# Diagnostic biochimique des désordres congénitaux de la glycosylation

A. Raynor, F. Fenaille, E. Lebredonchel, F. Foulquier, A. Bruneel

***Résumé :*** *Les désordres congénitaux de la glycosylation (CDG pour* congenital disorders of glycosylation*) constituent un groupe de plus de 160 maladies héréditaires du métabolisme impactant la glycosylation. Les atteintes moléculaires concernent principalement des enzymes et transporteurs du cytosol, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et peuvent être à l'origine d'anomalies de la N-glycosylation, de la O-glycosylation et/ou des glycosaminoglycanes. Ces anomalies de la glycosylation peuvent se répercuter sur le repliement, l'adressage, la sécrétion, la stabilité et, in fine, la fonction de nombreuses macromolécules glycosylées (majoritairement des protéines, parfois des lipides ou des ancres glycosylphosphatidylinositol), avec des conséquences cliniques souvent importantes. Le diagnostic clinique des CDG est difficile, la plupart d'entre eux se manifestant par des atteintes multiviscérales sans signe pathognomonique. Ainsi, le biologiste spécialisé joue un rôle important dans l'orientation diagnostique, en ayant recours à un panel d'analyses permettant de mettre en évidence des anomalies de la glycosylation caractérisant les CDG. Dans cet article, après de brefs rappels sur la glycosylation et les CDG, nous présentons les techniques analytiques permettant d'étudier la glycosylation des protéines au laboratoire, avec une attention particulière portée sur l'interprétation des résultats et sur les facteurs pouvant induire une confusion diagnostique. Nous décrivons ensuite brièvement l'importance actuelle de la génétique dans la démarche diagnostique des CDG.*

*© 2025 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés, y compris ceux relatifs à la fouille de textes et de données, à l'entraînement de l'intelligence artificielle et aux technologies similaires.*

*Note de l'éditeur : Elsevier adopte une position neutre en ce qui concerne les conflits territoriaux ou les revendications juridictionnelles dans les contenus qu'il publie, y compris dans les cartes et les affiliations institutionnelles.*

**Mots-clés :** Apolipoprotéine C-III ; Bikunine ; CDG ; Désordres congénitaux de la glycosylation ; Glycosylation ; Séquençage d'exome ; Séquençage de génome ; Transferrine

*Plan*

- **Introduction** 1
- **Généralités sur la glycosylation et les CDG** 2
  - N-glycosylation 2
  - O-glycosylation de type mucine 2
  - Synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) 3
  - Désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) 3
- **Biomarqueurs classiques des CDG et techniques analytiques associées** 6
  - Analyse de la transferrine sérique (N-glycosylation) par techniques électrophorétiques 6
  - Analyse de la transferrine sérique (N-glycosylation) par spectrométrie de masse (SM) 8
  - Analyse du N-glycome sérique/plasmatique total après traitement par la peptide-N-glycosidase F (PNGase F) ou l'endo-β-N-acétylglucosaminidase H (EndoH) 11
  - Analyse de l'apolipoprotéine C-III sérique (O-glycosylation de type mucine core 1) 11
  - Biomarqueurs cellulaires des CDG 12
  - Analyse de la bikunine sérique (O-xylosylation des GAG) 13
- **Rôle et importance de la génétique dans le diagnostic des CDG** 13
- **Conclusion** 13

## Introduction

La glycosylation des protéines est une modification co-/post-traductionnelle correspondant à la fixation et à la maturation d'une structure oligosaccharidique (un glycane) sur une chaîne polypeptidique, avec de nombreuses conséquences sur ses propriétés structurales et fonctionnelles (repliement, adressage, sécrétion, interactions, stabilité) [1]. Les glycanes sont synthétisés par le biais de séquences enzymatiques de construction/déconstruction mettant en jeu différents monosaccharides (ou oses) et différentes glycosyltransférases et glycosidases. Chez l'Homme, les glycanes se lient aux protéines majoritairement au niveau de la fonction amide d'une asparagine (Asn) (on parle alors de N-glycosylation) ou de la fonction hydroxyle d'une sérine (Ser) ou thréonine (Thr) (on parle de O-glycosylation). La N-glycosylation est un processus séquentiel qui débute dans

