylation of the corresponding ICR<sup>11-14</sup>. Moreover, Whipple *et al.* recently reported that a cluster of maternally expressed miRNAs can downregulate several imprinted genes expressed from the paternal genome in neurons<sup>15</sup>. However, one of the limitations in studying these diseases is the low level of expression of imprinted genes in human tissues available for biological research, such as leukocytes or fibroblasts. Hence, several groups have attempted to develop cellular models to explore the mechanisms underlying the pathophysiology of these diseases in tissues involved in the phenotype, such as bone, adipose tissue, hepatocytes, and chondrocytes. Induced pluripotent stem cells, although promising in theory, have shown a general ICR hypermethylation profile<sup>16-21</sup>. Multipotent stem cells have also been studied recently as an alternative<sup>22-25</sup>. In this context, it has been shown that mesenchymal stem cells derived from the dental pulp (DPSCs) may be a useful model to study IDs. In a study comparing methylation patterns of DPSCs derived from children with a chromosome 15q11.2-q13.3 maternal duplication (Dup15q), known to be involved in Prader-Willi syndrome (PWS, MIM#176270), to controls, the authors used whole genome bisulfite sequencing to show that methylation markers of 15q11.2-q13.3 duplication were maintained in DPSCs, with significant hypermethylation of the PWS-ICR relative to control DPSCs<sup>26</sup>. However, the authors did not provide any data about the methylation of other ICRs<sup>26</sup>. Furthermore, in this last study or in the other published works on cellular models, there is no characterization of the mono- or biallelic expression of imprinted genes in controls or patients with IDs, although this is critical to determine whether parental imprinting is present. Even if this pattern of expression is difficult to assess, the definition of parental imprinting relies on the monoallelic expression of these genes which make this analysis critical in IDs' studies.

To further investigate the potential of DPSCs as a relevant cellular model to study the pathophysiology of IDs, we aimed to 1) characterize the methylation profile of ICRs involved in human IDs in DPSCs of control individuals, 2) assess whether such a methylation profile is modified in patients with ICR methylation defects responsible for their ID, 3) define the expression profile of imprinted genes in these regions and 4) evaluate the dynamics of both the methylation and expression profile in these regions during DPSC osteogenic differentiation.

## Results

### *Cell culture and subjects*

DPSCs were harvested from five controls (called C1 to C5), with C2 and C3 being extracted from deciduous teeth and C1, C4, and C5 from permanent third molars. We also collected DPSCs from four patients, three with SRS (called SRS1 to 3) and one with BWS (called BWS1). All patient DPSCs were extracted from permanent third molars except for one odontoma (SRS1), with a macroscopic aspect of a deciduous incisor. Clinical follow-up of all patients was at the Hôpital Trousseau Pediatric Endocrinology Clinical Unit, their main clinical characteristics are detailed in Table 1. The molecular diagnosis of SRS was LOM at 11p15 ICR1 for the three patients and BWS was secondary to a LOM at 11p15 ICR2 (Figure 1). We confirmed the presence of DPSC markers (CD73, CD105, and CD90) in all seeded samples (Figure SD1). The macroscopic and microscopic aspects of the dental pulp and DPSCs in culture are presented in Figure 2a and b. There were no differences in the morphological



aspect of the cells or a delay in proliferation during DPSC proliferation or osteogenic differentiation *in vitro*. The efficiency of osteogenic differentiation is depicted in Figure 2c and d, showing both the evolution of expression of the *alkaline phosphatase (ALP)*, *osteopontin (OPN)*, and *bone sialoprotein (BSP)* genes within days of differentiation and Red Alizarin staining. *ALP* expression rose rapidly until day 7 and declined during the last days of osteogenic differentiation, whereas *OPN* expression rose the week after (day 14) and was lower at day 21. Finally, *BSP* expression was high during the entire differentiation process, showing an increase week after week. There was no statistical difference between controls and patients at either day 14 ( $p = 0.49$ ) or day 21 ( $p = 0.8$ ) in Red Alizarin absorbance (Figure SD2a.). There were also no statistical differences in *ALP*, *OPN*, or *BSP* expression at days 7, 14, or 21 between controls and patients ( $p$  from 0.3 to 1.0) (Figure SD2b).

#### *Methylation of ICRs*

We studied methylation levels at nine differentially methylated regions (DMRs) loci in five DPSC controls, three SRS patients, and one BWS patient. Methylation levels were normal for all controls at ICRs of 11p15 region (Figure 3 and Table SD2 in Supplementary Data). As expected, *H19/IGF2:IG-DMR (ICR1)* was hypomethylated for all SRS patients, and *KCNQ1OT1:TSS-DMR (ICR2)* hypomethylated for the BWS patient (Figure 3). Methylation levels at ICRs of 11p15 region remained unchanged during osteogenic differentiation (Figure 3 and 4b.). The methylation index of 11p15 ICR1 and ICR2 did not vary during several passages (1 to 4) of DPSCs in *in-vitro* culture (Figure SD3 in Supplementary Data). All seven other DMRs showed normal methylation levels in controls, SRS and BWS patients (Figure 4 and Table SD2 in Supplementary Data), except for DMR 7q32 and 20q13 of the BWS patient, who had a multi-loci methylation defect both in leukocytes and DPSCs. As in the controls, the methylation levels were stable in SRS and BWS patients during osteogenic differentiation in all studied loci (Figure 4b.).

#### *Imprinted gene expression*

##### Allelic expression

We next determined whether the expression of imprinted genes (mono or biallelic) in this region was concordant with the methylation profiles at ICR1 in both controls and patients (Figure 1). We thus first searched for polymorphisms in imprinted genes in this region for all individuals (*H19*, *IGF2*). We identified rs217727 (AACCGTCC[A/G]CCGCA) in *H19* exon 5 in two controls (C2 and C4), BWS1, and SRS2. The heterozygous status in this specific genomic site allowed us to determine whether one transcript was predominant (monoallelic expression) or whether both alleles were equally transcribed in the DPSCs. The results are expressed as the ratio of the two transcripts (G/A) (Figure 5). We found a monoallelic expression profile for both controls and BWS1 in DPSCs under regular culture conditions and during their osteogenic differentiation, in concordance with the methylation indices of these individuals at ICR1. On the contrary, the *H19* expression profile in SRS2 was biallelic in DPSCs and during their osteogenic differentiation, as expected (Figure 5).

## Discussion

Our results show, for the first time, that all imprinted regions involved in human diseases have a balanced methylation in DPSCs of controls. Our precise quantitative methylation-specific PCR analysis allows us to measure methylation indices similar to those found in the mature cells of other tissues. Furthermore, we confirm that patients already identified to be carrying an abnormal methylation profile at two key ICRs in their leukocytes carry the same methylation defect in their DPSCs. These results are consistent with the only published study from Dunaway *et al.*, in which the authors identified a balanced methylation profile in the 15q11 region in controls and an abnormal profile in patients, but no other ICR was investigated<sup>26</sup>. As imprinting diseases (IDs) represent a very small number of patients, the collection of DPSCs and their analysis for three patients with Silver-Russell syndrome (SRS) and one with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) is highly valuable.

Osteogenic differentiation of DPSCs resulted in no alterations of the methylation profile for either controls or patients. Furthermore, we did not identify any difference in the efficiency of osteogenic differentiation between controls, SRS, or BWS patients. These data, concordant with those of the study of Dunaway *et al.* on 15q11, confirm the lack of an effect of this differentiation process in the seven ICR methylation profiles that we studied<sup>26</sup>. Interestingly, Dunaway *et al.* described difficulties in maintaining the stability of the methylome in DPSC cultures, with global hypomethylation and variable methylation profiles between individual DPSC lines for both control and Dup15q. The difficulty to maintain normal levels of methylation in ICRs is also a pitfall in other cellular models, such as induced pluripotent stem cells<sup>16,27</sup>. Indeed, as imprinted genes work in a co-regulated network, abnormal methylation at one locus can potentially affect the gene expression at other imprinted loci with respect to the methylation of the corresponding ICR<sup>12-15</sup>. This phenomenon is likely responsible, at least partially, for the clinical overlap identified between several IDs<sup>11,28-30</sup>. The novelty and strength of our approach is the methylation analysis of all ICRs involved in human IDs. The normal methylation profile in all ICRs we characterized, both in DPSCs and cells generated following osteogenic differentiation, allow their use as a cellular model to study mechanisms underlying the physiopathology of IDs. We also showed that this methylation profile was not altered with time in culture.

On an other hand, Horii *et al.* recently produced an animal model of SRS using epigenome-editing<sup>31</sup>. They used the dCas9-SunTag and single-chain variable fragment-TET1 catalytic domain to produce an epigenome-edited mouse with ICR1 hypomethylation, upregulation of *H19*, and downregulation of *Igf2* expression relative to control mice. The epigenome-edited mice had SRS phenotype features and additional symptoms out of the SRS clinical spectrum such as cardiac fibrosis probably due to off-target demethylations. Most published studies on the cellular modelling of imprinting diseases only considered the methylation profile at ICRs as a validation of imprint maintenance in the cells, but very few assessed allelic expression to prove it. However, such analysis is difficult due to the small number of polymorphisms reported in the imprinted genes of interest and the existence of mosaicism in the population of cells studied. Indeed, only one group analyzed allelic expression in DPSCs, with the purpose of identifying molecular markers predictive of the efficiency of osteogenic differentiation<sup>32</sup>. Fanganiello *et al.* performed global gene expression profiling, in which they showed the upregulation of *IGF2* expression in DPSCs relative to that in mesenchymal stem cells from human adipose tissue

due to the biallelic expression of *IGF2* in DPSCs<sup>32</sup>. We urge other groups working on imprinting genes to assess allelic expression of imprinted genes of interest, as it defines imprinting phenomenon and should be a prerequisite to pathophysiological studies. Although limited to three controls and one SRS patient, we demonstrate, using an original method to assess and quantify allelic expression, the preserved correlation between *H19/IGF2*:IG-DMR methylation and allelic expression, confirming maintenance of the imprinting phenomenon. These results show DPSCs to be a potentially relevant model to study parental imprinting.

To conclude, this is the first study in DPSCs obtained from controls and patients with IDs affecting the 11p15 region to characterize both the methylation profile of a large group of ICRs and allelic expression. Our data show that DPSCs and their osteogenic differentiation are a relevant model to study the pathophysiology of Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes. The normal methylation profile observed for the main ICRs inclines us to predict that it could also be a useful cellular model to study other IDs. These results also provide perspectives on DPSC differentiation into other lineages of interest for ID pathophysiology studies.

## **Materials and methods**

### *Cell culture*

#### Dental pulp collection

Teeth were obtained after extraction according to an orthodontic treatment plan from the Dental Department of Hôpitaux Universitaires Paris Nord, Université de Paris, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), France. All teeth were collected with informed oral consent from the patients and the parents according to ethical guidelines set by the French law under the approval number 16-024 from the Institutional Review Board -IRB 00006477- of HUPNVS, Paris 7 University and AP-HP in 2016. The origin of the teeth was then coded as C1-5 for controls, SRS1-3 for patients with SRS, and BWS1 for the patient with BWS.

#### DPSC culture

Cultures of human DPSCs were established as previously reported<sup>22,33,34</sup>. After decontamination with povidone-iodine solution (Betadine, Meda Pharma, France), teeth were longitudinally sectioned and the pulp tissue collected. The pulp was then enzymatically digested with type I collagenase (3 mg/ml; Worthington Biochem, USA) and dispase (4 mg/ml; Boehringer Mannheim, Germany). Cells were then seeded in flasks and the cultures maintained with Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 g/L D-Glucose (DMEM; Invitrogen, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, USA) and 1% penicillin/streptomycin (PS; Invitrogen, USA) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The medium was refreshed twice a week. We did not use specific cell proliferation assay but we monitored the number of days needed between each passage and the delay between first culture and osteogenic differentiation onset for each sample. Cells were detached by trypsinization at 80%-90% confluence (0.25% trypsin EDTA solution Sigma-Aldrich, USA) and either re-plated for proliferation, frozen in liquid nitrogen, or seeded in six-well plates (100,000 cells/well) for osteogenic differentiation. Each step of trypsinization counted as a passage of DPSCs. For all differentiation experiments, DPSCs were used at passages 1 or 2.

### Osteogenic differentiation

For osteogenic differentiation, DPSCs were seeded in six-well plates and cultured for 21 days with osteogenic medium, composed of DMEM media supplemented with 50 µg/mL ascorbic acid sodium salt (Sigma Aldrich, USA),  $10^{-8}$ M dexamethasone (Sigma Aldrich, USA), 10mM β-glycerophosphate (Sigma Aldrich, USA), 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin/streptomycin<sup>35–37</sup>. Medium was renewed twice a week.

### Staining

At days 14 and 21, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and Alizarin Red was used as a marker of mineralization. For the quantification of Alizarin Red staining, a 10% acetic acid solution was added to the wells, the plates incubated for 30 min and each cell suspension transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube, heated to 85°C for 10 min, and centrifuged. The supernatant was transferred to a new tube and the acid neutralized by the addition of 0.4 volumes of 10% ammonium hydroxide. Aliquots were deposited in triplicate in a 96-well plate and absorbance read at 550 nm with a microplate reader (BioTek instruments, Winooski, Vermont, USA)<sup>37,38</sup>.

### DNA methylation analysis

#### DNA extraction

DNA was extracted from DPSC cultures before seeding in six-well plates and at days 7, 14, and 21 of osteogenic differentiation. We used an in-house protocol for DNA extraction after cell lysis by a salting-out procedure, as previously described<sup>11,39</sup>.

#### Bisulfite treatment of DNA

Sodium bisulfite treatment of DNA converts all unmethylated cytosine residues to uracil residues. The methylated cytosine residues are unaffected. This process thus generates C/T polymorphisms, which can be used to distinguish between the methylated and unmethylated allele. Genomic DNA (400 ng) was treated with sodium bisulfite using the EZ DNA Methylation lighting kit (Zymo Research, USA), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was eluted using 40 µl RNase-free H<sub>2</sub>O and conserved at -20°C.

TaqMan allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR) and methylation analysis.

The methylation status of seven imprinted loci (nine differentially methylated regions, DMRs) were assessed by ASMM RTQ-PCR, as previously described<sup>28</sup>: 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR, 11p15 *KCNQ1OT1*:TSS-DMR, 14q32 *MEG3/DLK1*:IG-DMR, 7q32 *MEST* promoter DMR, 7q12 *GRB10*:DMR, 15q11 *PWS/AS*:DMR, 6q24 *PLAGL1*:alt-TSS-DMR, 20q13 *GNAS*:A/B:TSS-DMR, and the *GNAS* locus NESP-DMR. The normal range of methylation indices of the nine DMRs were assessed in five control individuals. The methylation index (MI) at each locus was assigned by calculating the ratio between the methylated and unmethylated alleles as follows: (amount of methylated allele/sum of both methylated and unmethylated alleles) x 100. The ASMM RTQ-PCR primers and probe sequences are provided in supplementary data (table SD1).

### *RNA expression*

#### RNA extraction and reverse transcription

RNA was extracted from DPSC cultures before seeding in six-well plates and at days 7, 14, and 21 of osteogenic differentiation. Total RNA was extracted using the NucleoSpin miRNA Kit for the isolation of small and large RNAs (Macherey-Nagel, France). Both DNA and RNA were quantified using a DS-11 spectrophotometer (DeNovix, USA). cDNA was synthesized from long RNA using the miScript PCR System (Qiagen, France) and used for quantitative PCR.

#### Real-time PCR quantification of mRNA

Expression in the controls was arbitrarily set to 1 and fold changes (FCs) between two groups were calculated as  $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . The housekeeping gene *18S* was used as a reference because it had the best stability in DPSCs after preliminary experiments comparing it to other commonly used genes. The sequences of all the primers used for PCR are presented in Table SD1 in Supplementary Data.

#### PCR

Qualitative expression of the DPSC-specific markers CD90, CD105, and CD73 was performed for all samples using AmpliTaq Gold 360 Master Mix and a Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, USA). Primer sequences and the amplicon sizes are available in Table SD1 in Supplementary Data.

#### Allelic expression

To assess the mono- or biallelic expression of imprinted genes, we adapted a SNP genotyping assay to cDNA (TaqMan® SNP Genotyping Assays rs217727 C\_2603707\_10, ThermoFisher Scientific, USA) using TaqPath™ ProAmp™ Master Mix<sup>40</sup>. First, we searched for rs217727 in H19 in gDNA of both controls and patients by standard Sanger sequencing (Eurofin Genomics, Germany). The sequencing products were then analyzed using Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, Australia). Then, we used two probes, one specific for the SNP (rs217727, AACCGTCC[A/G]CCGCA) and the other for DNA with no polymorphism. Finally, we quantified the relative expression of cDNA (reversed from mRNA) carrying the polymorphism or not by RTQ-PCR. Results are expressed as the ratio of cDNA carrying a G or A in the rs217727 position. Primer and probe sequences are provided in Supplementary Data (Table SD1).

#### Statistics

Data presented in the figures are expressed as means (for controls and SRS patients) and the error bars represent the standard error of the mean (SEM). Mann-Whitney tests were used to compare unpaired quantitative distributions and Wilcoxon tests if the values were paired. All graphs were created and statistics performed using GraphPad Prism 6 (USA).

### **Acknowledgments**

We first want to thank the patients and their families that accepted to become involved in this study by giving us their teeth. We would also like to thank the “Association Française des Familles ayant un enfant atteint du Syndrome Silver-Russell ou né Petit pour l’âge Gestationnel (AFIF/PAG) for their help

in patient recruitment. We would like to thank the surgeons that extracted the teeth, which allowed this study: Dr Eleonora Segna, Dr Charles-Victor André, Dr Jean-Michel Pons Moureou, and Dr Aurélie Franco. We finally thank Virginie Steunou, Frédéric Brioude, Cristina Das Neves, Marilyne LeJule, and Nathalie Thibaud, molecular biology diagnosis technicians, for their help. EG was financially supported with a grant from the Société Française d'Endocrinologie et Diabétologie pédiatrique and the experiments were supported by the ANR -18-CE12-022.

### **Conflict of interest**

There is no conflict of interest to disclose related with this work for any of the authors.

### **Author contributions**

EG and AP equally contributed to the conception, design, data acquisition and interpretation, drafted and critically revised the manuscript.

CC and IN contributed to the conception, design, data interpretation and critically revised the manuscript.

CS, MLS, CA and JS contributed to the data acquisition and interpretation and critically revised the manuscript.

AL and AP contributed to the conception, data interpretation and critically revised the manuscript.

### **Figures legends**

**Figure 1.** Schematic representation of the imprinted domains in the 11p15 region involved in Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes. Only the imprinted genes that are involved in these syndromes are represented. Blue boxes indicate genes expressed from the paternal (pat) allele (*IGF2* and the long noncoding RNA *KCNQ1OT1*). Red boxes indicate genes expressed from the maternal (mat) allele (*CDKN1c*, *KCNQ1* (coding for an ion channel) and the long noncoding RNA *H19*). Green lines indicate differentially methylated regions (*H19/IGF2*:IG-DMR, the telomeric domain, called ICR1 and *KCNQ1OT1*:TSS-DMR, the centromeric, domain called ICR2). Green stars represent methylated DMRs. **a.** Normal 11p15 region. ICR1 is methylated on the paternal allele, leading to *IGF2* expression from the paternal allele and *H19* expression from the maternal allele. ICR2 is methylated on the maternal allele, leading to *CDKN1c* and *KCNQ1* expression from the maternal allele and *KCNQ1OT1* expression from the paternal allele. **b.** The three SRS patients (SRS1-3) presented with the loss of methylation of ICR1 in the paternal allele due to partial deletion of ICR1 (SRS1) or an epigenetic defect (SRS2-3), leading to a lack of paternal expression of *IGF2* and gain of maternal expression of *H19*. **c.** The BWS patient presented with the loss of methylation of ICR2 in the maternal allele, leading to a lack of maternal expression of *CDKN1c* and a gain of paternal expression of *KCNQ1OT1*.

**Figure 2a.** Macroscopic view of dental pulp after permanent third molar section. **b.** Microscopic image of dental pulp stem cells during the cell culture stage (4X/0.10). **c.** Red Alizarin staining: the photo on the left shows a macroscopic view of the wells after staining. The two upper wells were cultured in osteogenic medium for 21 days, whereas the lower one was cultured in classical cell culture medium and 10% fetal bovine serum (FBS10). The chart shows the quantification of staining at days 14 and 21 (D14, D21) of cells grown in either osteogenic differentiation (Os) or classical proliferation medium for

the controls and patients (FBS10). OD: optic density. **d.** Evolution of expression of *ALP*, *OPN*, and *BSP* within days of differentiation for all individuals. Histograms show the mean value with the standard error of the mean (\*\*p = 0.008, \*p = 0.03).

**Figure 3.** Methylation levels (mean with SD bars) of five controls (C1-5) and four patients (SRS1-3, BWS1) of 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) and *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2). **a.** Methylation index (MI) of DPSCs before osteogenic differentiation. MI were determined in a unique experiment for all samples and controls results were pooled. **b.** Methylation indices of ICR1 and ICR2 during osteogenic differentiation (days 7, 14, and 21 are pooled, histograms represent the mean and errors bars the standard deviation). Grey zones indicate the normal range of methylation indices identified in controls.

**Figure 4.** Methylation profile (mean with SD bars) of five controls (C1-5) and four patients (SRS1-3, BWS1) at six imprinted loci (differentially methylated regions in chromosomes 6q24, 7p12 7q32, 14q32, 15q11, and 20q13). **a.** Methylation indices (MIs) of DPSCs. MI were determined with a unique experiment for all samples and controls results were pooled. **b.** Methylation indices during osteogenic differentiation (days 7, 14, and 21 are pooled, histograms represent the mean and errors bars the standard deviation). Grey zones indicate the normal range of methylation indices.

**Figure 5.** Allelic expression profile of *H19* in individuals with normal methylation at *H19/IGF2*:IG-DMR and one patient with Silver-Russell syndrome (SRS2) in dental pulp stem cells (DPSC) or during osteogenic differentiation (OS). The ratio of each expressed allele was quantified. Values approaching 0 or 100% reflect monoallelic expression, whereas ratios around 50% reflect biallelic expression of *H19*. Each diamond represents one control result (n = 3) and each triangle the SRS2 values. Horizontal bars represent the mean of the data and vertical bars the standard error of the mean. rs217727 variation in gDNA: AACCGTCC[A/G]CCGCA.

### Table legend

**Table 1.** Main clinical features of patients with Silver-Russell syndrome (SRS1-3) and Beckwith-Wiedemann syndrome.

### References

1. Eggermann, T. *et al.* Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin. Epigenetics* **7**, (2015).
2. DeChiara, T. M., Robertson, E. J. & Efstratiadis, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**, 849–859 (1991).
3. Silver, H. K., Kiyasu, W., George, J. & Deamer, W. C. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* **12**, 368–376 (1953).