le réticulum endoplasmique (RE) et s'achève dans l'appareil de Golgi, alimenté par la synthèse cytosolique de nucléotides-sucres ; avec, finalement, des chaînes glycaniques présentant une relative homologie structurale caractérisée par un pentasaccharide initial commun [2]. La O-glycosylation correspond quant à elle à un ensemble de processus golgiens aboutissant à des structures plus diverses. À titre d'exemples, on retiendra la O-glycosylation de type mucine, où le premier ose lié à la protéine est une *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) ; la O-xylosylation des glycosaminoglycanes (GAG), où le premier ose est un xylose (Xyl) ; la O-fucosylation (premier ose = fucose) et la O-mannosylation (premier ose = mannose) de l'α-dystroglycane. On note que les N- et O-glycosylations, qui concernent la majorité des glycoprotéines, impliquent toutes deux l'appareil de Golgi [3]. En conséquence, la régulation de l'homéostasie de cet organite (pH, concentrations en métaux, trafic vésiculaire, etc.) revêt une importance particulière dans les processus de la glycosylation [4].

En lien avec le nombre important d'acteurs moléculaires impliqués, plus de 160 maladies héréditaires du métabolisme impactant la glycosylation ont été décrites et regroupées sous le terme de « désordres congénitaux de la glycosylation » ou CDG pour *congenital disorders of glycosylation*. Lors de la description initiale des CDG dans les années 1980, ils ne concernaient supposément que des défauts de glycosylation des protéines. Il a plus tard été montré que la glycosylation des lipides et la synthèse des ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) pouvaient également être affectées [5]. Les tableaux cliniques des patients atteints de CDG sont très variables, et généralement peu spécifiques : sont régulièrement observés un retard de croissance, des atteintes neurologiques, une coagulopathie ou une hépatopathie [6]. Pour ces raisons, le diagnostic des CDG est souvent difficile, et associe classiquement à la clinique un dépistage biochimique et des analyses génétiques, conférant un rôle central au laboratoire de biochimie. Le biochimiste spécialisé dispose d'un ensemble de biomarqueurs et de techniques robustes pour l'étude de la N-glycosylation et de certains types de O-glycosylation, que nous décrivons par la suite. Cependant, dans d'autres cas, l'absence de biomarqueurs aujourd'hui validés en pratique clinique constitue une limite importante au dépistage et au diagnostic de certitude d'un CDG.

Dans cette revue, adaptée d'une récente publication dans *Advances in Clinical Chemistry* [7], nous proposons une brève introduction sur la physiologie de la glycosylation (N-, O-glycosylation et synthèse des GAG), ainsi que sur les CDG. Ensuite, nous détaillons les biomarqueurs et techniques analytiques éprouvés. Nous décrivons ensuite brièvement l'importance actuelle de la génétique dans la démarche diagnostique des CDG.

# ■ Généralités sur la glycosylation et les CDG

## N-glycosylation

La N-glycosylation est le processus de glycosylation le mieux décrit et concerne la majorité (≈ 90 %) des glycoprotéines chez l'Homme [8, 9]. À titre d'exemples, la transferrine, l'haptoglobine et beaucoup des facteurs de la coagulation sont des N-glycoprotéines circulantes, majoritairement synthétisées et sécrétées par le foie. La N-glycosylation se caractérise par la liaison de la chaîne glycane sur la fonction amide d'une Asn, classiquement au sein d'une séquence consensus « Asn-X-Ser/Thr » (X : tout acide aminé sauf une proline) [10]. Le processus débute dans le RE et se termine dans l'appareil de Golgi et peut se résumer en deux étapes principales :

- la synthèse de la chaîne oligosaccharidique dans le RE et son transfert « en bloc » sur la protéine en cours de synthèse ;
- sa maturation dans le RE puis dans l'appareil de Golgi, avant de se retrouver à la membrane plasmique ou d'être sécrétée dans la circulation.

De façon plus détaillée, la première étape de la N-glycosylation débute sur la face cytosolique de la membrane du RE (Fig. 1) avec le greffage de différents oses sur une ancre lipidique particulière, le dolichol-phosphate (dol-P). Ces oses proviennent de nucléotides-oses, synthétisés dans le cytoplasme grâce à une machinerie enzymatique spécifique. Leurs liaisons au dol-P, puis à la chaîne glycanique en cours d'élongation, sont catalysées par des glycosyltransférases de la famille des *asparagine-linked glycosyltransferases* (ALG). Après la fixation d'une *N*-acétylglucosamine-phosphate (GlcNAc-P) sur le dol-P, une GlcNAc et cinq mannoses (Man) sont successivement ajoutés, aboutissant à la structure dol-PP-$GlcNAc_2$-Man-(Man)-$Man_3$, qui est transloquée à la face luminale du RE grâce à la flippase RFT1 [11]. Puis, quatre Man et trois glucoses (Glc) sont successivement ajoutés, aboutissant au précurseur biantenné dol-PP-$GlcNAc_2$-Man-(Man-($Man_2$)-$Man_2$)-$Man_3$-$Glc_3$. Ici, les Man et Glc se lient dans le cytosol à des dol-P pour être ensuite transloqués dans la lumière du RE et participer à la construction de l'oligosaccharide [12]. Enfin, ce dernier est transféré en bloc du dol-P à la protéine en cours de synthèse, sous l'action du complexe oligosaccharyltransférase (OST), qui comprend huit sous-unités protéiques distinctes (Fig. 1).