4. Russell, A. A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc. R. Soc. Med.* **47**, 1040–1044 (1954).
5. Wakeling, E. L. *et al.* Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 105–124 (2017).
6. Gicquel, C. *et al.* Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat. Genet.* **37**, 1003–1007 (2005).
7. Eggermann, K., Blik, J., Brioude, F. & Mackay, D. J. EMQN best practice guidelines for genetic testing of chromosome 11p15 Imprinting Disorders - Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* (2016).
8. Brioude, F. *et al.* Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 229–249 (2018).
9. Mussa, A. *et al.* Cancer Risk in Beckwith-Wiedemann Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis Outlining a Novel (Epi)Genotype Specific Histotype Targeted Screening Protocol. *J. Pediatr.* **176**, 142-149.e1 (2016).
10. Patten, M. M., Cowley, M., Oakey, R. J. & Feil, R. Regulatory links between imprinted genes: evolutionary predictions and consequences. *Proc. Biol. Sci.* **283**, (2016).
11. Abi Habib, W. *et al.* Transcriptional profiling at the DLK1/MEG3 domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci. Adv.* **5**, eaau9425 (2019).
12. Gabory, A. *et al.* H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 3413–3421 (2009).
13. Monnier, P. *et al.* H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20693–20698 (2013).
14. Stelzer, Y., Sagi, I., Yanuka, O., Eiges, R. & Benvenisty, N. The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. *Nat. Genet.* **46**, 551–557 (2014).
15. Whipple, A. J. *et al.* Imprinted Maternally Expressed microRNAs Antagonize Paternally Driven Gene Programs in Neurons. *Mol. Cell* **78**, 85-95.e8 (2020).

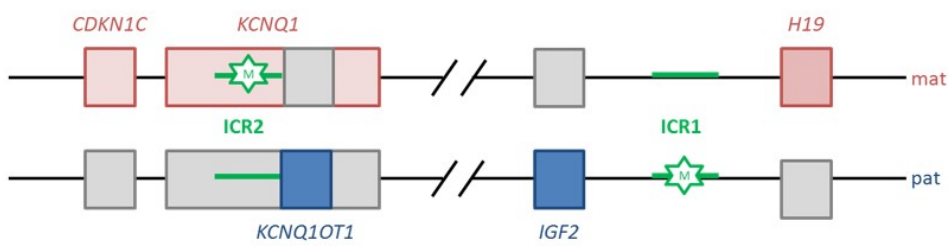


16. Bar, S. & Benvenisty, N. Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *EMBO J.* **38**, (2019).
17. Stadtfeld, M. *et al.* Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat. Genet.* **44**, 398–405, S1-2 (2012).
18. Velychko, S. *et al.* Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* **25**, 737-753.e4 (2019).
19. Yagi, M. *et al.* De Novo DNA Methylation at Imprinted Loci during Reprogramming into Naive and Primed Pluripotency. *Stem Cell Rep.* **12**, 1113–1128 (2019).
20. Lee Chong, T., Ahearn, E. L. & Cimmino, L. Reprogramming the Epigenome With Vitamin C. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
21. Grybek, V. *et al.* Methylation and transcripts expression at the imprinted GNAS locus in human embryonic and induced pluripotent stem cells and their derivatives. *Stem Cell Rep.* **3**, 432–443 (2014).
22. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13625–13630 (2000).
23. Frost, J. M. *et al.* The effects of culture on genomic imprinting profiles in human embryonic and fetal mesenchymal stem cells. *Epigenetics* **6**, 52–62 (2011).
24. Elli, F., Boldrin, V., Pirelli, A., Spada, A. & Mantovani, G. The Complex GNAS Imprinted Locus and Mesenchymal Stem Cells Differentiation. *Horm. Metab. Res.* **49**, 250–258 (2016).
25. Pignolo, R. J. *et al.* Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 2647–2655 (2011).
26. Dunaway, K. *et al.* Dental Pulp Stem Cells Model Early Life and Imprinted DNA Methylation Patterns. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 981–988 (2017).
27. Nishino, K. & Umezawa, A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells. *Hum. Cell* **29**, 97–100 (2016).
28. Geoffron, S. *et al.* Chromosome 14q32.2 Imprinted Region Disruption as an Alternative Molecular Diagnosis of Silver-Russell Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 2436–2446 (2018).
29. Poole, R. L. *et al.* Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders. *Am. J. Med. Genet. A.* **161A**, 2174–2182 (2013).

30. Kagami, M. *et al.* Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet. Med.* (2017) doi:10.1038/gim.2017.53.
31. Horii, T. *et al.* Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome. *Genome Biol.* **21**, 77 (2020).
32. Fanganiello, R. D. *et al.* Increased In Vitro Osteopotential in SHED Associated with Higher IGF2 Expression When Compared with hASCs. *Stem Cell Rev. Rep.* **11**, 635–644 (2015).
33. Miura, M. *et al.* SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5807–5812 (2003).
34. Salmon, B. *et al.* MEPE-Derived ASARM Peptide Inhibits Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells and Impairs Mineralization in Tooth Models of X-Linked Hypophosphatemia. *PLoS ONE* **8**, e56749 (2013).
35. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
36. Monterubbianesi, R. *et al.* A comparative in vitro study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts. *Sci. Rep.* **9**, 1761 (2019).
37. Collignon, A.-M. *et al.* Sclerostin Deficiency Promotes Reparative Dentinogenesis. *J. Dent. Res.* **96**, 815–821 (2017).
38. Novais, A. *et al.* Priming Dental Pulp Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth with Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Mineralization Within Tissue-Engineered Constructs Implanted in Craniofacial Bone Defects. *STEM CELLS Transl. Med.* sctm.18-0182 (2019) doi:10.1002/sctm.18-0182.
39. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215 (1988).
40. Yang, P.-J. *et al.* Effects of Long Noncoding RNA H19 Polymorphisms on Urothelial Cell Carcinoma Development. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**, E1322 (2019).

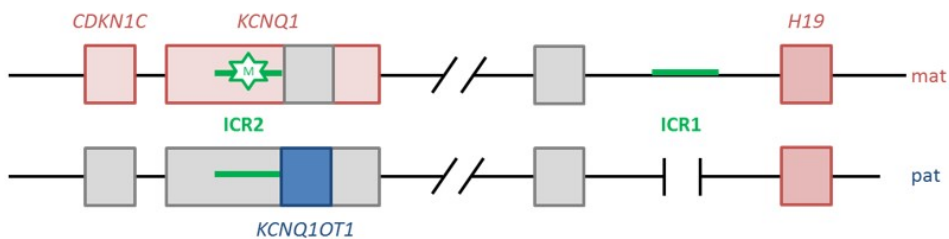
**Figure 1.** Schematic representation of the imprinted domains in the 11p15 region involved in Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes. Only the imprinted genes that are involved in these syndromes are represented. Blue boxes indicate genes expressed from the paternal (pat) allele (*IGF2* and the long noncoding RNA *KCNQ1OT1*). Red boxes indicate genes expressed from the maternal (mat) allele (*CDKN1c*, *KCNQ1* (coding for an ion channel) and the long noncoding RNA *H19*). Green lines indicate differentially methylated regions (*H19/IGF2*:IG-DMR, the telomeric domain, called ICR1 and *KCNQ1OT1*:TSS-DMR, the centromeric, domain called ICR2). Green stars represent methylated DMRs. a. Normal 11p15 region. ICR1 is methylated on the paternal allele, leading to *IGF2* expression from the paternal allele and *H19* expression from the maternal allele. ICR2 is methylated on the maternal allele, leading to *CDKN1c* and *KCNQ1* expression from the maternal allele and *KCNQ1OT1* expression from the paternal allele. b. The three SRS patients (SRS1-3) presented with the loss of methylation of ICR1 in the paternal allele due to partial deletion of ICR1 (SRS1) or an epigenetic defect (SRS2-3), leading to a lack of paternal expression of *IGF2* and gain of maternal expression of *H19*. c. The BWS patient presented with the loss of methylation of ICR2 in the maternal allele, leading to a lack of maternal expression of *CDKN1c* and a gain of paternal expression of *KCNQ1OT1*.

**a. Controls n=5**

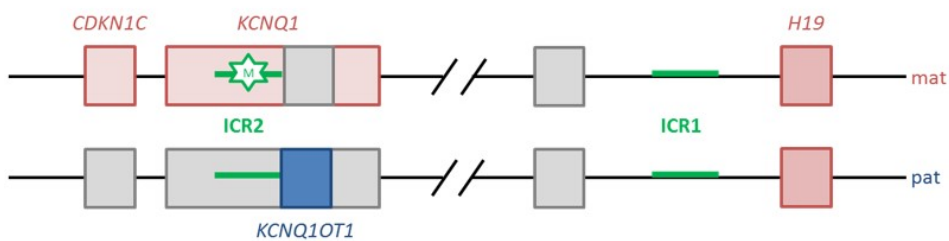


**b. SRS n=3**

Loss of methylation due to partial deletion of ICR1 (SRS1)

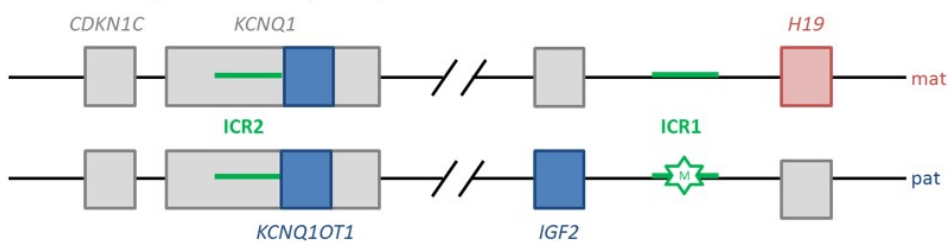


Loss of methylation of ICR1 due to epigenetic defect (SRS2-3)

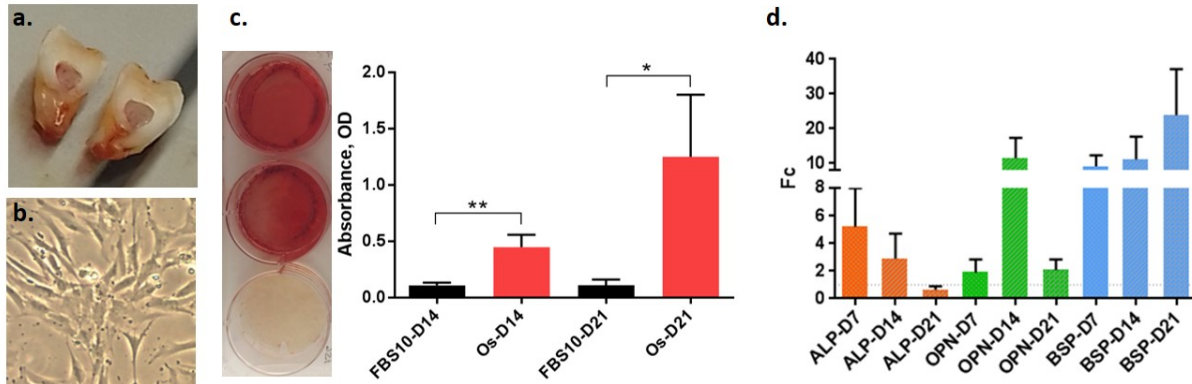


**c. BWS n=1**

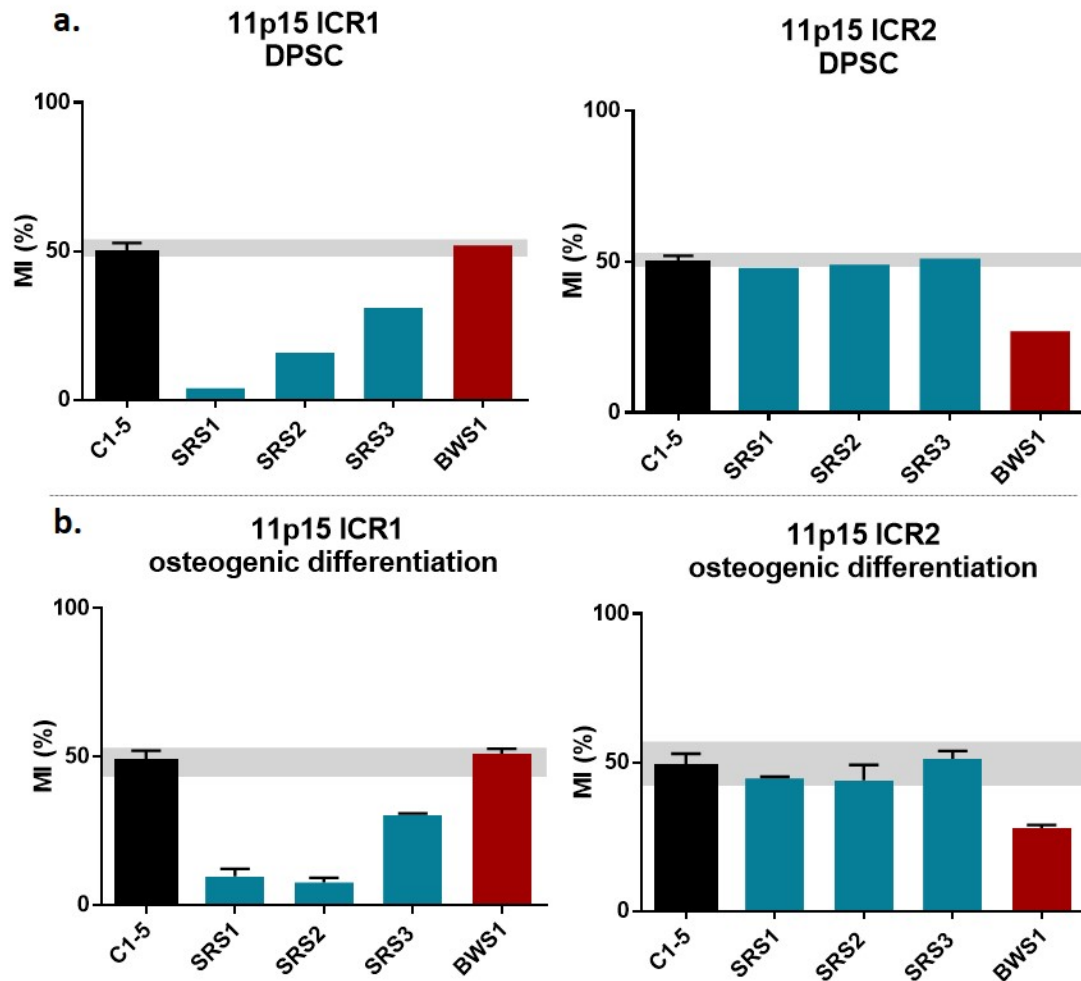
Loss of methylation of ICR2 (BWS1)



**Figure 2** a. Macroscopic view of dental pulp after permanent third molar section. b. Microscopic image of dental pulp stem cells during the cell culture stage (4X/0.10). c. Red Alizarin staining: the photo on the left shows a macroscopic view of the wells after staining. The two upper wells were cultured in osteogenic medium for 21 days, whereas the lower one was cultured in classical cell culture medium and 10% fetal bovine serum (FBS10). The chart shows the quantification of staining at days 14 and 21 (D14, D21) of cells grown in either osteogenic differentiation (Os) or classical proliferation medium for the controls and patients (FBS10). OD: optic density. d. Evolution of expression of *ALP*, *OPN*, and *BSP* within days of differentiation for all individuals. Histograms show the mean value with the standard error of the mean (\*\*p = 0.008, \*p = 0.03).



**Figure 3.** Methylation levels (mean with SD bars) of five controls (C1-5) and four patients (SRS1-3, BWS1) of 11p15 *H19/IGF2*:IG-DMR (ICR1) and *KCNQ1OT1*:TSS-DMR (ICR2). a. Methylation index (MI) of DPSCs before osteogenic differentiation. b. Methylation indices of ICR1 and ICR2 during osteogenic differentiation. Grey zones indicate the normal range of methylation indices identified in controls.



**Figure 4.** Methylation profile (mean with SD bars) of five controls (C1-5) and four patients (SRS1-3, BWS1) at six imprinted loci (differentially methylated regions in chromosomes 6q24, 7p12 7q32, 14q32, 15q11, and 20q13). **a.** Methylation indices (MIs) of DPSCs. **b.** Methylation indices during osteogenic differentiation (days 7, 14, and 21 are pooled, histograms represent the mean and errors bars the standard deviation). Grey zones indicate the normal range of methylation indices.

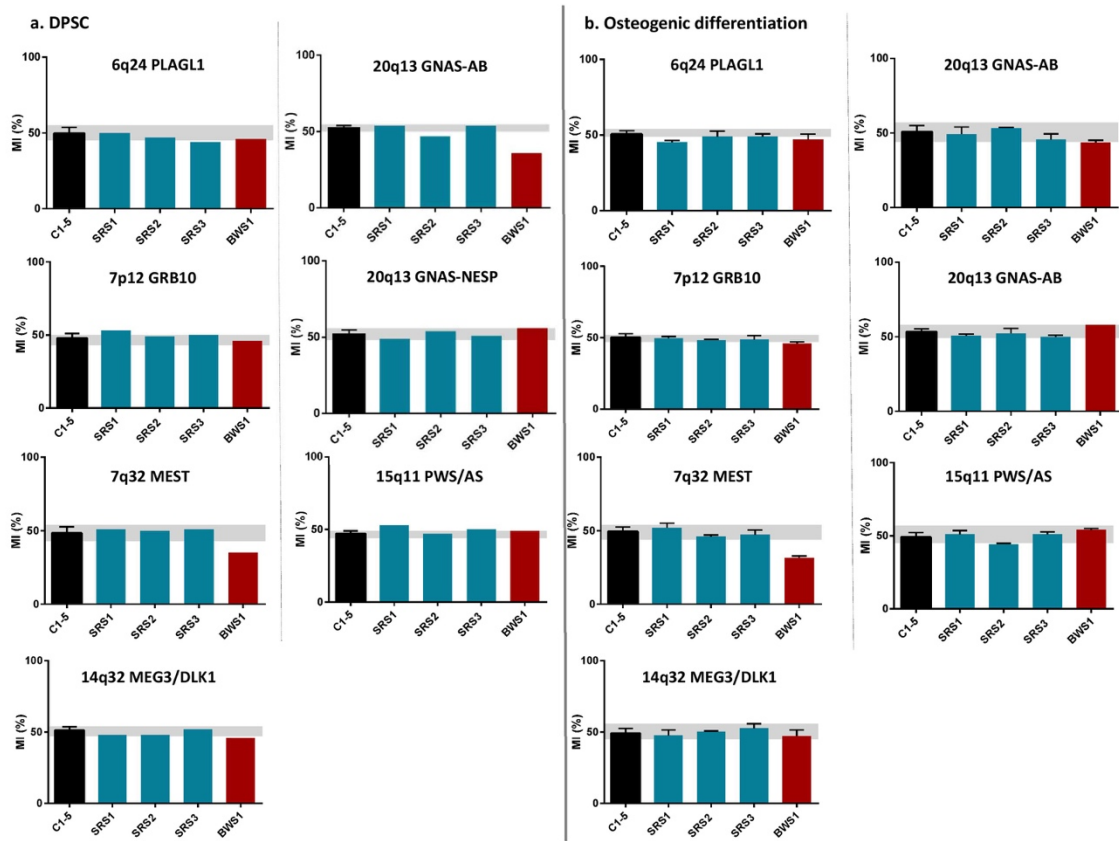
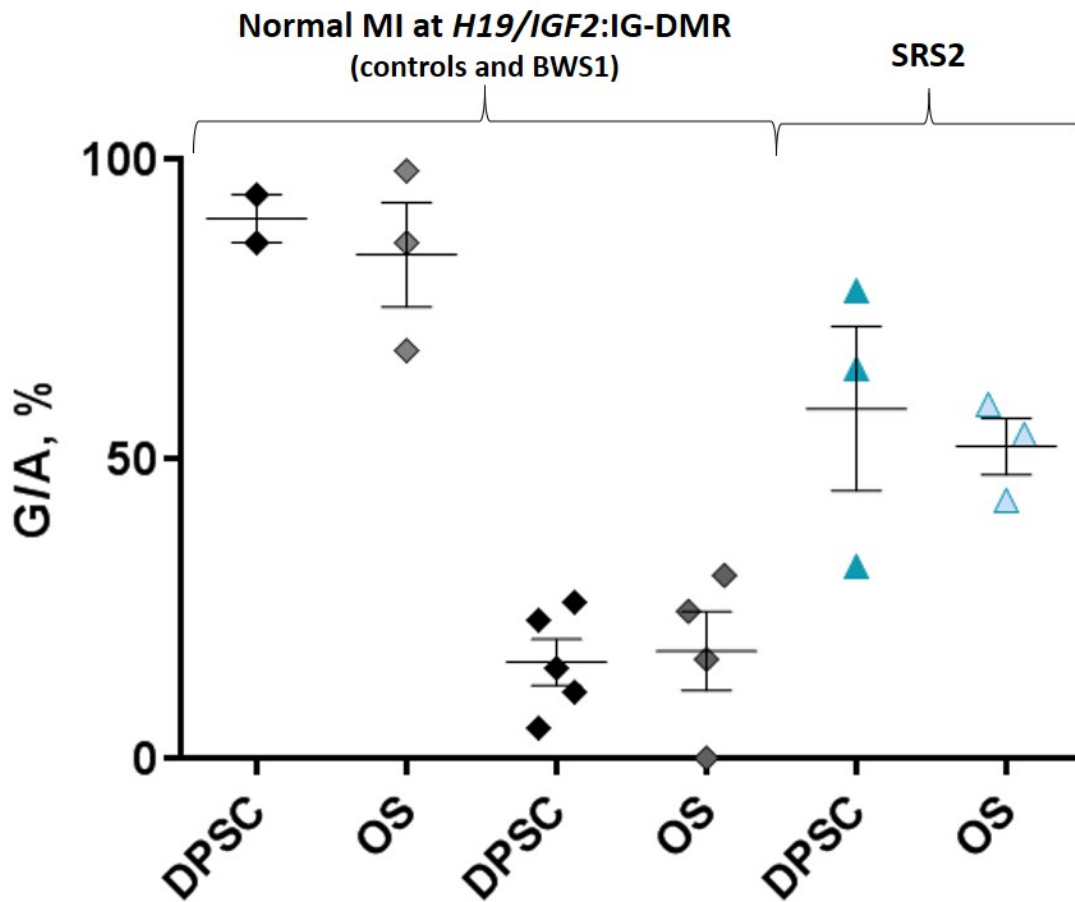


Figure 5. Allelic expression profile of *H19* in individuals with normal methylation at *H19/IGF2:IG-DMR* and one patient with Silver-Russell syndrome (SRS2) in dental pulp stem cells (DPSC) or during osteogenic differentiation (OS). The ratio of each expressed allele was quantified. Values approaching 0 or 100% reflect monoallelic expression, whereas ratios around 50% reflect biallelic expression of *H19*. Each diamond represents one control result ( $n = 3$ ) and each triangle the SRS2 values. Horizontal bars represent the mean of the data and vertical bars the standard error of the mean. rs217727 variation in gDNA: AACCGTCC[A/G]CCGCA.



## Dental pulp stem cells as a promising model to study imprinting diseases

Eloïse Giabicani, Aurélie Pham, Céline Sélénou, Marie-Laure Sobrier, Caroline Andrique, Julie Lesieur, Agnès Linglart, Anne Poliard, Catherine Chaussain, and Irène Netchine.

### Supplementary data

**Table SD1.** List and sequences of the primers used in this study. F: forward, R: reverse, M: methylated allele, UM: unmethylated allele

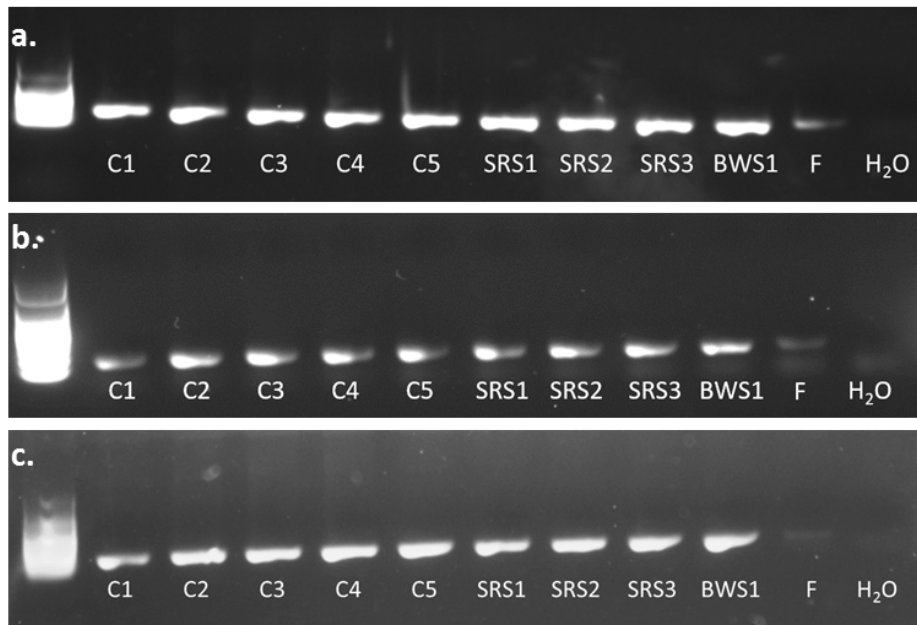
Primers used for mRNA amplification by PCR		
Primer	5' Sequence 3'	Amplicon size
CD105-F	AGTCTTGCAGAAACAGTCCA	129bp
CD105-R	TGGACTTCAAGGATGGCATT	
CD90-F	AATACCAGCAGTTCACCCAT	165bp
CD90-R	GCTAGTGAAGGCGGATAAGT	
CD73-F	AGCTTACGATTTTGCACACC	130bp
CD73-R	ATCTGCTGAACCTTGGTGAA	
Primers used for gDNA and cDNA amplification and sequencing		
Primer	5' Sequence 3'	
H19-ex1F	CAGTCACCCGGCCAGAT	
H19-ex1R	AAGACACCATCGGAACAGCA	
H19-ex4-5R	GCTCTGGAAGGTGAAGCTAG	

Primers used for mRNA quantification by RT-PCR	
Primer	5' Sequence 3'
IGF2-F	CGGCTTCCAGACACCAATGG
IGF2-R	GCGGAAACAGCACTCCTCAA
COL1A1-F	TGACTGGAAGAGTGGAGAGTA
COL1A1-R	TCTTGCTGATGTACCAGTTCT
OPN-F	GTTGTCCCCACAGTAGACAC
OPN-R	GTATGCACCATTCAACTCCT
ALP-F	AACTGATGTGGAGTATGAGAGTG
ALP-R	GAAGTGGGAGTGCTTGTATCT

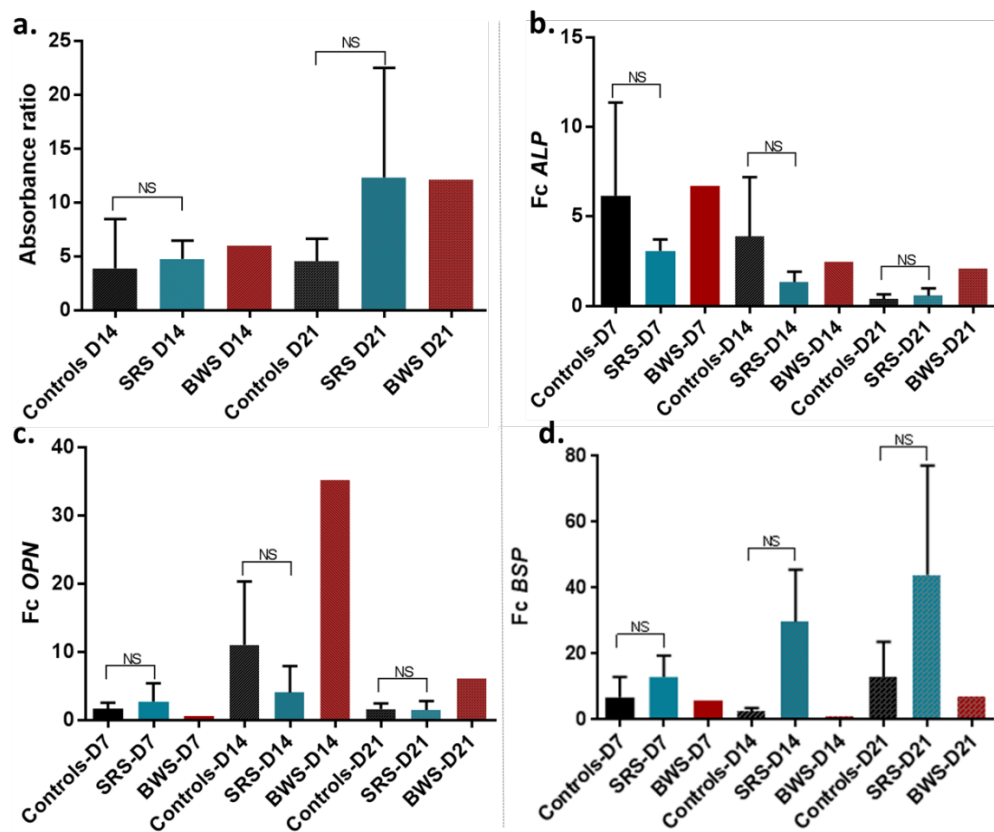
Primers and probes used for TaqMan allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR)		
Locus	Primers	Probes
11p15 <i>H19/IGF2:IG-DMR</i>	F : GTTTTTATATTATAGTTTAAAGTGYGTTTTAGTTGAGGT R : TCCATAAATATTCTATCCCTCACTACC	M : ACGTAACCCGAAACGT UM : CTTACATAACCCAAAACATT
11p15 <i>KCNQ1OT1:TSS-DMR</i>	F : GGGTTAGTTTTTGYGTGATGTGTTT R : ACCTCCACACCRAAAAACCCA	M : ATAGCGGTCGTATTTGATAT UM : TGTGTGAGGATAGTGGTTGT
14q32 <i>MEG3/DLK1:IG-DMR</i>	F : AGTTTTATGTTAAGATGTTAATTATTTTTGGA R : ACCAAAAACCTAACAAATCAAAACA	M : TAGTTCGCGGTTGTTAT UM : TAGTAGTTTGTGGTTTGTAT
7q32 <i>MEST promoter DMR</i>	F : GTATTAGGGTGAGATTAGGGTTATTATGG R : AAATATCACTCCTACCCRAATAAAAAT	M : TATTACGACGATTTCCGG UM : AAATTTTATTATGATGATTTT
7q12 <i>GRB10:DMR</i>	F : GGTTGTAATTTTAGTTTTYAGGGATTG R : CRTACATAAATTTAATCCTAAAATCCTAT	M : ACGGAGTAGCGTTCGGT UM : ATGGAGTAGTGTGTTGTTTT
15q11 <i>PWS/AS:DMR</i>	F : GATTTTGAGYGGTGTGTTTATAGTTTAGGTT R : TCCTATAACCTTCCACAACRCAC	M : AACGCATTTACTACGAAC UM : TAACACATTTACTACAAAACA
6q24 <i>PLAGL1:alt-TSS-DMR</i>	F : AYGGGTTGAATGATAATGGTAGATGT R : AACCCCAACRCCTCCTC	M : CCGTTCGACTCCCGA UM : CACCATTCCAACCCAAA
20q13 <i>GNAS locus NESP-DMR</i>	F : TGTTTGGGAGAGGATAGAGGAGA R : ACCCCACCTCCTTACTACACA	M : AGTTGCGGTTCCGA UM : TGTGAAGTTGTGTGTTTGGGA
20q13 <i>GNAS:A/B:TSS-DMR</i>	F : AGTAGGGGAGGTTTTGTATTTTATYGTA R : TCCTACCTCCAACCCAC	M : TCGTAAATAATTCGAATT UM : TTGGTGGGTGTGTGTTGT



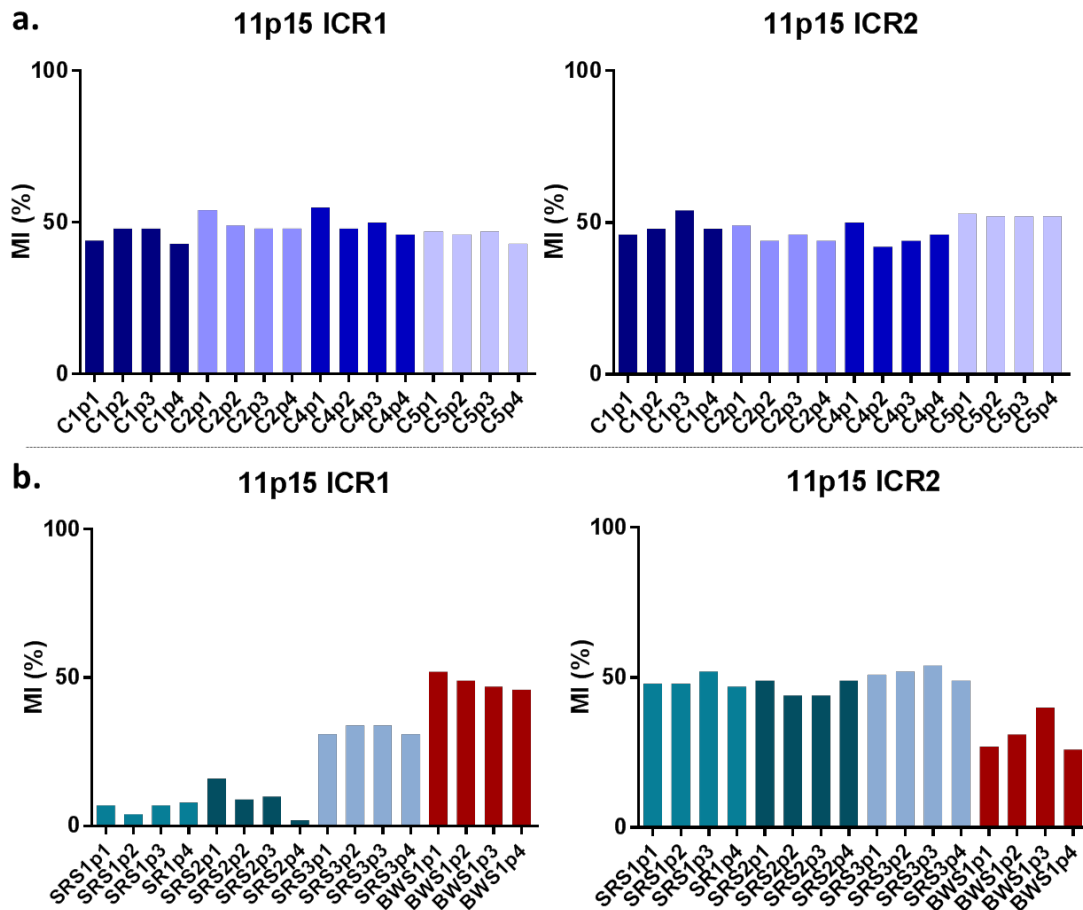
**Figure SD1.** CD90 (a), CD105 (b), and CD73 (c) expression in controls (C1-C5), SRS patients (SRS1-3), and the BWS patient (BWS1) relative to that in fibroblasts (F), as a positive control, and water (H<sub>2</sub>O), as a negative control.



**Figure SD2.** Comparison of osteogenic differentiation characteristics between controls, SRS patients, and the BWS patient. **a.** Quantification of Red Alizarin absorbance in DPSCs cultured in osteogenic medium relative to that of cells not exposed to osteogenic differentiation at days 14 (D14) and 21 (D21) of differentiation. **b, c, and d.** Relative expression of *ALP*, *OPN*, and *BSP* at days 7, 14, and 21 of osteogenic differentiation. There was no statistical difference between the controls and SRS patients.



**Figure SD3.** Profile of methylation (mean with SD bars) of **a.** four controls (C1, C2, C4 and C5) and **b.** four patients (SRS1-3, BWS1) at ICR1 and ICR2 at various passages of DPSCs in *in vitro* culture. MI: methylation index.



**Table SD2.** Methylation levels for all patients (SRS1-3, BWS1) and controls (C1-5) at various passages during *in vitro* culture of DPSCs and osteogenic differentiation (days 7, 14, and 21), as determined by ASMM RT-qPCR in the 9 DMRs studied. Low levels of methylation are highlighted in green and high levels in orange.

	11p15 ICR1	11p15 ICR2	14q32 DLK1	7q32 MEST	7p12 GRB10	15q11 PWS/AS	6q24 PLAGL1	20q13 GNAS- AB	20q13 GNAS- NESP
C1 p1	44	46	47	51	51	45	53	52	52
C1 p2	48	48	51	45	50	48	53	55	52
C1 p3	48	54	51	50	50	50	50	54	52
C1 p4	43	48	52	47	54	44	54	56	54
C1 day 7	43	51	52	51	49	47	54	53	52
C1 day 14	48	53	47	52	51	48	49	56	52
C1 day 21	48	45	47	45	51	47	52	53	53
C2 p1	54	49	52	43	49	46	45	50	56
C2 p2	49	44	49	46	48	48	49	42	52
C2 p3	48	46	47	51	47	48	46	53	53
C2 p4	48	44	48	50	48	49	45	54	52
C2 day 7	47	49	47	48	47	47	49	44	53

C2 day 14	53	56	56	54	57	46	49	44	58
C2 day 21	45	50	51	53	50	48	49	51	52
C3 p1	52	48	54	47	49	48	48	52	50
C3 day 7	46	45	49	44	47	49	50	49	53
C3 day 14	51	47	44	51	48	48	48	44	52
C3 day 21	51	48	48	54	50	49	48	48	55
C4 p1	55	50	52	48	49	45	51	51	48
C4 p2	48	56	51	43	47	44	47	51	54
C4 p3	50	44	49	48	50	48	50	54	56
C4 p4	46	46	44	45	52	46	51	54	56
C4 day 7	54	54	52	48	50	45	49	55	55
C4 day 14	53	57	50	49	50	47	48	57	52
C4 day 21	50	46	47	46	52	49	51	54	52
C5 p1	47	53	47	54	49	49	55	53	53
C5 p2	46	52	47	51	56	51	50	47	51
C5 p3	47	52	46	46	53	54	51	54	50
C5 p4	43	52	50	46	53	54	48	54	52
C5 day 7	43	46	45	46	48	54	50	49	53
C5 day 14	48	46	48	47	48	57	52	52	49
C5 day 21	49	53	55	51	55	53	55	53	53
SRS1 p1	7	48	47	50	52	53	52	47	49
SRS1 p2	4	48	48	51	53	53	50	54	49
SRS1 p3	7	52	48	52	57	53	50	54	51
SRS1 p4	8	47	49	53	50	53	49	51	49
SRS1 day 7	10	45	45	49	49	53	46	53	50
SRS1 day 14	12	44	46	55	51	52	46	44	52
SRS1 day 21	7	45	52	52	49	48	44	51	50
SRS2 p1	16	49	48	50	49	47	47	47	54
SRS2 p2	9	44	50	47	46	44	48	54	53
SRS2 p3	10	44	49	48	50	46	46	50	53
SRS2 p4	10	49	48	48	51	43	45	51	52
SRS2 day 7	8	56	50	46	48	44	45	53	56
SRS2 day 14	6	41	51	45	48	45	50	53	50
SRS2 day 21	9	50	50	47	49	44	52	54	51
SRS3 p1	31	51	52	51	50	50	44	54	51
SRS3 p2	34	52	58	44	53	49	46	44	53
SRS3 p3	34	54	53	48	48	48	46	47	51
SRS3 p4	31	49	53	48	49	50	45	50	49
SRS3 day 7	30	54	55	45	52	49	51	44	50
SRS3 day 14	30	49	49	46	47	52	48	43	51
SRS3 day 21	31	51	54	51	47	52	48	50	49
BWS1 p1	52	27	46	35	46	49	46	36	56
BWS1 p2	49	31	46	32	50	48	47	36	61
BWS1 p3	47	40	45	33	49	51	49	26	59
BWS1 p4	46	26	46	30	48	50	49	31	55
BWS1 day 7	50	27	44	31	46	53	46	42	58
BWS1 day 14	53	28	52	33	45	54	44	44	58
BWS1 day 21	50	29	46	31	47	55	51	45	58

		<b>SRS1</b>	<b>SRS2</b>	<b>SRS3</b>	<b>BWS1</b>
	<b>TARGET HEIGHT, cm (SDS)</b>	176.0 (0.2)	165.5 (0.45)	182.0 (1.2)	167.0 (0.7)
<b>BIRTH PARAMETERS</b>	<b>Term, WA+d</b>	31+5	37+5	40	33+5
	<b>weight, g (SDS)</b>	890 (-3.5)	1435 (-4.0)	2560 (-2.0)	2700 (2.6)
	<b>length, cm (SDS)</b>	30.5 (-6.8)	40.5 (-4.7)	45.0 (-3.3)	48.5 (2.5)
	<b>head circumference, cm (SDS)</b>	29.0 (-0.1)	32.0 (-1.7)	35.0 (-0.1)	31.5 (0.5)
<b>rGH TREATMENT ONSET</b>	<b>age, years</b>	4.0	2.9	2.3	No rGH
	<b>height, cm (SDS)</b>		80.0 (-3.5)	81.7 (-2.0)	No rGH
<b>LAST VISIT</b>	<b>age, years</b>	13.0	17.5	16.1	20.0
	<b>height, cm(SDS)</b>	151.5 (-0.1)	150.0 <sup>1</sup> (-2.4)	179.0 <sup>1</sup> (0.7)	179.5 <sup>1</sup> (2.9)
	<b>OTHER FEATURES</b>	body asymmetry, feeding difficulties, advanced puberty	body asymmetry, severe feeding difficulties with long term nutritional support, advanced puberty	body asymmetry, feeding difficulties, advanced puberty	body asymmetry, exomphalos, macroglossia No tumor

SDS : Standard deviation score ; WA+d : weeks of amenorrhea and days; rGH: recombinant growth hormone. <sup>1</sup>Final height.

Paris the 31<sup>st</sup> of January 2022,

Dear reviewers,

First, we would like to thank you to have accepted to judge our work and for your appreciations and comments. Please find in this document the answers we provided to each of them, together with a revised version of the manuscript where the changes are highlighted in green.

**Reviewer #1 (Comments to the Author):**

1. Why there is no error bar in the methylation index before osteogenic differentiation in Fig.3 and Fig.4?

*Indeed, the methylation index was determined in one sample for each individual and with no replicate since ASMM-RTqPCR is a very robust method that we use for routine diagnosis. We pooled the methylation indices of controls' DPSC and for each individual during osteogenic differentiation, days 7, 14 and 21 were gathered. We add a sentence in the legend of both figures to clearly state why there is no error bar in some histograms.*

2. In the sentence "Osteogenic differentiation of DSPCs resulted in no alterations of the methylation profile for either controls or patients.", DSPCs should be DPSCs.

*Sorry for this mistake, we have corrected it.*

3. There is no significance of assessing allelic expression in the introduction.

*We add two sentences to highlight the importance of assessing allelic expression in studies on IDs since it defines the parental imprinting phenomenon, although it is rarely done in published works.*

**Reviewer #2 (Comments to the Author):**

1. Although the phenotype of both syndromes is well defined without a great clinical heterogeneity the clinical characterization it would be useful to include a summarized description of the clinical manifestations showing the growth alterations of the syndromic tooth donors in addition to the molecular analysis.

*We fully agree that our manuscript lacked of clinical inputs on patients and we add a table gathering the main clinical features (mainly the growth impairment and management) for each patient. Please find these data in table 1.*

2. In the results section page 3 concerning the phrase: "There were no differences in the aspect of the cells or a delay in proliferation during DPSC proliferation or osteogenic differentiation in vitro" I suggest to modify to the morphological aspect of the cells and explain in the methods section how was the cell proliferation assessed since it was not clear.

*We precise "morphological" aspect as suggested. We added a sentence in the methods section to explain that we did not perform any specific proliferation assay but we have monitored the days between each passage and between the DPSC collection and their differentiation. These delays were comparable between controls and patients: 5 to 8 days between two passages for controls, 4 to 7 days for SRS patients and 3 days for BWS1 and a mean of 19.3 (SD 3.5) and 19.6 (SD 3.5) days respectively for controls and patients before differentiation onset.*

We hope we have addressed all your comments and that you will find our article suitable for publication.

Best regards

Eloïse Giabicani, Aurélie Pham and colleagues

### III.2. Conclusions et perspectives

Ces deux modèles cellulaires de différenciation en cellules d'intérêt à partir de cellules souches pluripotentes sont prometteurs et offrent des perspectives intéressantes. Ces modèles cellulaires permettront de faire des analyses moléculaires afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies liées à des anomalies de l'empreinte et en particulier l'organisation du réseau de gènes soumis à empreinte parentale, par des études de RNAseq par exemple. Ces modèles pourraient également offrir des perspectives en termes de test thérapeutique à l'échelle cellulaire (test de nouvelles molécules, thérapie génique...).

Cependant, ces modèles présentent des inconvénients. Le modèle d'iPSCs demande encore du travail de mise au point des milieux de culture afin de s'assurer de la stabilité des niveaux de méthylation des centres d'empreinte parentaux lors de la culture et de la redifférenciation. Bien que prometteuse, l'ajout de vitamine C dans le milieu de culture ne semble pas résoudre entièrement le problème de méthylation aberrante des centres d'empreinte 11p15 et 14q32 puisqu'un certain nombre de clones deviennent hyperméthylés lors de la culture cellulaire. Il est donc nécessaire de vérifier le maintien de l'empreinte parentale dans chaque clone d'iPSCs et au cours de sa redifférenciation avant de pouvoir l'utiliser comme modèle cellulaire. Enfin, il sera nécessaire de vérifier que les anomalies de l'empreinte parentale soient maintenues lors de la reprogrammation d'iPSCs à partir de cellules de patients atteints de SRS ou de TS, notre travail ayant porté exclusivement sur des iPSCs obtenus par reprogrammation de cellules issues de témoins sains. Les niveaux de méthylation sont équilibrés dans les DPSCs et dans les cellules différenciées à partir des DPSCs, mais ces cellules ne sont accessibles pour des travaux de recherche qu'en cas d'extraction dentaire programmée. Les patients avec un SRS présentent un encombrement dentaire pour lequel une extraction est souvent nécessaire, ce qui nous a permis d'avoir accès aux DPSCs. En revanche, l'accessibilité aux DPSCs est limitée dans les autres maladies liées à l'empreinte parentale.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES**



L'objectif de ce travail de thèse était de documenter le rôle du gène soumis à empreinte parentale *DLK1* dans la régulation épigénétique de la croissance fœtale à l'aide d'une approche translationnelle et fondamentale.

Il a été montré précédemment par deux équipes qu'il existe une diminution significative des concentrations sériques de DLK1 circulant dans le sang maternel au troisième trimestre de gestation en cas de fœtus PAG (Cleaton et al., 2016; MacDonald et al., 2020). Cependant, les données étaient contradictoires concernant l'association d'une diminution de DLK1 avec une restriction de croissance fœtale d'origine vasculaire placentaire (Cleaton et al., 2016; MacDonald et al., 2020). Faire la différence entre RCIU et PAG est particulièrement important dans la surveillance de la gestation et pour le choix du terme d'accouchement optimal (Andreasen et al., 2021). Au cours de la première partie de ce travail, nous avons pu montrer qu'il existe dès 26 SA une diminution significative des concentrations sériques de DLK1 dans le sang maternel en cas de fœtus PAG, indépendamment des signes d'insuffisance vasculaire placentaire. Cependant, la diminution des concentrations de DLK1 en cas de nouveau-né PAG est très modeste et une mesure isolée des concentrations de DLK1 au cours de la gestation ne peut pas être considérée comme un biomarqueur suffisamment performant de PAG. En revanche, l'évolution selon une courbe parfaitement polynomiale des concentrations sériques de DLK1 chez une femme enceinte à titre individuel laisse penser que la mesure des concentrations de DLK1 circulant à intervalles réguliers pendant la gestation pourrait refléter la croissance intra-utérine et permettre selon l'évolution de la courbe individuelle de dépister précocement une altération de la croissance intra-utérine. Nous projetons dans un premier temps de modéliser les courbes d'évolution des concentrations sanguines de DLK1 entre 12 et 36 SA chez des femmes enceintes donnant naissance à des nouveau-nés eutrophes puis les courbes d'évolution des concentrations de DLK1 chez des mères donnant naissance à des nouveau-nés

PAG, afin de déterminer si l'étude de l'évolution individuelle des concentrations sériques de DLK1 chez des femmes enceintes permettrait de dépister précocement une altération de la croissance fœtale.

La deuxième partie de ce travail a consisté en la recherche de mutations de *DLK1* au sein d'une cohorte de 132 patients nés PAG. Nous avons choisi de séquencer *DLK1* chez des patients nés PAG répondant à la définition clinique du SRS mais chez qui aucune étiologie moléculaire n'avait été identifiée. Des anomalies moléculaires de la région 14q32 ont précédemment été identifiées chez des patients présentant un diagnostic clinique de SRS (Geoffron et al., 2018). *DLK1* étant exprimé à partir de la région 14q32 et les modèles murins d'inactivation de *Dlk1* étant PAG, la recherche de mutation de *DLK1* chez des patients nés PAG avec un diagnostic clinique de SRS semblait pertinente. Le séquençage de *DLK1* chez ces 132 patients n'a pas permis de mettre en évidence de mutation au sein de ce gène, rendant l'implication des mutations de *DLK1* dans le SRS nulle ou très peu fréquente. Le rôle de chacun des gènes exprimés à partir de la région 14q32 dans le phénotype des patients avec un TS présentant une disomie uniparentale ou une perte de méthylation à ce locus n'étant pas bien défini, il est difficile de savoir si la perte d'expression de *DLK1* est responsable de l'ensemble des signes cliniques présents chez les patients présentant un TS (RCIU et retard de croissance postnatal, macrocéphalie relative, difficultés alimentaires, hypotonie...). L'absence d'identification de mutations de *DLK1* au sein de notre cohorte d'étude est donc peut-être liée au choix que nous avons fait de séquencer *DLK1* chez des patients avec un diagnostic clinique de SRS. Il serait intéressant d'élargir le séquençage de *DLK1* en ne se limitant pas à des patients présentant un phénotype strict de SRS avec une macrocéphalie relative.

Les gènes soumis à empreinte parentale sont organisés en réseau avec une action en *trans* des transcrits des gènes sur l'expression des gènes de régions situées à distance. Le rôle de *DLK1* dans l'expression des gènes de ce réseau est mal connu. Les patients présentant un TS avec anomalies moléculaire au locus *DLK1/MEG3* (14q32) ou un SRS avec anomalies moléculaires au locus *H19/IGF2* (11p15) présentent des caractéristiques phénotypiques (dont le RCIU) et moléculaires communes, ce qui constitue un modèle pour l'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale. Les gènes soumis à empreinte parentale étant faiblement exprimés dans les fibroblastes ou les leucocytes, développer un modèle cellulaire d'étude est un préalable à l'étude du transcriptome. Nous avons développé deux modèles cellulaires qui offrent des perspectives intéressantes pour l'étude du transcriptome de ces régions soumises à empreinte parentale et dans leurs interactions à distance. Dans les deux cas, nous avons obtenus des cellules d'intérêt pour l'étude de la physiopathologie du réseau de gènes soumis à empreinte (chondrocytes, ostéocytes) en différenciant des cellules pluripotentes (iPSCs ou DPSC). Dans le modèle d'iPSCs, nous avons été confrontés à une hyperméthylation aberrante des centres d'empreinte 11p15 *IGF2/H19:IG-DMR* et 14q32 *MEG3/DLK1:IG-DMR*. De façon intéressante, il s'agit des deux seuls centres d'empreinte méthylés sur l'allèle paternel et au sein desquels la fixation de CTCF induit une organisation au sein des TADs différente selon l'origine parentale de l'allèle. En effet, la fixation de CTCF uniquement sur l'allèle maternel non méthylé de ces deux régions induit la formation de sous-TADs différents entre les allèles maternels et paternels. Nous avons réussi à corriger cette hyperméthylation grâce à l'adjonction d'acide ascorbique dans le milieu de culture des iPSCs associée à une culture en hypoxie. Le modèle de cellules souches pluripotentes nécessite encore un travail de mise au point des milieux de culture afin de s'assurer de la stabilité des niveaux de méthylation des centres d'empreinte parentaux lors de la culture et de la redifférenciation, mais est prometteur. Dans les cellules différenciées à partir des DPSCs, les niveaux de méthylation sont équilibrés dans

les cellules souches issues de la pulpe dentaire mais ces cellules ne sont accessibles qu'en cas d'extraction dentaire programmée.

Les modèles murins constituent des outils intéressants pour l'étude des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale. Les loci soumis à empreinte parentale et les mécanismes qui gouvernent la mise en place et le maintien de l'empreinte parentale sont en effet largement conservés entre les espèces (Bartolomei et al., 1991). Cependant, jusque très récemment, aucun modèle murin ne présentait l'ensemble du phénotype de la maladie liée à des anomalies de l'empreinte parentale constaté chez l'humain. Horii *et al.* ont généré très récemment un modèle murin de SRS qui semble très prometteur (Horii et al., 2020). Ce modèle murin a été obtenu par des techniques d'édition du génome. L'édition du génome est une technique de biologie moléculaire qui consiste à modifier le génome de façon très précise à l'aide de nucléases appelées « ciseaux moléculaires ». Le système Cas-9-SinTag permet de réaliser une déméthylation ciblée du génome par le recrutement de *TET1* (ten-eleven-translocation 1) au locus concerné. La protéine TET1 est une enzyme capable d'hydroxyler la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine (Guo et al., 2011). Cette technologie a permis de réaliser une déméthylation ciblée du génome au centre d'empreinte *H19/Igf2*:IG-DMR dans des cellules souches embryonnaires murines ou des blastomères donnant ensuite naissance à des modèles murins de SRS par perte de méthylation en *H19/Igf2*:IG-DMR. Il s'agit du premier modèle murin dans lequel la déméthylation est induite à un stade préimplantatoire. Comme les patients humains présentant un SRS, ces modèles murins présentent une surexpression de *H19* et un défaut d'expression d'*Igf2*, conduisant à une restriction de croissance sévère avec retard de croissance postnatal (Horii et al., 2020). Les souriceaux présentent un phénotype très proche de celui constaté chez l'humain avec une relative macrocéphalie, des hypoglycémies néonatales, des difficultés alimentaires et une asymétrie corporelle. Cependant, les différences qui existent entre l'humain et la souris en termes de métabolisme et de physiologie de la croissance rendent

difficile l'extrapolation des résultats obtenus chez la souris à l'humain. Par ailleurs, certains modèles murins avec des anomalies moléculaires des régions soumises à empreinte parentale ne sont pas viables contrairement aux anomalies analogues chez l'humain, comme c'est le cas par exemple pour les disomies uniparentales paternelles du chromosome 7 murin, homologue au chromosome 11 humain (McLaughlin et al., 1996). Enfin, l'expression en mosaïque tissulaire observée dans les maladies de l'empreinte chez l'humain n'est pas retrouvée dans les modèles murins (Chang and Bartolomei, 2020). Par ailleurs, l'obtention d'un modèle cellulaire humain de maladie de l'empreinte est nécessaire pour d'éventuels tests thérapeutiques. Ces éléments justifient de poursuivre les études sur les modèles cellulaires humains de maladie de l'empreinte parentale.

Grâce aux nouvelles techniques d'édition du génome à l'aide du système CRISPR-dCas9-SinTag, nous projetons d'induire les anomalies moléculaires responsables des maladies de l'empreinte avec restriction de croissance fœtale au sein de cellules pluripotentes de témoins sains (iPSCs ou DPSC). Nous reprogrammerons des iPSCs à partir de PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) ou collecterons des DPSC chez des témoins sains. Nous réaliserons au sein de ces iPSCs ou DPSC une déméthylation ciblée du génome au niveau des centres d'empreinte parentaux grâce à la technologie de CRISPR-dCas9-SinTag. L'efficacité de la déméthylation ciblée étant plus grande sur des cellules en prolifération, nous faisons le choix de réaliser l'étape d'édition du génome sur une cellule souche (iPSCs ou DPSC) plutôt que sur une cellule somatique différenciée. Nous différencierons ensuite les iPSCs ou DPSC témoins et déméthylés en cellules d'intérêt (chondrocytes, adipocytes). Ce modèle présente plusieurs intérêts. Il permet de créer un modèle cellulaire de maladie liée à l'empreinte parentale à partir d'une cellule somatique de témoin sain facilement accessible. Réaliser une déméthylation ciblée à partir d'un clone d'iPSCs ou de DPSCs de témoin sain permet d'obtenir

un modèle cellulaire de maladie liée à des anomalies de l’empreinte et son parfait témoin. Ce modèle d’étude humain servira ensuite à l’étude des mécanismes physiopathologiques des maladies de l’empreinte et pourra également servir de base à d’éventuels tests thérapeutiques.

L’approche translationnelle de ce travail expérimental n’a pas apporté de preuve formelle concernant le rôle du gène soumis à empreinte parentale *DLK1* dans la régulation épigénétique de la croissance fœtale mais ouvre des perspectives intéressantes, notamment concernant l’hypothèse selon laquelle *DLK1* pourrait être un biomarqueur de RCIU par le suivi de l’évolution à titre individuel des concentrations de *DLK1* dans le sang maternel. L’approche fondamentale a permis de mettre au point deux modèles cellulaires très prometteurs d’étude des maladies liées à des anomalies de l’empreinte parentale. Le rôle de *DLK1* dans la régulation de l’expression des gènes du réseau de gènes soumis à empreinte parentale pourra être documenté à l’aide de ces modèles cellulaires par des études de transcriptome par exemple. La compréhension des mécanismes moléculaires et de leurs conséquences sur l’expression des gènes impliqués dans les maladies de l’empreinte parentale, maladies rares avec anomalie sévère de la croissance, permettra de mieux comprendre la physiologie de la croissance fœtale et les conséquences à long terme d’une restriction de croissance sur le développement et la physiologie des organes et la santé à plus long terme.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, A.M., Bueno, R., Pedrini, M.T., Murray, J.M., and Smith, R.J. (1992). Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem* *267*, 10759–10763.
- Abdallah, B.M., Jensen, C.H., Gutierrez, G., Leslie, R.G.Q., Jensen, T.G., and Kassem, M. (2004). Regulation of human skeletal stem cells differentiation by *Dlk1/Pref-1*. *J Bone Miner Res* *19*, 841–852.
- Abi Habib, W., Azzi, S., Brioude, F., Steunou, V., Thibaud, N., Das Neves, C., Le Jule, M., Chantot-Bastaraud, S., Keren, B., Lyonnet, S., et al. (2014). Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 5763–5773.
- Abi Habib, W., Brioude, F., Edouard, T., Bennett, J.T., Lienhardt-Roussie, A., Tixier, F., Salem, J., Yuen, T., Azzi, S., Le Bouc, Y., et al. (2018). Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet. Med.* *20*, 250–258.
- Abi Habib, W., Brioude, F., Azzi, S., Rossignol, S., Linglart, A., Sobrier, M.-L., Giabicani, É., Steunou, V., Harbison, M.D., Le Bouc, Y., et al. (2019). Transcriptional profiling at the *DLK1/MEG3* domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci. Adv.* *5*, eaau9425.
- Alfirevic, Z., Stampalija, T., and Dowswell, T. (2017). Fetal and umbilical Doppler ultrasound in high-risk pregnancies. *Cochrane Database Syst Rev* *6*, CD007529.
- Andersen, D.C., Laborda, J., Baladron, V., Kassem, M., Sheikh, S.P., and Jensen, C.H. (2013). Dual role of delta-like 1 homolog (*DLK1*) in skeletal muscle development and adult muscle regeneration. *Development* *140*, 3743–3753.
- Andreasen, L.A., Tabor, A., Nørgaard, L.N., Rode, L., Gerds, T.A., and Tolsgaard, M.G. (2021). Detection of growth-restricted fetuses during pregnancy is associated with fewer intrauterine deaths but increased adverse childhood outcomes: an observational study. *BJOG* *128*, 77–85.
- Angulo, M.A., Butler, M.G., and Cataletto, M.E. (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J Endocrinol Invest* *38*, 1249–1263.
- Ansell, P.J., Zhou, Y., Schjeide, B.-M., Kerner, A., Zhao, J., Zhang, X., and Klibanski, A. (2007). Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (*Dlk1*). *Mol Cell Endocrinol* *271*, 55–63.
- Appelbe, O.K., Yevtodiyenko, A., Muniz-Talavera, H., and Schmidt, J.V. (2013). Conditional deletions refine the embryonic requirement for *Dlk1*. *Mech Dev* *130*, 143–159.
- Arboleda, V.A., Lee, H., Parnaik, R., Fleming, A., Banerjee, A., Ferraz-de-Souza, B., Délot, E.C., Rodriguez-Fernandez, I.A., Braslavsky, D., Bergadá, I., et al. (2012). Mutations in the PCNA-binding domain of *CDKN1C* cause IMAGE syndrome. *Nature Genetics* *44*, 788–792.
- Azzi, S., Steunou, V., Rousseau, A., Rossignol, S., Thibaud, N., Danton, F., Le Jule, M., Gicquel, C., Le Bouc, Y., and Netchine, I. (2011). Allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR), a powerful method for diagnosing loss of imprinting of the 11p15 region in Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes. *Hum. Mutat.* *32*, 249–258.
- Azzi, S., Blaise, A., Steunou, V., Harbison, M.D., Salem, J., Brioude, F., Rossignol, S.,

- Habib, W.A., Thibaud, N., Neves, C.D., et al. (2014). Complex tissue-specific epigenotypes in Russell-Silver Syndrome associated with 11p15 ICR1 hypomethylation. *Hum. Mutat.* *35*, 1211–1220.
- Bak, M., Boonen, S.E., Dahl, C., Hahnemann, J.M.D., Mackay, D.J.D.G., Tümer, Z., Grønskov, K., Temple, I.K., Guldberg, P., and Tommerup, N. (2016). Genome-wide DNA methylation analysis of transient neonatal diabetes type 1 patients with mutations in ZFP57. *BMC Med Genet* *17*, 29.
- Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* *75*, 73–82.
- Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Gubina, E., Bonvini, E., and Laborda, J. (2001). Specific regions of the extracellular domain of dlk, an EGF-like homeotic protein involved in differentiation, participate in intramolecular interactions. *Front Biosci* *6*, A25-32.
- Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Nueda, M.L., Díaz-Guerra, M.J.M., García-Ramírez, J.J., Bonvini, E., Gubina, E., and Laborda, J. (2005). dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res* *303*, 343–359.
- Bar, S., and Benvenisty, N. (2019a). Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *EMBO J* *38*, e101033.
- Bar, S., and Benvenisty, N. (2019b). Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *EMBO J.* *38*.
- Bar, S., Schachter, M., Eldar-Geva, T., and Benvenisty, N. (2017). Large-Scale Analysis of Loss of Imprinting in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* *19*, 957–968.
- Barlow, D.P., Stöger, R., Herrmann, B.G., Saito, K., and Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* *349*, 84–87.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* *351*, 153–155.
- Barton, S.C., Surani, M.A., and Norris, M.L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* *311*, 374–376.
- Bayart, E., and Cohen-Haguenaer, O. (2013). Technological Overview of iPS Induction from Human Adult Somatic Cells. *Curr Gene Ther* *13*, 73–92.
- Begemann, M., Zirn, B., Santen, G., Wirthgen, E., Soellner, L., Büttel, H.-M., Schweizer, R., van Workum, W., Binder, G., and Eggermann, T. (2015). Paternally Inherited IGF2 Mutation and Growth Restriction. *N Engl J Med* *373*, 349–356.
- Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 191–198.
- Bell, A.C., West, A.G., and Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* *98*, 387–396.
- Benetatos, L., Vartholomatos, G., and Hatzimichael, E. (2011). MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer* *129*, 773–779.
- Benetatos, L., Hatzimichael, E., Londin, E., Vartholomatos, G., Loher, P., Rigoutsos, I., and Briasoulis, E. (2013). The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement



in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70, 795–814.

Benton, S.J., McCowan, L.M., Heazell, A.E.P., Gynspan, D., Hutcheon, J.A., Senger, C., Burke, O., Chan, Y., Harding, J.E., Yockell-Lelièvre, J., et al. (2016). Placental growth factor as a marker of fetal growth restriction caused by placental dysfunction. *Placenta* 42, 1–8.

Berteaux, N., Aptel, N., Cathala, G., Genton, C., Coll, J., Daccache, A., Spruyt, N., Hondermarck, H., Dugimont, T., Curgy, J.-J., et al. (2008). A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. *Mol Cell Biol* 28, 6731–6745.

Beygo, J., Citro, V., Sparago, A., De Crescenzo, A., Cerrato, F., Heitmann, M., Rademacher, K., Guala, A., Enklaar, T., Anichini, C., et al. (2013). The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet* 22, 544–557.

Bianco, A.C. (2011). Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology* 152, 3306–3311.

Bonev, B., Mendelson Cohen, N., Szabo, Q., Fritsch, L., Papadopoulos, G.L., Lubling, Y., Xu, X., Lv, X., Hugnot, J.-P., Tanay, A., et al. (2017). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell* 171, 557-572.e24.

Boonen, S.E., Mackay, D.J.G., Hahnemann, J.M.D., Docherty, L., Grønskov, K., Lehmann, A., Larsen, L.G., Haemers, A.P., Kockaerts, Y., Dooms, L., et al. (2013). Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care* 36, 505–512.

Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., and Bestor, T.H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536–2539.

Brandt, J., Schrauth, S., Veith, A.-M., Froschauer, A., Haneke, T., Schultheis, C., Gessler, M., Leimeister, C., and Volff, J.-N. (2005). Transposable elements as a source of genetic innovation: expression and evolution of a family of retrotransposon-derived neogenes in mammals. *Gene* 345, 101–111.

Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 10, 28–36.

Brioude, F., Oliver-Petit, I., Blaise, A., Praz, F., Rossignol, S., Le Jule, M., Thibaud, N., Faussat, A.-M., Tauber, M., Le Bouc, Y., et al. (2013). CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J. Med. Genet.* 50, 823–830.

Brioude, F., Netchine, I., Praz, F., Le Jule, M., Calmel, C., Lacombe, D., Edery, P., Catala, M., Odent, S., Isidor, B., et al. (2015). Mutations of the Imprinted CDKN1C Gene as a Cause of the Overgrowth Beckwith-Wiedemann Syndrome: Clinical Spectrum and Functional Characterization. *Hum. Mutat.* 36, 894–902.

Brioude, F., Kalish, J.M., Mussa, A., Foster, A.C., Bliet, J., Ferrero, G.B., Boonen, S.E., Cole, T., Baker, R., Bertolotti, M., et al. (2018). Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 14, 229–249.

Buiting, K., Kanber, D., Martín-Subero, J.I., Lieb, W., Terhal, P., Albrecht, B., Purmann, S., Gross, S., Lich, C., Siebert, R., et al. (2008). Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *Hum. Mutat.* 29, 1141–1146.

- Burnett, L.C., LeDuc, C.A., Sulsona, C.R., Paull, D., Eddiry, S., Levy, B., Salles, J.P., Tauber, M., Driscoll, D.J., Egli, D., et al. (2016). Induced pluripotent stem cells (iPSC) created from skin fibroblasts of patients with Prader-Willi syndrome (PWS) retain the molecular signature of PWS. *Stem Cell Res* 17, 526–530.
- Burton, G.J., and Jauniaux, E. (2018). Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 218, S745–S761.
- Cai, X., and Cullen, B.R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 13, 313–316.
- Caspary, T., Cleary, M.A., Baker, C.C., Guan, X.J., and Tilghman, S.M. (1998). Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol Cell Biol* 18, 3466–3474.
- Cattanach, B.M., and Kirk, M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315, 496–498.
- Cavaillé, J., Seitz, H., Paulsen, M., Ferguson-Smith, A.C., and Bachellerie, J.-P. (2002). Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Hum Mol Genet* 11, 1527–1538.
- Chacón, M.R., Miranda, M., Jensen, C.H., Fernández-Real, J.M., Vilarrasa, N., Gutiérrez, C., Näf, S., Gomez, J.M., and Vendrell, J. (2008). Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes (Lond)* 32, 1122–1129.
- Chamagne, M., Beffara, F., Patte, C., Vigouroux, C., and Renevier, B. (2021). Prise en charge du retard de croissance intra-utérin en France : enquête auprès des centres hospitalo-universitaires et maternités de type III. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* 49, 756–762.
- Chamberlain, S.J., Chen, P.-F., Ng, K.Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., and Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17668–17673.
- Chang, S., and Bartolomei, M.S. (2020). Modeling human epigenetic disorders in mice: Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Dis Model Mech* 13.
- Chang, S., Hur, S.K., Naveh, N.S.S., Thorvaldsen, J.L., French, D.L., Gagne, A.L., Jobaliya, C.D., Anguera, M.C., Bartolomei, M.S., and Kalish, J.M. (2020). Derivation and investigation of the first human cell-based model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Epigenetics* 1–11.
- Charalambous, M., da Rocha, S.T., Hernandez, A., and Ferguson-Smith, A.C. (2014). Perturbations to the IGF1 growth pathway and adult energy homeostasis following disruption of mouse chromosome 12 imprinting. *Acta Physiol (Oxf)* 210, 174–187.
- Cheung, L.Y.M., Rizzoti, K., Lovell-Badge, R., and Le Tissier, P.R. (2013). Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *J Neuroendocrinol* 25, 391–401.
- Cho, H.-J., Lee, C.-S., Kwon, Y.-W., Paek, J.S., Lee, S.-H., Hur, J., Lee, E.J., Roh, T.-Y., Chu, I.-S., Leem, S.-H., et al. (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 116, 386–395.
- Cleaton, M.A.M., Dent, C.L., Howard, M., Corish, J.A., Gutteridge, I., Sovio, U., Gaccioli,

F., Takahashi, N., Bauer, S.R., Charnock-Jones, D.S., et al. (2016). Fetus-derived DLK1 is required for maternal metabolic adaptations to pregnancy and is associated with fetal growth restriction. *Nat. Genet.* 48, 1473–1480.

Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C., et al. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417, 945–948.

Copel, J.A., and Bahtiyar, M.O. (2014). A practical approach to fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 123, 1057–1069.

Cottrell, H.N., Wu, J., Rimawi, B.H., Duran, J.M., Spencer, J.B., Sidell, N., and Rajakumar, A. (2017). Human endometrial stromal cell plasticity: Reversible sFlt1 expression negatively coincides with decidualization. *Hypertens Pregnancy* 36, 204–211.

Court, F., Baniol, M., Hagege, H., Petit, J.S., Lelay-Taha, M.-N., Carbonell, F., Weber, M., Cathala, G., and Forne, T. (2011). Long-range chromatin interactions at the mouse *Igf2/H19* locus reveal a novel paternally expressed long non-coding RNA. *Nucleic Acids Res* 39, 5893–5906.

Court, F., Martin-Trujillo, A., Romanelli, V., Garin, I., Iglesias-Platas, I., Salafsky, I., Guitart, M., Perez de Nanclares, G., Lapunzina, P., and Monk, D. (2013). Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes. *Hum Mutat* 34, 595–602.

Crovetto, F., Crispi, F., Scazzocchio, E., Mercade, I., Meler, E., Figueras, F., and Gratacos, E. (2014). First-trimester screening for early and late small-for-gestational-age neonates using maternal serum biochemistry, blood pressure and uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol* 43, 34–40.

Crovetto, F., Triunfo, S., Crispi, F., Rodriguez-Sureda, V., Roma, E., Dominguez, C., Gratacos, E., and Figueras, F. (2016). First-trimester screening with specific algorithms for early- and late-onset fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 48, 340–348.

Crovetto, F., Triunfo, S., Crispi, F., Rodriguez-Sureda, V., Dominguez, C., Figueras, F., and Gratacos, E. (2017). Differential performance of first-trimester screening in predicting small-for-gestational-age neonate or fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 49, 349–356.

Dauber, A., Muñoz-Calvo, M.T., Barrios, V., Domené, H.M., Kloverpris, S., Serra-Juhé, C., Desikan, V., Pozo, J., Muzumdar, R., Martos-Moreno, G.Á., et al. (2016). Mutations in pregnancy-associated plasma protein A2 cause short stature due to low IGF-I availability. *EMBO Mol Med* 8, 363–374.

Dauber, A., Cunha-Silva, M., Macedo, D.B., Brito, V.N., Abreu, A.P., Roberts, S.A., Montenegro, L.R., Andrew, M., Kirby, A., Weirauch, M.T., et al. (2017). Paternally Inherited DLK1 Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 1557–1567.

Daughaday, W.H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10, 68–91.

De Crescenzo, A., Coppola, F., Falco, P., Bernardo, I., Ausanio, G., Cerrato, F., Falco, L., and Riccio, A. (2011). A novel microdeletion in the *IGF2/H19* imprinting centre region defines a recurrent mutation mechanism in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Med Genet* 54, e451-454.

- De Crescenzo, A., Citro, V., Freschi, A., Sparago, A., Palumbo, O., Cubellis, M.V., Carella, M., Castelluccio, P., Cavaliere, M.L., Cerrato, F., et al. (2015). A splicing mutation of the HMGA2 gene is associated with Silver-Russell syndrome phenotype. *J. Hum. Genet.* *60*, 287–293.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., and Robertson, E.J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* *345*, 78–80.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* *64*, 849–859.
- Demars, J., Shmela, M.E., Rossignol, S., Okabe, J., Netchine, I., Azzi, S., Cabrol, S., Le Caignec, C., David, A., Le Bouc, Y., et al. (2010). Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 803–814.
- Díaz, M., Bassols, J., Aragonés, G., Mazarico, E., López-Bermejo, A., and Ibáñez, L. (2013). Decreased placental expression of pre-adipocyte factor-1 in children born small-for-gestational-age: association to early postnatal weight gain. *Placenta* *34*, 331–334.
- Dixit, A., Chandler, K.E., Lever, M., Poole, R.L., Bullman, H., Mughal, M.Z., Steggall, M., and Suri, M. (2013). Pseudohypoparathyroidism type 1b due to paternal uniparental disomy of chromosome 20q. *J Clin Endocrinol Metab* *98*, E103-108.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* *485*, 376–380.
- Dröge, L.A., Perschel, F.H., Stütz, N., Gafron, A., Frank, L., Busjahn, A., Henrich, W., and Verlohren, S. (2021). Prediction of Preeclampsia-Related Adverse Outcomes With the sFlt-1 (Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1)/PlGF (Placental Growth Factor)-Ratio in the Clinical Routine: A Real-World Study. *Hypertension* *77*, 461–471.
- Eggenchwiler, J., Ludwig, T., Fisher, P., Leighton, P.A., Tilghman, S.M., and Efstratiadis, A. (1997). Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev* *11*, 3128–3142.
- Eggermann, T., Heilsberg, A.-K., Bens, S., Siebert, R., Beygo, J., Buiting, K., Begemann, M., and Soellner, L. (2014). Additional molecular findings in 11p15-associated imprinting disorders: an urgent need for multi-locus testing. *J Mol Med (Berl)* *92*, 769–777.
- Ego, A. (2013). [Definitions: small for gestational age and intrauterine growth retardation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* *42*, 872–894.
- Ego, A., Subtil, D., Grange, G., Thiebaugeorges, O., Senat, M.-V., Vayssiere, C., and Zeitlin, J. (2008). Should parity be included in customised fetal weight standards for identifying small-for-gestational-age babies? Results from a French multicentre study. *BJOG* *115*, 1256–1264.
- Ego, A., Prunet, C., Blondel, B., Kaminski, M., Goffinet, F., and Zeitlin, J. (2016). [Customized and non-customized French intrauterine growth curves. II - Comparison with existing curves and benefits of customization]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* *45*, 165–176.
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* *32*, 519–528.

- Fay, T.N., Jacobs, I., Teisner, B., Poulsen, O., Chapman, M.G., Stabile, I., Bohn, H., Westergaard, J.G., and Grudzinskas, J.G. (1988). Two fetal antigens (FA-1 and FA-2) and endometrial proteins (PP12 and PP14) isolated from amniotic fluid; preliminary observations in fetal and maternal tissues. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *29*, 73–85.
- Feldt–Rasmussen, U., and Mathiesen, E.R. (2011). Endocrine disorders in pregnancy: Physiological and hormonal aspects of pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* *25*, 875–884.
- Finken, M.J.J., van der Steen, M., Smeets, C.C.J., Walenkamp, M.J.E., de Bruin, C., Hokken-Koelega, A.C.S., and Wit, J.M. (2018). Children born small for gestational age: differential diagnosis, molecular-genetic evaluation and implications. *Endocr. Rev.*
- Fitzpatrick, G.V., Soloway, P.D., and Higgins, M.J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet* *32*, 426–431.
- Fiúza, U.-M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* *194*, 459–474.
- Floridon, C., Jensen, C.H., Thorsen, P., Nielsen, O., Sunde, L., Westergaard, J.G., Thomsen, S.G., and Teisner, B. (2000). Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation* *66*, 49–59.
- Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M., and Nakao, M. (2000). Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* *20*, 5107–5118.
- Fus-Kujawa, A., Mendrek, B., Trybus, A., Bajdak-Rusinek, K., Stepień, K.L., and Sieron, A.L. (2021). Potential of Induced Pluripotent Stem Cells for Use in Gene Therapy: History, Molecular Bases, and Medical Perspectives. *Biomolecules* *11*, 699.
- Gabory, A., and Dandolo, L. (2005). [Epigenetics and development: genomic imprinting]. *Med Sci (Paris)* *21*, 390–395.
- Gabory, A., Ripoche, M.-A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyat, A., Forné, T., Jammes, H., Ainscough, J.F.X., Surani, M.A., Journot, L., et al. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development* *136*, 3413–3421.
- Gaccioli, F., Aye, I.L.M.H., Sovio, U., Charnock-Jones, D.S., and Smith, G.C.S. (2018). Screening for fetal growth restriction using fetal biometry combined with maternal biomarkers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *218*, S725–S737.
- Garcés, C., Ruiz-Hidalgo, M.J., Bonvini, E., Goldstein, J., and Laborda, J. (1999). Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk. *Differentiation* *64*, 103–114.
- Geoffron, S., Abi Habib, W., Chantot-Bastaraud, S., Dubern, B., Steunou, V., Azzi, S., Afenjar, A., Busa, T., Pinheiro Canton, A., Chalouhi, C., et al. (2018). Chromosome 14q32.2 Imprinted Region Disruption as an Alternative Molecular Diagnosis of Silver-Russell Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *103*, 2436–2446.
- Ghidini, A. (1996). Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. *Obstet Gynecol Surv* *51*, 376–382.
- Giabicani, E., Netchine, I., and Brioude, F. (2016). New clinical and molecular insights into Silver-Russell syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* *28*, 529–535.
- Giannoukakis, N., Deal, C., Paquette, J., Goodyer, C.G., and Polychronakos, C. (1993).

- Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet* 4, 98–101.
- Gibson, J.M., Aplin, J.D., White, A., and Westwood, M. (2001). Regulation of IGF bioavailability in pregnancy. *Mol Hum Reprod* 7, 79–87.
- Gicquel, C., and Le Bouc, Y. (2006). Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 65 *Suppl* 3, 28–33.
- Gicquel, C., Rossignol, S., Cabrol, S., Houang, M., Steunou, V., Barbu, V., Danton, F., Thibaud, N., Le Merrer, M., Burglen, L., et al. (2005). Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 37, 1003–1007.
- Gomes, L.G., Cunha-Silva, M., Crespo, R.P., Ramos, C.O., Montenegro, L.R., Canton, A., Lees, M., Spoudeas, H., Dauber, A., Macedo, D.B., et al. (2019). DLK1 Is a Novel Link Between Reproduction and Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 2112–2120.
- Gordijn, S.J., Beune, I.M., Thilaganathan, B., Papageorghiou, A., Baschat, A.A., Baker, P.N., Silver, R.M., Wynia, K., and Ganzevoort, W. (2016). Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound Obstet Gynecol* 48, 333–339.
- Griffin, M., Seed, P.T., Duckworth, S., North, R., Myers, J., Mackillop, L., Simpson, N., Waugh, J., Anumba, D., Kenny, L.C., et al. (2018). Predicting delivery of a small-for-gestational-age infant and adverse perinatal outcome in women with suspected pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 51, 387–395.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13625–13630.
- Gubina, E., Ruiz-Hidalgo, M.J., Baladrón, V., and Laborda, J. (1999). Assignment of DLK1 to human chromosome band 14q32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 84, 206–207.
- Gubina, E., Ruiz-Hidalgo, M.J., Baladrón, V., and Laborda, J. (2000). Assignment of dlk (Dlk1) to mouse chromosome band 12E-F1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 88, 322–323.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., and Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423–434.
- Haig, D. (1997). Parental antagonism, relatedness asymmetries, and genomic imprinting. *Proc Biol Sci* 264, 1657–1662.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 117, 15–23.
- Han, V.K., Bassett, N., Walton, J., and Challis, J.R. (1996). The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2680–2693.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52.

- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* *405*, 486–489.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., and Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* *129*, 1983–1993.
- Hayward, B.E., Moran, V., Strain, L., and Bonthron, D.T. (1998). Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15475–15480.
- Hernandez, A., Martinez, M.E., Fiering, S., Galton, V.A., and St Germain, D. (2006). Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest* *116*, 476–484.
- Heude, B., Forhan, A., Slama, R., Douhaud, L., Bedel, S., Saurel-Cubizolles, M.-J., Hankard, R., Thiebaugeorges, O., De Agostini, M., Annesi-Maesano, I., et al. (2016). Cohort Profile: The EDEN mother-child cohort on the prenatal and early postnatal determinants of child health and development. *Int J Epidemiol* *45*, 353–363.
- Hirasawa, R., and Feil, R. (2008). A KRAB domain zinc finger protein in imprinting and disease. *Dev Cell* *15*, 487–488.
- Holliday, R., and Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* *187*, 226–232.
- Holthuizen, P., van der Lee, F.M., Ikejiri, K., Yamamoto, M., and Sussenbach, J.S. (1990). Identification and initial characterization of a fourth leader exon and promoter of the human IGF-II gene. *Biochim Biophys Acta* *1087*, 341–343.
- Horii, T., Morita, S., Hino, S., Kimura, M., Hino, Y., Kogo, H., Nakao, M., and Hatada, I. (2020). Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome. *Genome Biol.* *21*, 77.
- Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T.C., Shirayoshi, Y., and Oshimura, M. (2000). Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* *9*, 2075–2083.
- Howard, M., and Charalambous, M. (2015a). Molecular basis of imprinting disorders affecting chromosome 14: lessons from murine models. *Reproduction* *149*, R237-249.
- Howard, M., and Charalambous, M. (2015b). Molecular basis of imprinting disorders affecting chromosome 14: lessons from murine models. *Reproduction* *149*, R237-249.
- Hu, J.F., Vu, T.H., and Hoffman, A.R. (1995). Differential biallelic activation of three insulin-like growth factor II promoters in the mouse central nervous system. *Mol Endocrinol* *9*, 628–636.
- Ikejiri, K., Wasada, T., Haruki, K., Hizuka, N., Hirata, Y., and Yamamoto, M. (1991). Identification of a novel transcription unit in the human insulin-like growth factor-II gene. *Biochem J* *280 ( Pt 2)*, 439–444.
- Ioannides, Y., Lokulo-Sodipe, K., Mackay, D.J.G., Davies, J.H., and Temple, I.K. (2014). Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J. Med. Genet.* *51*, 495–501.
- Istrail, S., Sutton, G.G., Florea, L., Halpern, A.L., Mobarry, C.M., Lippert, R., Walenz, B.,

- Shatkay, H., Dew, I., Miller, J.R., et al. (2004). Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1916–1921.
- Iwasa, Y. (1998). The conflict theory of genomic imprinting: how much can be explained? *Curr Top Dev Biol* *40*, 255–293.
- Jensen, C.H., Krogh, T.N., Højrup, P., Clausen, P.P., Skjødtt, K., Larsson, L.I., Enghild, J.J., and Teisner, B. (1994). Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2. *Eur J Biochem* *225*, 83–92.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.
- Kagami, M., Kurosawa, K., Miyazaki, O., Ishino, F., Matsuoka, K., and Ogata, T. (2015). Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* *23*, 1488–1498.
- Kagami, M., Nagasaki, K., Kosaki, R., Horikawa, R., Naiki, Y., Saitoh, S., Tajima, T., Yorifuji, T., Numakura, C., Mizuno, S., et al. (2017). Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet. Med.* *19*, 1356–1366.
- Kagami, M., Hara-Isono, K., Matsubara, K., Nakabayashi, K., Narumi, S., Fukami, M., Ohkubo, Y., Saito, H., Takada, S., and Ogata, T. (2021). ZNF445: a homozygous truncating variant in a patient with Temple syndrome and multilocus imprinting disturbance. *Clin Epigenetics* *13*, 119.
- Kaijser, M., Bonamy, A.-K.E., Akre, O., Cnattingius, S., Granath, F., Norman, M., and Ekblom, A. (2008). Perinatal risk factors for ischemic heart disease: disentangling the roles of birth weight and preterm birth. *Circulation* *117*, 405–410.
- Kalscheuer, V.M., Mariman, E.C., Schepens, M.T., Rehder, H., and Ropers, H.H. (1993). The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nat Genet* *5*, 74–78.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* *429*, 900–903.
- Kappil, M.A., Green, B.B., Armstrong, D.A., Sharp, A.J., Lambertini, L., Marsit, C.J., and Chen, J. (2015). Placental expression profile of imprinted genes impacts birth weight. *Epigenetics* *10*, 842–849.
- Kaufmann, P., Black, S., and Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* *69*, 1–7.
- Kim, K.-P., Thurston, A., Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Priddle, H., Allegrucci, C., Denning, C., and Young, L. (2007). Gene-specific vulnerability to imprinting variability in human embryonic stem cell lines. *Genome Res.* *17*, 1731–1742.
- Kishino, T., Lalonde, M., and Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* *15*, 70–73.
- Kobayashi, S., Wagatsuma, H., Ono, R., Ichikawa, H., Yamazaki, M., Tashiro, H., Aisaka, K., Miyoshi, N., Kohda, T., Ogura, A., et al. (2000). Mouse Peg9/Dlk1 and human PEG9/DLK1 are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: mouse Meg3/Gtl2 and human MEG3. *Genes Cells* *5*, 1029–1037.
- Kopchick, J.J., and Andry, J.M. (2000). Growth hormone (GH), GH receptor, and signal



transduction. *Mol Genet Metab* 71, 293–314.

Kotzot, D., Schmitt, S., Bernasconi, F., Robinson, W.P., Lurie, I.W., Ilyina, H., Méhes, K., Hamel, B.C., Otten, B.J., and Hergersberg, M. (1995). Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 4, 583–587.

Kurukuti, S., Tiwari, V.K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanenkova, V., Reik, W., and Ohlsson, R. (2006). CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to *Igf2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10684–10689.

Labialle, S., Marty, V., Bortolin-Cavaillé, M.-L., Hoareau-Osman, M., Pradère, J.-P., Valet, P., Martin, P.G.P., and Cavaillé, J. (2014). The miR-379/miR-410 cluster at the imprinted *Dlk1-Dio3* domain controls neonatal metabolic adaptation. *EMBO J* 33, 2216–2230.

Lande, A., Kroken, M., Rabben, K., and Retterstøl, L. (2018). Temple syndrome as a differential diagnosis to Prader–Willi syndrome: Identifying three new patients. *American Journal of Medical Genetics Part A* 176, 175–180.

Larsen, J.B., Jensen, C.H., Schrøder, H.D., Teisner, B., Bjerre, P., and Hagen, C. (1996). Fetal antigen 1 and growth hormone in pituitary somatotroph cells. *Lancet* 347, 191.

Le Roith, D. (2003). The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res* 4, 205–212.

Lee, J.T. (2012). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* 338, 1435–1439.

Lee, J.E., Pintar, J., and Efstratiadis, A. (1990). Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* 110, 151–159.

Lee, K., Villena, J.A., Moon, Y.S., Kim, K.-H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H.S. (2003a). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 111, 453–461.

Lee, M.P., Hu, R.J., Johnson, L.A., and Feinberg, A.P. (1997). Human *KVLQT1* gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 15, 181–185.

Lee, P.A., Chernausk, S.D., Hokken-Koelega, A.C.S., Czernichow, P., and International Small for Gestational Age Advisory Board (2003b). International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24–October 1, 2001. *Pediatrics* 111, 1253–1261.

Lees, C.C., Stampalija, T., Baschat, A.A., da Silva Costa, F., Ferrazzi, E., Figueras, F., Hecher, K., Kingdom, J., Poon, L.C., Salomon, L.J., et al. (2020). ISUOG Practice Guidelines: diagnosis and management of small-for-gestational-age fetus and fetal growth restriction. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 56, 298–312.

Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., and Tilghman, S.M. (1995). Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 375, 34–39.

Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865–873.

Lewis, A., Mitsuya, K., Umlauf, D., Smith, P., Dean, W., Walter, J., Higgins, M., Feil, R., and Reik, W. (2004). Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat. Genet.* 36, 1291–1295.

- Lewitt, M.S., Scott, F.P., Clarke, N.M., and Baxter, R.C. (1995). Developmental regulation of circulating insulin-like growth factor-binding proteins in normal pregnancies and in pre-eclampsia. *Prog Growth Factor Res* 6, 475–480.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673.
- Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362–365.
- Li, L., Forman, S.J., and Bhatia, R. (2005). Expression of DLK1 in hematopoietic cells results in inhibition of differentiation and proliferation. *Oncogene* 24, 4472–4476.
- Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P., and Ferguson-Smith, A.C. (2008). A Maternal-Zygotic Effect Gene, *Zfp57*, Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. *Developmental Cell* 15, 547–557.
- Lin, S.-P., Youngson, N., Takada, S., Seitz, H., Reik, W., Paulsen, M., Cavaille, J., and Ferguson-Smith, A.C. (2003). Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet* 35, 97–102.
- Lindor, N.M., Ney, J.A., Gaffey, T.A., Jenkins, R.B., Thibodeau, S.N., and Dewald, G.W. (1992). A genetic review of complete and partial hydatidiform moles and nonmolar triploidy. *Mayo Clin Proc* 67, 791–799.
- Lindqvist, P.G., and Molin, J. (2005). Does antenatal identification of small-for-gestational age fetuses significantly improve their outcome? *Ultrasound Obstet Gynecol* 25, 258–264.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (*Igf-1*) and type 1 IGF receptor (*Igf1r*). *Cell* 75, 59–72.
- Llères, D., Moindrot, B., Pathak, R., Piras, V., Matelot, M., Pignard, B., Marchand, A., Poncelet, M., Perrin, A., Tellier, V., et al. (2019). CTCF modulates allele-specific sub-TAD organization and imprinted gene activity at the mouse *Dlk1-Dio3* and *Igf2-H19* domains. *Genome Biol* 20, 272.
- Llères, D., Imaizumi, Y., and Feil, R. (2021). Exploring chromatin structural roles of non-coding RNAs at imprinted domains. *Biochem Soc Trans* 49, 1867–1879.
- Lopes, S., Lewis, A., Hajkova, P., Dean, W., Oswald, J., Forné, T., Murrell, A., Constância, M., Bartolomei, M., Walter, J., et al. (2003). Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum. Mol. Genet.* 12, 295–305.
- Lustig, O., Ariel, I., Ilan, J., Lev-Lehman, E., De-Groot, N., and Hochberg, A. (1994). Expression of the imprinted gene *H19* in the human fetus. *Mol Reprod Dev* 38, 239–246.
- MacDonald, R.G., Pfeffer, S.R., Coussens, L., Tepper, M.A., Brocklebank, C.M., Mole, J.E., Anderson, J.K., Chen, E., Czech, M.P., and Ullrich, A. (1988). A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* 239, 1134–1137.
- MacDonald, T.M., Walker, S.P., Hiscock, R., Cannon, P., Harper, A., Murray, E., Hui, L., Dane, K., Middleton, A., Kyritsis, V., et al. (2020). Circulating Delta-like homolog 1 (*DLK1*) at 36 weeks is correlated with birthweight and is of placental origin. *Placenta* 91, 24–30.
- Mackay, D.J.G., and Temple, I.K. (2017). Human imprinting disorders: Principles, practice, problems and progress. *European Journal of Medical Genetics* 60, 618–626.

- Mackay, D.J.G., Callaway, J.L.A., Marks, S.M., White, H.E., Acerini, C.L., Boonen, S.E., Dayanikli, P., Firth, H.V., Goodship, J.A., Haemers, A.P., et al. (2008). Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet* 40, 949–951.
- Mackay, D.J.G., Eggermann, T., Buiting, K., Garin, I., Netchine, I., Linglart, A., and de Nanclares, G.P. (2015). Multilocus methylation defects in imprinting disorders. *Biomol Concepts* 6, 47–57.
- Marsaud, C., Rossignol, S., Tounian, P., Netchine, I., and Dubern, B. (2015). Prevalence and management of gastrointestinal manifestations in Silver-Russell syndrome. *Arch. Dis. Child.* 100, 353–358.
- Matsuoka, S., Thompson, J.S., Edwards, M.C., Bartletta, J.M., Grundy, P., Kalikin, L.M., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Feinberg, A.P. (1996). Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3026–3030.
- McGrath, J., and Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179–183.
- McLaughlin, K.J., Szabó, P., Haegel, H., and Mann, J.R. (1996). Mouse embryos with paternal duplication of an imprinted chromosome 7 region die at midgestation and lack placental spongiotrophoblast. *Development* 122, 265–270.
- Mei, B., Zhao, L., Chen, L., and Sul, H.S. (2002). Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J* 364, 137–144.
- Meienberg, J., Bruggmann, R., Oexle, K., and Matyas, G. (2016). Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet* 135, 359–362.
- Meyer, R., Begemann, M., Hübner, C.T., Dey, D., Kuechler, A., Elgizouli, M., Schara, U., Ambrozaityte, L., Burnyte, B., Schröder, C., et al. (2021). One test for all: whole exome sequencing significantly improves the diagnostic yield in growth retarded patients referred for molecular testing for Silver-Russell syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 16, 42.
- Mifsud, W., and Sebire, N.J. (2014). Placental pathology in early-onset and late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther* 36, 117–128.
- Miller, J., Turan, S., and Baschat, A.A. (2008). Fetal growth restriction. *Semin. Perinatol.* 32, 274–280.
- Miranda, J., Rodriguez-Lopez, M., Triunfo, S., Sairanen, M., Kouru, H., Parra-Saavedra, M., Crovetto, F., Figueras, F., Crispi, F., and Gratacós, E. (2017). Prediction of fetal growth restriction using estimated fetal weight vs a combined screening model in the third trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 50, 603–611.
- Miyaoka, Y., Tanaka, M., Imamura, T., Takada, S., and Miyajima, A. (2010). A novel regulatory mechanism for Fgf18 signaling involving cysteine-rich FGF receptor (Cfr) and delta-like protein (Dlk). *Development* 137, 159–167.
- Mohammad, F., Pandey, R.R., Nagano, T., Chakalova, L., Mondal, T., Fraser, P., and Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1/Lit1 noncoding RNA mediates transcriptional silencing by targeting to the perinucleolar region. *Mol Cell Biol* 28, 3713–3728.
- Mol, B.W.J., Roberts, C.T., Thangaratinam, S., Magee, L.A., de Groot, C.J.M., and Hofmeyr, G.J. (2016). Pre-eclampsia. *Lancet* 387, 999–1011.

- Monier, I., Blondel, B., Ego, A., Kaminiski, M., Goffinet, F., and Zeitlin, J. (2015). Poor effectiveness of antenatal detection of fetal growth restriction and consequences for obstetric management and neonatal outcomes: a French national study. *BJOG* *122*, 518–527.
- Monk, D., Sanches, R., Arnaud, P., Apostolidou, S., Hills, F.A., Abu-Amero, S., Murrell, A., Friess, H., Reik, W., Stanier, P., et al. (2006). Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet* *15*, 1259–1269.
- Montenegro, L., Labarta, J.I., Piovesan, M., Canton, A.P.M., Corripio, R., Soriano-Guillén, L., Travieso-Suárez, L., Martín-Rivada, Á., Barrios, V., Seraphim, C.E., et al. (2020). Novel Genetic and Biochemical Findings of DLK1 in Children with Central Precocious Puberty: A Brazilian-Spanish Study. *J Clin Endocrinol Metab* *105*.
- Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.-H., Yun, E.J., and Sul, H.S. (2002). Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5585–5592.
- Moore, T., and Haig, D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* *7*, 45–49.
- Moore, T., and Reik, W. (1996). Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. *Rev Reprod* *1*, 73–77.
- Mortensen, S.B., Jensen, C.H., Schneider, M., Thomassen, M., Kruse, T.A., Laborda, J., Sheikh, S.P., and Andersen, D.C. (2012). Membrane-tethered delta-like 1 homolog (DLK1) restricts adipose tissue size by inhibiting preadipocyte proliferation. *Diabetes* *61*, 2814–2822.
- Murrell, A., Heeson, S., and Reik, W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet* *36*, 889–893.
- Netchine, I., Rossignol, S., Dufourg, M.-N., Azzi, S., Rousseau, A., Perin, L., Houang, M., Steunou, V., Esteva, B., Thibaud, N., et al. (2007). 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 3148–3154.
- Neuheuser, L., Meyer, R., Begemann, M., Elbracht, M., and Eggermann, T. (2019). Next generation sequencing and imprinting disorders: Current applications and future perspectives: Lessons from Silver-Russell syndrome. *Molecular and Cellular Probes* *44*, 1–7.
- Newsome, C.A., Shiell, A.W., Fall, C.H.D., Phillips, D.I.W., Shier, R., and Law, C.M. (2003). Is birth weight related to later glucose and insulin metabolism?--A systematic review. *Diabet. Med.* *20*, 339–348.
- Nissley, S.P., Haskell, J.F., Sasaki, N., De Vroede, M.A., and Rechler, M.M. (1985). Insulin-like growth factor receptors. *J Cell Sci Suppl* *3*, 39–51.
- Noordermeer, D., and Feil, R. (2020). Differential 3D chromatin organization and gene activity in genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* *61*, 17–24.
- Nora, E.P., Goloborodko, A., Valton, A.-L., Gibcus, J.H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L.A., and Bruneau, B.G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* *169*, 930-944.e22.
- Nueda, M.-L., García-Ramírez, J.J., Laborda, J., and Baladrón, V. (2008). *dlk1* specifically

interacts with insulin-like growth factor binding protein 1 to modulate adipogenesis of 3T3-L1 cells. *J Mol Biol* 379, 428–442.

Okae, H., Chiba, H., Hiura, H., Hamada, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Kikuchi, H., Yoshida, H., Tanaka, A., Suyama, M., et al. (2014). Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet* 10, e1004868.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Onyango, P., and Feinberg, A.P. (2011). A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16759–16764.

Pachnis, V., Belayew, A., and Tilghman, S.M. (1984). Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5523–5527.

de Pagter-Holthuizen, P., Jansen, M., van Schaik, F.M., van der Kammen, R., Oosterwijk, C., Van den Brande, J.L., and Sussenbach, J.S. (1987). The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters. *FEBS Lett* 214, 259–264.

Paik, S., Maule, F., and Gallo, M. (2021). Dysregulation of chromatin organization in pediatric and adult brain tumors: oncoepigenomic contributions to tumorigenesis and cancer stem cell properties. *Genome* 64, 326–336.

Patten, M.M., Cowley, M., Oakey, R.J., and Feil, R. (2016). Regulatory links between imprinted genes: evolutionary predictions and consequences. *Proc. Biol. Sci.* 283.

Petry, C.J., Burling, K.A., Barker, P., Hughes, I.A., Ong, K.K., and Dunger, D.B. (2021). Pregnancy Serum DLK1 Concentrations Are Associated With Indices of Insulin Resistance and Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 106, e2413–e2422.

Pfeifer, K., Leighton, P.A., and Tilghman, S.M. (1996). The structural H19 gene is required for transgene imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13876–13883.

Pham, N.V., Nguyen, M.T., Hu, J.F., Vu, T.H., and Hoffman, A.R. (1998). Dissociation of IGF2 and H19 imprinting in human brain. *Brain Res* 810, 1–8.

Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B., and Brosens, I. (1980). Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1, 3–19.

Poole, R.L., Leith, D.J., Docherty, L.E., Shmela, M.E., Gicquel, C., Splitt, M., Temple, I.K., and Mackay, D.J.G. (2012). Beckwith-Wiedemann syndrome caused by maternally inherited mutation of an OCT-binding motif in the IGF2/H19-imprinting control region, ICR1. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 240–243.

Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P.V., Grimaldi, G., Riccio, A., et al. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell* 44, 361–372.

Ransohoff, J.D., Wei, Y., and Khavari, P.A. (2018). The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 143–157.

Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., et al. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159, 1665–1680.

- Reik, W., and Walter, J. (2001). Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet* 27, 255–256.
- Reik, W., Brown, K.W., Schneid, H., Le Bouc, Y., Bickmore, W., and Maher, E.R. (1995). Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum Mol Genet* 4, 2379–2385.
- Ripoche, M.A., Kress, C., Poirier, F., and Dandolo, L. (1997). Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes Dev* 11, 1596–1604.
- Riso, V., Cammisa, M., Kukreja, H., Anvar, Z., Verde, G., Sparago, A., Acurzio, B., Lad, S., Lonardo, E., Sankar, A., et al. (2016). ZFP57 maintains the parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes and differentially affects non-imprinted targets in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 44, 8165–8178.
- da Rocha, S.T., Edwards, C.A., Ito, M., Ogata, T., and Ferguson-Smith, A.C. (2008). Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet.* 24, 306–316.
- Roland, C.S., Hu, J., Ren, C.-E., Chen, H., Li, J., Varvoutis, M.S., Leaphart, L.W., Byck, D.B., Zhu, X., and Jiang, S.-W. (2016). Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Cell Mol Life Sci* 73, 365–376.
- Rosa, A.L., Wu, Y.-Q., Kwabi-Addo, B., Coveler, K.J., Reid Sutton, V., and Shaffer, L.G. (2005). Allele-specific methylation of a functional CTCF binding site upstream of MEG3 in the human imprinted domain of 14q32. *Chromosome Res.* 13, 809–818.
- Rotwein, P. (2018). The complex genetics of human insulin-like growth factor 2 are not reflected in public databases. *J. Biol. Chem.* 293, 4324–4333.
- Rotwein, P., and Hall, L.J. (1990). Evolution of insulin-like growth factor II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. *DNA Cell Biol* 9, 725–735.
- Rovina, D., La Vecchia, M., Cortesi, A., Fontana, L., Pesant, M., Maitz, S., Tabano, S., Bodega, B., Miozzo, M., and Sirchia, S.M. (2020). Profound alterations of the chromatin architecture at chromosome 11p15.5 in cells from Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes patients. *Sci Rep* 10, 8275.
- Ruiz-Hidalgo, M.J., Gubina, E., Tull, L., Baladrón, V., and Laborda, J. (2002). dlk modulates mitogen-activated protein kinase signaling to allow or prevent differentiation. *Exp Cell Res* 274, 178–188.
- Russell, A. (1954). A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with craniofacial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc. R. Soc. Med.* 47, 1040–1044.
- Sakaguchi, R., Okamura, E., Matsuzaki, H., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. (2013). Sox-Oct motifs contribute to maintenance of the unmethylated H19 ICR in YAC transgenic mice. *Hum Mol Genet* 22, 4627–4637.
- Salmon, W.D., and Daughaday, W.H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49, 825–836.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.
- Sanchez-Delgado, M., Court, F., Vidal, E., Medrano, J., Monteagudo-Sánchez, A., Martín-Trujillo, A., Tayama, C., Iglesias-Platas, I., Kondova, I., Bontrop, R., et al. (2016). Human Oocyte-Derived Methylation Differences Persist in the Placenta Revealing Widespread

Transient Imprinting. *PLoS Genet* 12, e1006427.

Saudi Mendeliome Group (2015). Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol* 16, 134.

Schmidt, J.V., Matteson, P.G., Jones, B.K., Guan, X.J., and Tilghman, S.M. (2000). The *Dlk1* and *Gtl2* genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev* 14, 1997–2002.

Schrey, S., Wurst, U., Ebert, T., Kralisch, S., Drewlo, S., Stepan, H., Lössner, U., Platz, M., Kratzsch, J., Stumvoll, M., et al. (2015). The adipokine preadipocyte factor-1 is downregulated in preeclampsia and expressed in placenta. *Cytokine* 75, 338–343.

Schuster-Gossler, K., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., Zachgo, J., and Gossler, A. (1996). *Gtl2lacZ*, an insertional mutation on mouse chromosome 12 with parental origin-dependent phenotype. *Mamm Genome* 7, 20–24.

Schuster-Gossler, K., Bilinski, P., Sado, T., Ferguson-Smith, A., and Gossler, A. (1998). The mouse *Gtl2* gene is differentially expressed during embryonic development, encodes multiple alternatively spliced transcripts, and may act as an RNA. *Dev Dyn* 212, 214–228.

Scott, M.S., and Ono, M. (2011). From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* 93, 1987–1992.

Sekita, Y., Wagatsuma, H., Irie, M., Kobayashi, S., Kohda, T., Matsuda, J., Yokoyama, M., Ogura, A., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., et al. (2006). Aberrant regulation of imprinted gene expression in *Gtl2lacZ* mice. *Cytogenet Genome Res* 113, 223–229.

Sekita, Y., Wagatsuma, H., Nakamura, K., Ono, R., Kagami, M., Wakisaka, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Ogura, A., et al. (2008). Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 40, 243–248.

Shin, S., Suh, Y., Zerby, H.N., and Lee, K. (2014). Membrane-bound delta-like 1 homolog (*Dlk1*) promotes while soluble *Dlk1* inhibits myogenesis in C2C12 cells. *FEBS Lett* 588, 1100–1108.

Silver, R.M. (2018). Examining the link between placental pathology, growth restriction, and stillbirth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 49, 89–102.

Silver, H.K., Kiyasu, W., George, J., and Deamer, W.C. (1953). Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* 12, 368–376.

Slaaby, R., Schäffer, L., Lautrup-Larsen, I., Andersen, A.S., Shaw, A.C., Mathiasen, I.S., and Brandt, J. (2006). Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. *J Biol Chem* 281, 25869–25874.

Smallwood, S.A., and Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* 28, 33–42.

Smas, C.M., and Sul, H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725–734.

Smas, C.M., Chen, L., and Sul, H.S. (1997). Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 977–988.

Soellner, L., Begemann, M., Degenhardt, F., Geipel, A., Eggermann, T., and Mangold, E. (2017). Maternal heterozygous *NLRP7* variant results in recurrent reproductive failure and

imprinting disturbances in the offspring. *Eur J Hum Genet* 25, 924–929.

Spence, D., Stewart, M.C., Alderdice, F.A., Patterson, C.C., and Halliday, H.L. (2012). Intra-uterine growth restriction and increased risk of hypertension in adult life: a follow-up study of 50-year-olds. *Public Health* 126, 561–565.

Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175–181.

Stadtfeld, M., Apostolou, E., Ferrari, F., Choi, J., Walsh, R.M., Chen, T., Ooi, S.S.K., Kim, S.Y., Bestor, T.H., Shioda, T., et al. (2012). Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat. Genet.* 44, 398–405, S1-2.

Stegers, E.A.P., von Dadelszen, P., Duvekot, J.J., and Pijnenborg, R. (2010). Pre-eclampsia. *Lancet* 376, 631–644.

Steele-Perkins, G., Turner, J., Edman, J.C., Hari, J., Pierce, S.B., Stover, C., Rutter, W.J., and Roth, R.A. (1988). Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 263, 11486–11492.

Stelzer, Y., Sagi, I., Yanuka, O., Eiges, R., and Benvenisty, N. (2014). The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. *Nat. Genet.* 46, 551–557.

Steshina, E.Y., Carr, M.S., Glick, E.A., Yevtodiyenko, A., Appelbe, O.K., and Schmidt, J.V. (2006). Loss of imprinting at the Dlk1-Gtl2 locus caused by insertional mutagenesis in the Gtl2 5' region. *BMC Genet* 7, 44.

Sussenbach, J.S., Steenbergh, P.H., and Holthuizen, P. (1992). Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul* 2, 1–9.

Sussenbach, J.S., Rodenburg, R.J., Scheper, W., and Holthuizen, P. (1993). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the human IGF-II gene expression. *Adv Exp Med Biol* 343, 63–71.

Takada, S., Paulsen, M., Tevendale, M., Tsai, C.-E., Kelsey, G., Cattanach, B.M., and Ferguson-Smith, A.C. (2002). Epigenetic analysis of the Dlk1-Gtl2 imprinted domain on mouse chromosome 12: implications for imprinting control from comparison with Igf2-H19. *Hum Mol Genet* 11, 77–86.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

Takahashi, N., Okamoto, A., Kobayashi, R., Shirai, M., Obata, Y., Ogawa, H., Sotomaru, Y., and Kono, T. (2009). Deletion of Gtl2, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. *Hum Mol Genet* 18, 1879–1888.

Takahashi, N., Gray, D., Strogantsev, R., Noon, A., Delahaye, C., Skarnes, W.C., Tate, P.H., and Ferguson-Smith, A.C. (2015). ZFP57 and the Targeted Maintenance of Postfertilization Genomic Imprints. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 80, 177–187.

Takahashi, N., Coluccio, A., Thorball, C.W., Planet, E., Shi, H., Offner, S., Turelli, P.,



- Imbeault, M., Ferguson-Smith, A.C., and Trono, D. (2019). ZNF445 is a primary regulator of genomic imprinting. *Genes Dev* 33, 49–54.
- Temple, I.K., Cockwell, A., Hassold, T., Pettay, D., and Jacobs, P. (1991). Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Journal of Medical Genetics* 28, 511–514.
- Tian, M., Reichetzeder, C., Li, J., and Hocher, B. (2019). Low birth weight, a risk factor for diseases in later life, is a surrogate of insulin resistance at birth. *Journal of Hypertension Publish Ahead of Print*.
- Tian, X., Pascal, G., and Monget, P. (2009). Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* 9, 202.
- Tierling, S., Dalbert, S., Schoppenhorst, S., Tsai, C.-E., Oligier, S., Ferguson-Smith, A.C., Paulsen, M., and Walter, J. (2006). High-resolution map and imprinting analysis of the Gtl2-Dnch1 domain on mouse chromosome 12. *Genomics* 87, 225–235.
- Tornehave, D., Fay, T.N., Teisner, B., Chemnitz, J., Westergaard, J.G., and Grudzinskas, J.G. (1989). Two fetal antigens (FA-1 and FA-2) and endometrial proteins (PP12 and PP14) isolated from amniotic fluid: localisation in the fetus and adult female genital tract. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 30, 221–232.
- Tornehave, D., Jansen, P., Teisner, B., Rasmussen, H.B., Chemnitz, J., and Moscoso, G. (1993). Fetal antigen 1 (FA1) in the human pancreas: cell type expression, topological and quantitative variations during development. *Anat Embryol (Berl)* 187, 335–341.
- Traustadóttir, G.Á., Jensen, C.H., Thomassen, M., Beck, H.C., Mortensen, S.B., Laborda, J., Baladrón, V., Sheikh, S.P., and Andersen, D.C. (2016). Evidence of non-canonical NOTCH signaling: Delta-like 1 homolog (DLK1) directly interacts with the NOTCH1 receptor in mammals. *Cell Signal* 28, 246–254.
- Traustadóttir, G.Á., Jensen, C.H., Garcia Ramirez, J.J., Beck, H.C., Sheikh, S.P., and Andersen, D.C. (2017). The non-canonical NOTCH1 ligand Delta-like 1 homolog (DLK1) self interacts in mammals. *Int J Biol Macromol* 97, 460–467.
- Traustadóttir, G.Á., Lagoni, L.V., Ankerstjerne, L.B.S., Bisgaard, H.C., Jensen, C.H., and Andersen, D.C. (2019). The imprinted gene Delta like non-canonical Notch ligand 1 (Dlk1) is conserved in mammals, and serves a growth modulatory role during tissue development and regeneration through Notch dependent and independent mechanisms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 46, 17–27.
- Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Akin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., et al. (2006). Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev. Cell* 11, 711–722.
- Velychko, S., Adachi, K., Kim, K.-P., Hou, Y., MacCarthy, C.M., Wu, G., and Schöler, H.R. (2019). Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* 25, 737-753.e4.
- Vollgraff Heidweiller-Schreurs, C.A., De Boer, M.A., Heymans, M.W., Schoonmade, L.J., Bossuyt, P.M.M., Mol, B.W.J., De Groot, C.J.M., and Bax, C.J. (2018). Prognostic accuracy of cerebroplacental ratio and middle cerebral artery Doppler for adverse perinatal outcome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 51, 313–322.
- Vu, T.H., and Hoffman, A.R. (1994). Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature* 371, 714–717.
- Waddington, C.H. (1942). Canalization of Development and the Inheritance of Acquired

Characters. *Nature* 150, 563–565.

Wakeling, E.L., Brioude, F., Lokulo-Sodipe, O., O’Connell, S.M., Salem, J., Bliet, J., Canton, A.P.M., Chrzanowska, K.H., Davies, J.H., Dias, R.P., et al. (2017). Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 13, 105–124.

Wang, Y., Kim, K.-A., Kim, J.-H., and Sul, H.S. (2006). Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J. Nutr.* 136, 2953–2956.

Wang, Y., Zhao, L., Smas, C., and Sul, H.S. (2010). Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 30, 3480–3492.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.

Werner, H., Woloschak, M., Adamo, M., Shen-Orr, Z., Roberts, C.T., and LeRoith, D. (1989). Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7451–7455.

Weth, O., and Renkawitz, R. (2011). CTCF function is modulated by neighboring DNA binding factors. *Biochem. Cell Biol.* 89, 459–468.

Wiedemann, H.R. (1964). [FAMILIAL MALFORMATION COMPLEX WITH UMBILICAL HERNIA AND MACROGLOSSIA--A “NEW SYNDROME”?]. *J Genet Hum* 13, 223–232.

Woods, K.A., Camacho-Hübner, C., Savage, M.O., and Clark, A.J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.* 335, 1363–1367.

Yan, X., Baxter, R.C., and Firth, S.M. (2010). Involvement of pregnancy-associated plasma protein-A2 in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 proteolysis during pregnancy: a potential mechanism for increasing IGF bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 1412–1420.

Yevtodiyenko, A., and Schmidt, J.V. (2006). Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Dev Dyn* 235, 1115–1123.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237–241.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.

Yu, Y.-C., Jiang, Y., Yang, M.-M., He, S.-N., Xi, X., Xu, Y.-T., Hu, W.-S., and Luo, Q. (2019). Hypermethylation of delta-like homolog 1/maternally expressed gene 3 loci in human umbilical veins: insights into offspring vascular dysfunction born after preeclampsia. *J Hypertens* 37, 581–589.

Zeisler, H., Llorba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A.C., Sennström, M., Olovsson, M., Brennecke, S.P., Stepan, H., Allegranza, D., et al. (2016a). Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med* 374, 13–22.

Zeisler, H., Hund, M., and Verlohren, S. (2016b). The sFlt-1:PIGF Ratio in Women with

Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med* 374, 1785–1786.

Zeng, Liu, and Li, S. (2017). Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review. *Annals of Nutrition & Metabolism* 70.

Zhang, G., and Pradhan, S. (2014). Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* 66, 240–256.

Zhang, Y., and Tycko, B. (1992). Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet* 1, 40–44.

Zimmerman, D.L., Boddy, C.S., and Schoenherr, C.S. (2013). Oct4/Sox2 binding sites contribute to maintaining hypomethylation of the maternal *igf2/h19* imprinting control region. *PLoS One* 8, e81962.

Zuo, X., Sheng, J., Lau, H.-T., McDonald, C.M., Andrade, M., Cullen, D.E., Bell, F.T., Iacovino, M., Kyba, M., Xu, G., et al. (2012). Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 287, 2107–2118.

Zwierzina, M.E., Ejaz, A., Bitsche, M., Blumer, M.J.F., Mitterberger, M.C., Mattesich, M., Amann, A., Kaiser, A., Pechriggl, E.J., Hörl, S., et al. (2015). Characterization of DLK1(PREF1)<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells in vascular stroma of human white adipose tissue. *Stem Cell Res* 15, 403–418.

**ANNEXE**

Article de revue publié en 2<sup>ème</sup> auteur : Diagnosis and management of postnatal fetal growth restriction

Eloïse Giabicani, Aurélie Pham, Frédéric Brioude, Delphine Mitanchez, Irène Netchine

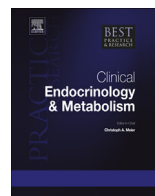
***Review Best Pract Res Clin Endocrinol Metab***  
**2018 Aug;32(4):523-534**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/beem](http://www.elsevier.com/locate/beem)

11

### Diagnosis and management of postnatal fetal growth restriction



Eloïse Giabicani, MD, PhD Student <sup>a</sup>,  
Aurélie Pham, MD, PhD Student <sup>b</sup>,  
Frédéric Brioude, MD, PhD, Associate Professor <sup>a</sup>,  
Delphine Mitanchez, MD, PhD, Professor <sup>b</sup>,  
Irène Netchine, MD, PhD, Professor <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 938 Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, F-75012, Paris, France

<sup>b</sup> Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 938 Centre de Recherche Saint Antoine, APHP, Hôpital Armand Trousseau, Néonatalogie, F-75012, Paris, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Available online 5 April 2018

##### Keywords:

fetal growth restriction  
small for gestational age  
intra-uterine growth retardation  
imprinted disorders  
IGF system  
Silver–Russell syndrome

Fetal growth restriction (FGR) can result from multiple causes, such as genetic, epigenetic, environment, hormonal regulation, or vascular troubles and their potential interaction. The physiopathology of FGR is not yet fully elucidated, but the insulin-like growth factor system is known to play a central role. Specific clinical features can lead to the identification of genetic syndromes in some patients. FGR leads to multiple global health concerns, from the perinatal period, with higher morbidity/mortality, through infancy, with neurodevelopmental, growth, and metabolic issues, to the onset of puberty and later in life, with subfertility and elevated risks of cardiovascular and kidney diseases. Adequate follow-up and therapeutics should be offered to these patients. We first review the main molecular etiologies leading to FGR and their specificities. We then highlight the main issues that FGR can raise later in life before concluding with the proposed management of these children.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Hôpital Armand Trousseau, 26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012, Paris, France. Fax: +33144736127.

E-mail addresses: [eloise.giabicani@aphp.fr](mailto:eloise.giabicani@aphp.fr) (E. Giabicani), [aurelie.pham@inserm.fr](mailto:aurelie.pham@inserm.fr) (A. Pham), [frederic.brioude@aphp.fr](mailto:frederic.brioude@aphp.fr) (F. Brioude), [delphine.mitanchez@aphp.fr](mailto:delphine.mitanchez@aphp.fr) (D. Mitanchez), [irene.netchine@aphp.fr](mailto:irene.netchine@aphp.fr) (I. Netchine).

## Introduction

The definition of fetal growth restriction (FGR) is still debated and generally includes children with intra-uterine growth restriction (IUGR) and/or those born small for their gestational age (SGA). In 2001, an international consensus defined being SGA as having a birth weight and/or length  $>2$  standard deviations score (SDS) below the mean for gestational age [1–3]. Nevertheless, this definition is still not universally accepted and numerous studies use low birth weight (LBW) ( $<2500$  g), irrespective of the term, or a weight and/or length at birth below the 10th percentile [4,5]. The diagnosis of IUGR is made by ultrasound during pregnancy and an international consensus recently precisely defined FGR [6,7]. The diagnosis of IUGR is confirmed either by solitary criteria (fetal abdominal circumference or estimated fetal weight  $\leq$  3rd percentile) or contributory criteria (multiple abnormal Doppler measurements) [6]. Thus, IUGR and SGA are not strictly synonymous. Indeed, a fetus can experience FGR during a period of the pregnancy and then have normal dimensions at birth, even if perinatal growth was low for a period; on the contrary, a neonate can be SGA because of very late FGR missed by prenatal monitoring. Obstetricians are concerned about the perinatal morbidity and mortality that result from FGR, whereas endocrinologists consider these patients with potential long-term effects of FGR. Because of the conflicting definitions of FGR and the confusion between SGA and IUGR, published cohort studies are heterogeneous and their outcomes are difficult to compare.

Here, we will consider these children as being born SGA (weight and/or length  $\geq 2$  SD below the mean), because measurements at birth are more reliable than ultrasound determination of term and growth *in utero* and because publications mostly include or concern SGA patients. It is likely that neonates born appropriate for gestational age (AGA), but with FGR, may have similar long-term problems as those born SGA, despite the difficulty to diagnose and follow them.

Prevalence of SGA has not been well established. Indeed, in 2013, Lee *et al.* found an extremely variable rate of children born SGA in 138 low or middle-income countries, from 5.3 to 41.5% [8]. In industrialized countries, only the prevalence of LBW is known (estimated between 5 and 10%) and there are no global data reported concerning SGA, except for a few national registries [9,10].

## Diagnostic orientation

Fetal growth is a complex physiological process, including genetic or epigenetic, endocrine, and environmental factors. Environment includes maternal factors, such as maternal nutrition or exposure to toxic or infectious elements. Fetal growth is also influenced by exchange between the mother and fetus through the placenta [7]. Here, we will focus on (epi)genetic and endocrine mechanisms that can affect fetal growth. However, this list cannot be exhaustive, as more than 150 genetic disorders have been associated with FGR (HPO:0001511, [http://compbio.charite.de/phenomizer\\_orphanet/](http://compbio.charite.de/phenomizer_orphanet/)).

The IGF system has been known for years to be a main actor in the control of fetal growth. It includes two ligands (IGF-I and IGF-II), binding proteins (IGF binding protein 1–6 (IGFBP-1 to -6)) and the acid labile subunit (ALS), and two receptors [the IGF1R and the mannose-6-phosphate cation independent receptor (M6PCI)]. IGF-I and IGF-II can both promote fetal growth through activation of the IGF1R, whereas M6PCI is involved in the clearance of IGF-II. Insulin can also bind to the IGF1R to promote fetal growth [11]. During fetal life, IGF-I is not regulated by the somatotrophic axis. Therefore, molecular defects upstream of the growth hormone receptor do not usually (or only slightly) affect fetal growth.

In rodents, inactivation of the *igf1*, *igf2*, or *igf1r* genes leads to FGR [12,13]. Inactivation of *igf2* only results in FGR when the inactive allele is transmitted by the male, because of the imprinted character of *igf2*. Imprinting is defined by the monoallelic expression of a gene depending on its parental origin. Imprinting is controlled by epigenetic mechanisms, especially DNA methylation of differentially methylated regions (DMRs), in which maternal and paternal alleles are differentially methylated. Approximately 100 genes are imprinted in humans, most of which are involved in growth, metabolism, or development [14].

In humans, mutations in the *IGF1* or *IGF1R* genes have long been identified in children with pre- and postnatal growth retardation. Aside from growth restriction, these children generally have a low head circumference and may have sensorineural defects and mental retardation [15–17]. Mutations of the

paternally-inherited *IGF2* gene (located at chromosome 11p.15) have been described only very recently in patients with Silver–Russell Syndrome (SRS), in which children present with pre- and postnatal growth restriction, severe feeding difficulties, and a relatively normal head circumference [18]. *IGF2* mutations are rare in SRS patients, and most patients show hypomethylation of the paternal *H19/IGF2:IG-DMR*, leading to the loss of expression of *IGF2* [19]. More recently, mutations in oncogenes (*PLAG1* and *HMG2*), known to be upstream regulators of *IGF2*, have been identified in children born SGA, confirming the essential role of this pathway in the control of fetal growth [20]. Conversely, hypermethylation at the maternal *H19/IGF2:IG-DMR* leads to Beckwith-Wiedemann syndrome, an overgrowth syndrome with an increased risk of embryonic tumors [21].

Several other loci are imprinted ([www.geneimprint.com/](http://www.geneimprint.com/)) and (epi)genetic defects within these loci lead to several imprinted diseases frequently associated with growth and/or metabolic disorders (Table 1). Children with Temple syndrome (TS14) present a phenotype very close to that of SRS, with severe obesity and early puberty [22,23]. TS14 is due to genetic or epigenetic defects within the 14q32.2 locus, which includes the paternally expressed *Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1 (DLK1)* gene. *DLK1* participates in several differentiation processes, including adipogenesis, osteogenesis, and neuroendocrine differentiation, and plays an important role in fetal growth [24]. During pregnancy, maternal circulating *DLK1* is of fetal origin, and fetus-derived *DLK1* is necessary for maternal metabolic adaptation to pregnancy [25].

SRS is clinically defined based on a clinical scoring system [19]. However, many conditions can clinically overlap with SRS and TS14 [23]. It is critical to make an accurate diagnosis, because for some of these conditions, some treatments may be contraindicated, such as growth hormone replacement (see below). Differential diagnoses of SRS have been recently reviewed, with some specific traits besides FGR. In cases of FGR, head circumference and early feeding difficulties are cornerstone traits to distinguish between these various conditions (Table 1). Furthermore, relative macrocephaly will expose to a high risk of hypoglycemia, which should be carefully monitored.

### Neonatal nutrition and metabolic consequences

The concept of the early origins of adult disease was first developed by David Barker in the late 1980s [31]. He observed that cardiovascular risk, as well as the risk of diabetes and metabolic syndrome in adulthood, was elevated in LBW individuals. This resulted in the Barker hypothesis, in which restricted *in utero* nutrition permanently alters tissue structures and functions, and hence metabolism, increasing the risk of cardiovascular and metabolic disorders in adulthood [32]. This hypothesis was subsequently challenged by the “rapid catch-up growth” hypothesis, suggesting that LBW *per se* does not increase the risk of metabolic syndrome, but only in LBW infants who experience rapid catch-up growth during the first years of life. Many studies have provided evidence for one or the other hypothesis. Recently, a systematic review showed that, although LBW increased the risk of metabolic syndrome later in life, rapid postnatal catch-up growth of LBW neonates was a more important factor than LBW alone for the development of metabolic syndrome. In this review, 79.6% of all cardiovascular risk factors (blood pressure, insulin resistance, hypertriglyceridemia, LDL and HDL cholesterol levels, etc.) reported in studies of the rapid catch-up growth hypothesis were statistically significant, whereas the corresponding figure was 58.5% for the effect of LBW alone [33].

LBW may be due to various reasons, including preterm birth and IUGR. Infants born SGA, but with no evidence of FGR, do not have an increased metabolic risk. They remain lighter and shorter than those born AGA, have a similar percentage of body fat, and show no differences in metabolic or hormonal parameters up to two years of age [34]. LBW infants who are born preterm have an increased risk of neurological impairment and poor postnatal growth increases the risk of adverse neurological outcomes. Although adequate postnatal nutrition associated with catch-up growth confers potential advantages for later cognitive outcome, it may also increase the risk of metabolic disease later in life. A systematic review investigating the relationship between postnatal growth rates, cognitive outcomes, and the risk of disease later in life in preterm infants reported consistent positive associations between postnatal weight or head growth and neurocognitive outcomes. However, it also reported limited evidence linking postnatal weight gain to later adiposity and cardiovascular disease risk factors [35]. The authors concluded that more research is needed to determine how to optimize postnatal nutrition

**Table 1**

Several syndromes with FGR and comparative phenotypes concerning head circumference and early feeding difficulties. Imprinted genes are labelled with an \*. For imprinted genes, \$: transmission can depend on the gender of the transmitter. # Extreme caution must be given to avoid hypoglycemia in this subgroup of patients.

	Silver Russell syndrome	Temple syndrome	3-M syndrome	Mulibrey syndrome	Floating Harbor syndrome	Bloom syndrome	Fanconi syndrome	<i>IGF1/IGF1R</i> mutations/ deletions
<b>OMIM</b>	#180860	#616222	#273750	#253250	#136140	#210900	#227650	#608747 #270450
<b>Genes</b>	Hypomethylation of <i>H19*/IGF2*</i> : IG-DMR Maternal UPD of chr 7 Mutations of <i>IGF2*</i> , <i>PLAG1</i> , <i>HMG2</i> , or <i>CDKN1C*</i>	Maternal UPD of chr 14 Hypomethylation/ deletion of <i>DLK1*/MEG3*:IG-DMR</i>	Mutations of <i>CUL7</i> , <i>CCDC8</i> , <i>OBSL1</i>	Mutations of <i>TRIM37</i>	Mutations of <i>SRCAP</i>	Mutations of <i>BLM</i>	Mutations of more than 20 genes (see reference)	Mutations of <i>IGF1R</i> <i>IGF1</i>
<b>Transmission</b>	Usually sporadic  Autosomal dominant for mutations <sup>5</sup>	Usually sporadic  Autosomal dominant for deletions <sup>5</sup>	Autosomal recessive	Autosomal recessive	Autosomal dominant	Autosomal recessive	Autosomal recessive or X-linked	Autosomal dominant for <i>IGF1R</i>  Autosomal recessive for <i>IGF1</i>
<b>Head circumference at birth</b>	Relatively conserved compared to birth weight/length <sup>#</sup>	Relatively conserved compared to birth weight/length <sup>#</sup>	Relatively conserved compared to birth weight/length <sup>#</sup>	Relatively conserved compared to birth weight/length <sup>#</sup>	Relatively conserved compared to birth weight/length <sup>#</sup>	Microcephaly	Microcephaly	Microcephaly
<b>Feeding difficulties during early infancy</b>	+++	+++	Usually absent	Usually absent	+	+	Absent	+
<b>References</b>	[19]	[22,23]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[17]



and growth in preterm infants to achieve a neurocognitive benefit, while minimizing the risk of later cardiovascular and metabolic diseases.

The effect of rapid catch-up growth may be considered separately for full-term SGA infants, as the risks and benefits may differ from those of preterm infants. Only two randomized interventional studies have evaluated the effect of early growth promotion in full-term SGA infants on neurodevelopment, fat mass, and blood pressure [36,37]. Full-term infants born SGA were randomized into two groups: nutrient-enriched formula, which promoted early growth (28% more protein than standard formula) or standard formula. There was no difference in neurocognitive development between the two groups at 18 months. Enriched formula increased total body fat mass at the age of five to seven years and rapid catch-up growth was associated with increased blood pressure at six to eight years [38,39]. There have also been many observational studies that reported an association between postnatal growth and metabolic outcome in full-term SGA infants, but they were performed across diverse geographical regions and studied various markers of metabolic and cardiovascular health. Overall, they reported a positive association between faster postnatal weight gain and increased adiposity in infancy until the age of 21 [40]. Nevertheless, SGA infants generally have less adipose tissue than AGA. Only two studies reported that abdominal fat mass at the age of one to four years was positively associated with faster growth [41,42]. Fat distribution may be more informative than total fat mass to determine whether LBW infants accumulate greater visceral adiposity, exposing them to an adverse metabolic outcome. Most observational studies have reported an association between faster postnatal weight gain in full-term SGA infants and elevated blood pressure. Despite those highest blood pressure levels, compared to AGA children, blood pressure in SGA infants remains in the normal range [40]. At the age of four years, SGA children who experienced rapid catch-up growth during the first year of life had preserved insulin sensitivity, but lower insulin secretion in response to glucose stimulation, suggesting impairment of  $\beta$ -cell function [43].

Many systematic reviews have shown that breast feeding may protect against the long-term risk of developing obesity, but no study has focused on the effects of breast feeding on infants born SGA. Recommendations for neonatal nutrition have been published to optimize the growth of preterm infants, but there is no standardized nutritional protocol for full-term SGA infants. In view of current data, enriched aggressive neonatal nutrition for those infants may not be appropriate, but regular growth monitoring is important. Based on the data of a prospective cohort including 1957 full-term SGA infants, the recommended optimal growth trajectory may be to reach approximately the 30th percentile in the first postnatal months and the 50th percentile by the age of seven months [44]. Further studies are needed to establish the optimal nutritional regimen for SGA infants that promotes safe short-term outcomes and minimizes long-term risks.

## Growth

Most children born SGA reach normal height, but approximately 10% do not [10,45,46]. The adult height (AH) of those who do not catch-up is reduced by approximately 4.5 cm for men and 4 cm for women [47]. Most catch-up during the first year of life, but it can take longer for preterm infants or patients with very LBW [48]. Furthermore, growth is retarded during the first months of life of preterm infants and such postnatal growth failure is more severe for babies born more preterm [48]. The so-called extra-uterine growth retardation can catch-up later in life or result in reduced AH [49].

Little is known about the mechanisms involved in growth failure in children with FGR. Some syndromes can be identified in a few, usually by extensive molecular analysis. Thus, this group of SGA patients who do not catch-up represents a very heterogeneous population in most publications. The effect of recombinant growth hormone (rGH) has been well established in various randomized versus placebo clinical trials [50–52]. These studies resulted, in 2001 in the USA, in the recommendation to treat with rGH children born SGA who did not catch-up from two years of age with a daily dose of 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (American Food Drug and Administration). This indication is different in Europe, where rGH is indicated since 2003 in children born SGA who have a height SDS  $\leq -2.5$  at four years and are 1 SDS below their target height and have a growth velocity below the mean (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) with a daily dose of 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [3]. Ranke *et al.* reported a dose-dependent response to rGH in children born SGA, together with a greater benefit associated with

the duration of treatment [53]. The authors showed that growth gain within the first year of treatment was highly predictable of the long-term response to rGH treatment. Another study provided support for starting rGH treatment early, reporting a better response for treatment started at least two years before pubertal onset [50]. Measurement of serum IGF-I levels during rGH therapy in children has been used as a marker for treatment adherence. It has also been used to titrate rGH doses to obtain the upper limit of normal IGF1 levels, improving growth velocity in children with GH deficiency and idiopathic short stature [54–56]. However, this approach is not recommended for FGR children, as they may have some degree of associated GH and IGF-I insensitivity and their IGF-I levels are not linked to their growth velocity [57]. Tolerance to rGH treatment has been evaluated in numerous studies and it does not appear to worsen long-term cardiovascular risk, even if it impairs glucose tolerance during treatment, which must be monitored [3,58,59]. A few studies even showed a protective effect on blood pressure and body composition [59,60].

In syndromic causes of FGR, such as SRS, catch-up growth is very rare, and the recent international consensus has recommended starting rGH treatment early (at approximately two years) with the lowest possible dose to allow catch-up growth [19,61]. This recommendation is justified by the beneficial metabolic effects of GH (glycemia regulation, fat/muscle mass repartition) in these patients, as shown for those with Prader–Willi syndrome [62,63]. The European Medicines Agency has not officially authorized this treatment, as rGH treatment is only authorized from four years of age in Europe, whereas it is authorized from two years in the USA. Basal IGF1 serum levels in the upper quartile of the normal age-related range, or higher, can be expected in children with SRS, especially those with 11p15 epimutations. Thus, IGF-I serum levels are not used to adjust rGH treatment in this group of children [19,64].

Other causes of FGR with no catch-up, associated with chromosomal instability, should be considered with caution. These include Bloom syndrome, Nijmegen breakage syndrome, and Fanconi disease, as well as other syndromic causes of FGR which can contraindicate the use of rGH. In cases of IGF-I resistance, higher doses of rGH can be justified, for example in patients with *IGF1R* anomalies, or treatment with recombinant IGF-I for patients with *IGF1* mutations.

## Pubarche and puberty

### Pubarche

Since the late 90s, many studies have reported a relationship between FGR and precocious pubarche. A study of pubarche in children born SGA in the ALSPAC cohort in the United Kingdom confirmed the link between high levels of Dehydroepiandrosterone sulfate (SDHEA) and LBW [65]. Indeed, rapid weight gain was associated with aggressive adrenarche. These data were confirmed in other cohorts [66–68]. Veening *et al.* reported that high levels of SDHEA persist throughout puberty in adolescents born SGA and that they have a shorter period of puberty and more aggressive adrenarche than adolescents born AGA [69].

### Puberty

The onset of puberty occurs early in patients born SGA and evolves rapidly, enhancing the risk of short AH [70–72]. Numerous authors have established an association between metabolic problems, such as weight gain or insulin resistance, and the early manifestation of puberty or adrenarche [71,73,74].

The Dutch SGA study reported the benefit of treating patients born SGA who entered puberty when still small (140 cm) with Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) agonists concomitantly with rGH [75,76]. Patients born SGA, under rGH therapy during the prepubertal stage because of absence of sufficient postnatal catch-up, were given GnRH agonists for two years if the onset of puberty occurred when their height was below 140 cm. The authors compared the AH of the patients treated with GnRH agonists with those that did not require it (those not below 140 cm in height at the onset of puberty). The two groups had similar AHs due to a greater pubertal growth spurt in the patients who received GnRH agonists. The same group later showed that there was good long-term metabolic tolerance to the

co-administration of rGH and GnRH agonists [77]. In accordance with these studies, the recent international consensus recommends considering a two-year course of personalized GnRH agonist treatment for SRS patients with a poor AH prognosis at the onset of puberty [19].

### Neuro-developmental aspects

The assessment of neuro-developmental difficulties in patients born SGA is challenging because of the presence of confounding factors, such as maternal psychopathology, socio-economic status, or more widely, environmental factors, as well as occasionally the underlying mechanisms of FGR [78,79]. Furthermore, the patients studied are often not well characterized in terms of FGR and many studies have focused on LBW neonates with no information concerning the term at birth. Nevertheless, some studies have shown that FGR is associated with an increased risk of psychopathology [80–82]. A recent review that summarized 16 studies reported neuro-developmental delay during the three first years of life in children born SGA in 11 of these prospective studies [81]. The most important concern is attention deficit hyperactivity disorder, which is associated with LBW [82,83]. A recent cohort study highlighted the higher frequency of adult mental disorders, such as schizophrenia, among LBW neonates, as well as an increased risk of alcohol/drug abuse, anxiety, or somatoform disorders [84]. The physiopathology is still unknown, but some have suggested that glucocorticoid levels during pregnancy could play a crucial role in fetal growth and neurodevelopment [82]. The consequences, in terms of brain alterations, are well described by Miller *et al.* who suggest that brain sparing during FGR is not perfect and results in microstructural alterations of the brain, impairing both grey and white matter [85]. These data should encourage pediatricians to monitor for early psychomotor or language delay to encourage early management of this group of children.

### Adulthood

The consequences of FGR can also continue into adulthood. Although neonates born SGA and followed for 26 years showed no long-term social or emotional consequences in a large cohort in the United Kingdom, there were slight differences [10]. More individuals born SGA were referred to special education as teenagers, occupied fewer managerial jobs at 26 years of age, and had lower incomes than adults born AGA [10].

Few studies have focused on fertility in adults born SGA. The first concerns arose in 1997 when Francois *et al.* reported an increased proportion of LBW males in a cohort of males consulting for subfertility [86]. These results were confirmed by an Italian study showing reduced testicular size, lower testosterone and inhibin B levels, and higher LH levels in 25 males born SGA than in a control group of males born AGA [87]. At the same time, Ibañez *et al.* reported an increased risk of polycystic ovary syndrome in LBW females who experienced precocious pubarche. They suggested a major role of insulin resistance in the pathogenesis of ovarian dystrophy and thus performed a double blind randomized, placebo-controlled pilot clinical trial, showing the positive effect of Metformin in insulin sensitivity and central adiposity in a small cohort of 23 patients born SGA with postnatal catch-up [88]. These data have never been replicated in a larger cohort and should be still considered experimental.

Another less well-known impact of FGR is the emergence of chronic kidney disease and hypertension in adults. The LBW and Nephron Number Working Group recently published a consensus statement on this issue [89]. They recapitulate that LBW, growth restriction, and preterm birth can result in low nephron numbers and be associated with an increased risk of hypertension, proteinuria, and kidney disease later in life [90]. Furthermore, rapid catch-up in the early years of life worsens nephron reduction in these children. The risk of end-stage kidney disease is elevated, with a hazard ratio of 1.41 (1.05–1.90) for adults born SGA at term and rises to 4.02 (1.79–9.03) for adults born SGA and preterm [91]. The recommendations in this consensus are: not to overfeed neonates born SGA during infancy to avoid rapid catch-up, obesity, and type 2 diabetes mellitus; to monitor for hypertension and kidney function during childhood; and to pay attention to kidney donors born SGA, who are more at risk to develop chronic kidney disease later on [89].

Please see Fig. 1 for a global overview of outcomes and the management of patients with FGR throughout their lives.

	Outcomes	Management
Neonatal period	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Signs depending on syndromic aetiology</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Investigate syndromic causes of fetal growth restriction</li> <li>• Inform parents of follow-up</li> <li>• Monitor post-natal catch-up</li> </ul>
Infancy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid weight gain</li> <li>• Postnatal growth retardation</li> <li>• Psychomotor and/or language delay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control weight gain</li> <li>• Recombinant GH when indicated</li> <li>• Neuro-developmental therapies</li> </ul>
Childhood	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precocious/early pubarche/adrenarche</li> <li>• Precocious/early central puberty</li> <li>• Rapid epiphyseal maturation</li> <li>• Aggressive pubarche</li> <li>• Metabolic problems: low insulin sensitivity</li> <li>• Mental disorders /addictive behavior</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monitor signs of aggressive adrenarche/puberty</li> <li>• Consider GnRH agonists regarding adult height prognosis</li> <li>• Psychological follow-up</li> </ul>
Adulthood	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolic problems: low insulin sensitivity, cardiovascular risk, obesity</li> <li>• Polycystic ovarian syndrome</li> <li>• Hypofertility</li> <li>• Chronic kidney disease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monitor signs of metabolic problems</li> <li>• Monitor fertility problems</li> <li>• Genetic counselling if necessary</li> <li>• Manage additional cardiovascular risk factors</li> <li>• Monitor and treat kidney dysfunction</li> </ul>

Fig. 1. Outcomes and their management in children born with a fetal growth restriction throughout their lives.

## Summary

Fetal growth restriction (FGR) is multifactorial and can lead to adverse multi-systemic outcomes. The fetal programming and catch-up theories encourage close monitoring of the nutritional status of these patients. Genetic or epigenetic causes are responsible for this phenotype for some patients and they should be screened in the first years of life to propose and optimize management. Recombinant growth hormone treatment is now a well-recognized therapeutic option to improve adult height and global metabolic status. The onset of pubarche and puberty can occur early and rapidly progress, leading to a poor prognosis for adult height. Several studies on therapies, such as GnRH agonists, are available and encourage its use in specific and personalized situations. Finally, adults who experienced FGR should be closely followed, mostly for cardiovascular diseases, but also for fertility problems and chronic kidney disease. These potential late effects of FGR all justify early diagnosis, close follow-up, and adequate early intervention for these patients.

## Conflicts of interest

FB: speaker or chair in meetings promoted by Ipsen Pharma, Lilly, Sandoz.

IN: speaker or chair in meetings promoted by Merck Serono, Sandoz and research support from Pfizer, Merck Serono.

### Practice points

- Syndromic genetic causes of fetal growth restriction (FGR) should be sought in light of dysmorphic, clinical, or biological parameters, because of its consequences on care.
- Attention should be given to rapid weight catch-up within the first two years of life. Rapid catch-up is a risk factor for cardiovascular and metabolic disease in adulthood.
- Growth hormone is a recommended treatment. Age at onset, height, and dose are different in the USA and in Europe.
- Pubarche and puberty occur early in this group of patients and can rapidly progress. Personalized GnRH agonist treatment can be considered to preserve growth in case of poor AH prognosis at the onset of puberty.
- Psychomotor and cognitive development should be assessed, and early intervention proposed if needed.
- Cardiovascular risk is elevated and metabolic disorders are frequent in patients with FGR and must be adequately followed. Exercise and good nutrition must be encouraged.

### Research agenda

- Determine hormonal and non-hormonal mechanisms involved in fetal growth regulation.
- Determine the mechanisms leading from impaired fetal growth to metabolic disturbances.
- Determine optimized postnatal nutrition to achieve a neurocognitive benefit while minimizing the risk of later cardiovascular and metabolic diseases.
- Develop the personalized prediction of recombinant GH efficacy.
- Perform prospective randomized long-term evaluation of GnRH agonists and other bone maturation protection therapies.

### References

- \*[1] Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega ACS, et al., International Small for Gestational Age Advisory Board. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age. April 24–October 1, 2001. *Pediatrics* 2003;111:1253–61.
- [2] Usher R, McLean F. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 1969;74:901–10.
- \*[3] Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, et al. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the international societies of pediatric endocrinology and the growth hormone research society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:804–10.
- [4] American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 2013;121:1122–33.
- [5] de Onis M, Blössner M, Villar J. Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(Suppl. 1):S5–15.
- [6] Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, et al. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure: consensus definition of FGR. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;48:333–9.
- [7] Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, et al. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet* 2017;295:1061–77.
- [8] Lee AC, Katz J, Blencowe H, et al. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *Lancet Glob Health* 2013;1:e26–36.
- [9] WHO. UNICEF. Low birthweight: country, regional and global estimates. 2004.
- [10] Strauss RS. Adult functional outcome of those born small for gestational age: twenty-six-year follow-up of the 1970 British birth cohort. *J Am Med Assoc* 2000;283:625–32.
- \*[11] Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 2006;65(Suppl. 3):28–33.
- [12] DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertsen EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990;345:78–80.
- [13] DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991;64:849–59.
- [14] Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V, et al. Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes. *Hum Mutat* 2013;34(4):595–602.
- [15] Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 2003;349:2211–22.

- [16] Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, et al. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor 1 gene. *N Engl J Med* 1996;335:1363–7.
- [17] David A, Hwa V, Metherell LA, et al. Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity. *Endocr Rev* 2011;32:472–97.
- [18] Begemann M, Zirn B, Santen G, et al. Paternally inherited IGF2 mutation and growth restriction. *N Engl J Med* 2015;373:349–56.
- \*[19] Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, et al. Diagnosis and management of Silver–Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 2017 Feb;13(2):105–24.
- [20] Abi Habib W, Brioude F, Edouard T, et al. Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet Med* 2018;20:250–8.
- [21] Brioude F, Kalish JM, Mussa A, et al. Expert consensus document: clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith–Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 2018 Apr;14(4):229–49.
- [22] Temple IK, Cockwell A, Hassold T, et al. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 1991;28:511–4.
- [23] Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, et al. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet Med* 2017 Aug;25(8):935–45.
- [24] Nueda M-L, García-Ramírez JJ, Laborda J, et al. dlk1 specifically interacts with insulin-like growth factor binding protein 1 to modulate adipogenesis of 3T3-L1 cells. *J Mol Biol* 2008;379:428–42.
- [25] Cleaton MAM, Dent CL, Howard M, et al. Fetus-derived DLK1 is required for maternal metabolic adaptations to pregnancy and is associated with fetal growth restriction. *Nat Genet* 2016;48:1473–80.
- [26] Huber C, Munnich A, Cormier-Daire V. The 3M syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol* 2011;25:143–51.
- [27] Lapunzina P, Rodríguez JJ, de Matteo E, et al. Mulibrey nanism: three additional patients and a review of 39 patients. *Am J Med Genet* 1995;55:349–55.
- [28] Nowaczyk MJ, Nikkel SM, White SM. Floating-harbor syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
- [29] Cunniff C, Basseti JA, Ellis NA. Bloom's syndrome: clinical spectrum, molecular pathogenesis, and cancer predisposition. *Mol Syndromol* 2017;8:4–23.
- [30] Dufour C. How I manage patients with Fanconi anaemia. *Br J Haematol* 2017;178:32–47.
- [31] Barker DJ, Winter PD, Osmond C, et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet Lond Engl* 1989;2:577–80.
- \*[32] Barker DJ, Osmond C, Golding J, et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989;298:564–7.
- [33] Kelishadi R, Haghdoost AA, Jamshidi F, et al. Low birthweight or rapid catch-up growth: which is more associated with cardiovascular disease and its risk factors in later life? A systematic review and cryptanalysis. *Paediatr Int Child Health* 2015;35:110–23.
- [34] Mericq V, Martínez-Aguayo A, Uauy R, et al. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:50–62.
- \*[35] Ong KK, Kennedy K, Castañeda-Gutiérrez E, et al. Postnatal growth in preterm infants and later health outcomes: a systematic review. *Acta Paediatr* 2015;104:974–86.
- [36] Morley R, Fewtrell MS, Abbott RA, et al. Neurodevelopment in children born small for gestational age: a randomized trial of nutrient-enriched versus standard formula and comparison with a reference breastfed group. *Pediatrics* 2004;113:515–21.
- [37] Fewtrell MS, Abbott RA, Kennedy K, et al. Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants. *J Pediatr* 2004;144:471–9.
- \*[38] Singhal A, Kennedy K, Lanigan J, et al. Nutrition in infancy and long-term risk of obesity: evidence from 2 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1133–44.
- [39] Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, et al. Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure? *Circulation* 2007;115:213–20.
- [40] Castanys-Muñoz E, Kennedy K, Castañeda-Gutiérrez E, et al. Systematic review indicates postnatal growth in term infants born small-for-gestational-age being associated with later neurocognitive and metabolic outcomes. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 2017;106:1230–8.
- [41] Amador-Licona N, Martínez-Cordero C, Guízar-Mendoza JM, et al. Catch-up growth in infants born small for gestational age—a longitudinal study. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* 2007;20:379–86.
- [42] Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, et al. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2153–8.
- [43] Milovanovic I, Njuiyeon F, Deghmoun S, et al. SGA children with moderate catch-up growth are showing the impaired insulin secretion at the age of 4. *PLoS One* 2014;9, e100337.
- \*[44] Lei X, Chen Y, Ye J, et al. The optimal postnatal growth trajectory for term small for gestational age babies: a prospective cohort study. *J Pediatr* 2015;166:54–8.
- [45] Karlberg J, Albertsson-Wikland K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* 1995;38:733–9.
- [46] Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, et al. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* 1995;38:267–71.
- [47] Beukers F, Rotteveel J, van Weissenbruch MM, et al. Growth throughout childhood of children born growth restricted. *Arch Dis Child* 2017;102:735–41.
- [48] Pilling EL, Elder CJ, Gibson AT. Growth patterns in the growth-retarded premature infant. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol* 2008;22:447–62.
- [49] Hollanders JJ, van der Pal SM, van Dommelen P, et al. Growth pattern and final height of very preterm vs. very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2017;82:317–23.
- [50] Dahlgren J, Wikland KA. Final height in short children born small for gestational age treated with growth hormone. *Pediatr Res* 2005;57:216–22.

- [51] de Zegher F, Ong KK, Ibáñez L, et al. Growth hormone therapy in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2006;65:145–52.
- [52] Argente J, Gracia R, Ibáñez L, et al. Improvement in growth after two years of growth hormone therapy in very young children born small for gestational age and without spontaneous catch-up growth: results of a multicenter, controlled, randomized, open clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3095–101.
- [53] Ranke MB, Lindberg A, Cowell CT, et al. Prediction of response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age: analysis of data from KIGS (Pharmacia International Growth Database). *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:125–31.
- [54] Cohen P, Rogol AD, Weng W, et al. Efficacy of IGF-based growth hormone (GH) dosing in nonGH-deficient (nonGHD) short stature children with low IGF-I is not related to basal IGF-I levels. *Clin Endocrinol* 2013;78:405–14.
- [55] Cohen P, Germak J, Rogol AD, et al. Variable degree of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) sensitivity in children with idiopathic short stature compared with GH-deficient patients: evidence from an IGF-based dosing study of short children. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2089–98.
- [56] Cohen P, Rogol AD, Howard CP, et al. Insulin growth factor-based dosing of growth hormone therapy in children: a randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2480–6.
- [57] Jensen RB, Thankamony A, O'Connell SM, et al. A randomised controlled trial evaluating IGF1 titration in contrast to current GH dosing strategies in children born small for gestational age: the North European small-for-gestational-age study. *Eur J Endocrinol* 2014;171:509–18.
- \*[58] Cutfield WS, Lindberg A, Rapaport R, et al. Safety of growth hormone treatment in children born small for gestational age: the US trial and KIGS analysis. *Horm Res Paediatr* 2006;65:153–9.
- [59] van Pareren Y, Mulder P, Houdijk M, et al. Effect of discontinuation of growth hormone treatment on risk factors for cardiovascular disease in adolescents born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:347–53.
- [60] Lebl J, Lebenthal Y, Kolouskova S, et al. Metabolic impact of growth hormone treatment in short children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2011;76:254–61.
- [61] Toumba M, Albanese A, Azcona C, et al. Effect of long-term growth hormone treatment on final height of children with Russell-Silver syndrome. *Horm Res Paediatr* 2010;74:212–7.
- [62] Deal CL, Tony M, Höybye C, et al. Growth hormone research society workshop summary: consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1072–87.
- [63] Sas T, Mulder P, Hokken-Koelega A. Body composition, blood pressure, and lipid metabolism before and during long-term growth hormone (GH) treatment in children with short stature born small for gestational age either with or without GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3786–92.
- [64] Binder G, Seidel A-K, Martin DD, et al. The endocrine phenotype in Silver-Russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1402–7.
- [65] Ong KK, Potau N, Petry CJ, et al. Opposing influences of prenatal and postnatal weight gain on adrenarche in normal boys and girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2647–51.
- [66] Francois I, de Zegher F. Adrenarche and fetal growth. *Pediatr Res* 1997;41:440–2.
- [67] Neville KA. Precocious pubarche is associated with SGA, prematurity, weight gain, and obesity. *Arch Dis Child* 2005;90:258–61.
- [68] Dahlgren J, Boguszewski M, Rosberg S, et al. Adrenal steroid hormones in short children born small for gestational age. *Clin Endocrinol* 1998;49:353–61.
- [69] Veening MA, van Weissenbruch MM, Roord JJ, et al. Pubertal development in children born small for gestational age. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* 2004;17:1497–505.
- [70] Albertsson-Wikland K, Boguszewski M, Karlberg J. Children born small-for-gestational age: postnatal growth and hormonal status. *Horm Res* 1998;49(Suppl. 2):7–13.
- [71] Ibáñez L, de Zegher F. Puberty and prenatal growth. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254–255:22–5.
- [72] Verkauskienė R, Petraitiene I, Albertsson Wikland K. Puberty in children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 2013;80:69–77.
- [73] Ibáñez L, Potau N, Marcos MV, et al. Exaggerated adrenarche and hyperinsulinism in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4739–41.
- [74] Ibáñez L, Potau N, Francois I, et al. Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3558–62.
- \*[75] van der Steen M, Lem AJ, van der Kaay DCM, et al. Puberty and pubertal growth in GH-treated SGA children: effects of 2 Years of GnRHa versus no GnRHa. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:2005–12.
- [76] Lem AJ, van der Kaay DCM, de Ridder MAJ, et al. Adult height in short children born SGA treated with growth hormone and gonadotropin releasing hormone analog: results of a randomized, dose-response GH trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:4096–105.
- [77] Lem AJ, van der Kaay DCM, Hokken-Koelega ACS. Bone mineral density and body composition in short children born SGA during growth hormone and gonadotropin releasing hormone analog treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:77–86.
- [78] Aizer A, Currie J. The intergenerational transmission of inequality: maternal disadvantage and health at birth. *Science* 2014;344:856–61.
- [79] Wiles NJ, Peters TJ, Heron J, et al. Fetal growth and childhood behavioral problems: results from the ALSPAC cohort. *Am J Epidemiol* 2006;163:829–37.
- [80] Räikkönen K, Pesonen A-K, Roseboom TJ, et al. Early determinants of mental health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol* 2012;26:599–611.
- [81] Levine TA, Grunau RE, McAuliffe FM, et al. Early childhood neurodevelopment after intrauterine growth restriction: a systematic review. *Pediatrics* 2015;135:126–41.
- [82] O'Donnell KJ, Meaney MJ. Fetal origins of mental health: the developmental origins of health and disease hypothesis. *Am J Psychiatr* 2017;174:319–28.
- [83] Räikkönen K, Forsén T, Henriksson M, et al. Growth trajectories and intellectual abilities in young adulthood the helsinki birth cohort study. *Am J Epidemiol* 2009;170:447–55.

- [84] Abel KM, Wicks S, Susser ES, et al. Birth weight, schizophrenia, and adult mental disorder: is risk confined to the smallest babies? *Arch Gen Psychiatr* 2010;67:923.
- [85] Miller SL, Huppi PS, Mallard C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome: fetal growth restriction: brain structure and function. *J Physiol* 2016;594:807–23.
- [86] Francois I, De Zegher F, Spiessens C, et al. Low birth weight and subsequent male subfertility. *Pediatr Res* 1997;42: 899–901.
- [87] Cicognani A, Alessandroni R, Pasini A, et al. Low birth weight for gestational age and subsequent male gonadal function. *J Pediatr* 2002;141:376–80.
- [88] Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, et al. Metformin treatment for four years to reduce total and visceral fat in low birth weight girls with precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1841–5.
- [89] The Low Birth Weight and Nephron Number Working Group. The impact of kidney development on the life course: a consensus document for action. *Nephron* 2017;136:3–49.
- [90] Hoy WE, Bertram JF, Denton RD, et al. Nephron number, glomerular volume, renal disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:258–65.
- [91] Ruggajo P, Skrunes R, Svarstad E, et al. Familial factors, low birth weight, and development of ESRD: a nationwide registry study. *Am J Kidney Dis* 2016;67:601–8.



**Régulation épigénétique de la croissance fœtale :****Implication du gène soumis à empreinte parentale *DLK1* (14q32) dans la croissance fœtale**

L'empreinte parentale, mécanisme épigénétique qui permet l'expression mono-allélique de certains gènes en fonction de leur origine parentale, joue un rôle important dans la régulation de la croissance fœtale. Le gène soumis à empreinte *DLK1* est exprimé à partir de l'allèle paternel de la région 14q32 chez l'humain. Les modèles murins d'inactivation de *Dlk1* présentent un petit poids pour l'âge gestationnel (PAG). Aucune mutation de *DLK1* n'a été identifiée chez l'humain né PAG. Pendant la gestation, les concentrations sériques maternelles de *DLK1* sont diminuées en cas de fœtus PAG. Les enfants avec anomalies moléculaire aux loci 14q32 (*DLK1/MEG3*) (syndrome de Temple) et 11p15 (syndrome de Silver-Russell) présentent des caractéristiques phénotypiques (dont le PAG) et moléculaires communes, ce qui constitue un modèle d'étude du réseau de gènes soumis à empreinte parentale. L'approche translationnelle de ce travail expérimental n'a pas permis d'apporter de preuve formelle du rôle de *DLK1* dans la croissance fœtale. En effet, nous n'avons pas identifié de mutation pathogène de *DLK1* chez des sujets RCIU, et avons mis en évidence une diminution significative mais modérée des concentrations de *DLK1* circulant dans le sang maternel pendant la gestation en cas de fœtus PAG. Cependant, ce travail ouvre des perspectives intéressantes, notamment concernant l'hypothèse selon laquelle *DLK1* pourrait être un biomarqueur de RCIU par le suivi de l'évolution à titre individuel des concentrations de *DLK1* dans le sang maternel. A travers l'approche fondamentale de ce travail, nous avons mis au point deux modèles cellulaires prometteurs d'étude des maladies liées à des anomalies de l'empreinte parentale qui permettront d'étudier le rôle de *DLK1* dans la régulation du réseau de gènes soumis à empreinte parentale.

Mots clés : Petit poids pour l'âge gestationnel, retard de croissance intra-utérin, épigénétique, empreinte parentale, *DLK1*, croissance fœtale, cellules souches pluripotentes induites.

**Epigenetic regulation of fetal growth: Role of imprinted gene *DLK1* (14q32) in fetal growth**

Parental imprinting is an epigenetic mechanism leading to the mono-allelic expression of genes based on their parental origin. Parental imprinting plays an important role in the regulation of fetal growth. *DLK1* is expressed from the paternal allele of the 14q32 region. *Dlk1*-null mice are small for gestational age (SGA) but no genetic defects of *DLK1* have been described in human patients born SGA. Maternal circulating *DLK1* levels have been shown to be significantly lower in pregnant women who delivered SGA newborn than in controls. Silver-Russell syndrome (SRS) (mainly secondary to 11p15 molecular disruption) and Temple syndrome (TS) (secondary to 14q32 molecular disruption) are imprinting disorders with phenotypic (including prenatal growth retardation) and molecular overlap, providing a model for studying the imprinted gene network (IGN).

The translational approach of this experimental work failed to prove the role of *DLK1* in Human fetal growth. Indeed, we did not identify any pathogenic *DLK1* mutation in SGA newborn, and we demonstrated a significant but very moderate decrease in the concentrations of *DLK1* in maternal blood during SGA fetus gestation. On the other hand, since imprinted genes are weakly expressed in fibroblasts, the development of a cell model is a prerequisite for the study of the transcriptome we have developed, through a fundamental approach, two very promising cellular models to study parental imprinting which will make possible to study the role of *DLK1* in the IGN.

Keywords : Small for gestational age, fetal growth restriction, epigenetic, parental imprinting, *DLK1*, induced pluripotent stem cells