La seconde étape de la N-glycosylation débute dans le RE, où la glycoprotéine subit un contrôle qualité (Fig. 2). Les glucosidases I et II hydrolysent deux des trois Glc terminaux et la structure Glc-$Man_3$-($Man_5$)-Man-$GlcNAc_2$- est reconnue par les lectines chaperonnes calnexine et calréticuline. Ce complexe glycoprotéine/lectines peut être reconnu par l'oxydoréductase ERp57, qui participe au repliement de la protéine [13]. Puis, la glucosidase II clive le dernier Glc, permettant à la glycoprotéine d'être reconnue par l'UDP-glucose:glycoprotéine glycosyltransférase (UGGT), qui, en cas de mauvais repliement protéique, rajoutera un nouveau Glc terminal permettant d'amorcer éventuellement un nouveau cycle [14]. Ce processus peut se répéter si le mauvais repliement persiste [15]. En cas d'impossibilité d'obtenir un repliement correct, trois à quatre Man sont finalement retirés du N-glycane sous l'action de la mannosidase I RE-spécifique, et la glycoprotéine quitte le RE pour le cytosol où elle est dégradée, et ses composants recyclés [16]. Si la glycoprotéine est correctement repliée, elle est transférée vers l'appareil de Golgi où la maturation de sa chaîne N-glycane -$GlcNAc_2$-Man-(Man-($Man_2$)-$Man_2$)-$Man_3$ peut se poursuivre (Fig. 2). Plus précisément, des mannosidases golgiennes vont retirer trois Man, puis une GlcNAc transférase va ajouter une GlcNAc sur l'une des deux antennes du N-glycane, avant hydrolyse des deux Man restants par la mannosidase II. Cela aboutit à la structure -$GlcNAc_2$-(Man)-$Man_2$-GlcNAc sur laquelle différents oses (GlcNAc, galactoses [Gal], acides sialiques [SA], fucoses [Fuc]) peuvent séquentiellement se lier, aboutissant à un N-glycane mature biantenné [17]. Ces oses préalablement activés sous forme nucléotides-oses dans le cytosol sont acheminés dans l'appareil de Golgi par des transporteurs spécifiques de la famille SLC35 (Fig. 2).

Chez les sujets sains, les N-glycanes matures sont principalement de type « complexe », dont les antennes sont majoritairement sialylées en position terminale [18]. Sont également retrouvés des N-glycanes « riches en mannose », non-sialylés en positions terminales ($Man_X$-$GlcNAc_2$-) et « hybrides », correspondant à la situation intermédiaire (Fig. 2). Ces derniers sont retrouvés en particulier sur certaines immunoglobulines [19].

## O-glycosylation de type mucine

La O-glycosylation de type mucine est une modification post-traductionnelle qui se déroule dans l'appareil de Golgi (Fig. 3). Contrairement à la N-glycosylation, où le glycane est assemblé sur un dol-P avant d'être transféré à la protéine, la O-glycosylation s'initie sur la protéine (pas de séquence consensus identifiée). Dans la O-glycosylation de type mucine, différentes polypeptide-*N*-acétylgalactosamine transférases (ppGalNAcT) peuvent lier une GalNAc sur l'hydroxyle d'une Ser ou d'une Thr, donnant naissance à la structure de type mucine la plus élémentaire [20]. D'autres oses peuvent alors successivement y être greffés pour former les structures de type mucine « core 1 » à « core 8 » [21]. Ces oses proviennent du cytosol, sous la forme de nucléotides-sucres acheminés dans le Golgi par des transporteurs de la famille SLC35.

Un exemple d'intérêt clinique de protéine circulante O-glycosylée de type mucine est l'apolipoprotéine C-III (apoC-III) [22]. Après liaison de la GalNAc sur la fonction hydroxyle de la Thr 74, un Gal est ajouté sous l'action de la glycoprotéine-*N*-acétylgalactosamine,3-β-galactosyltransférase 1 (C1GalT1, aussi

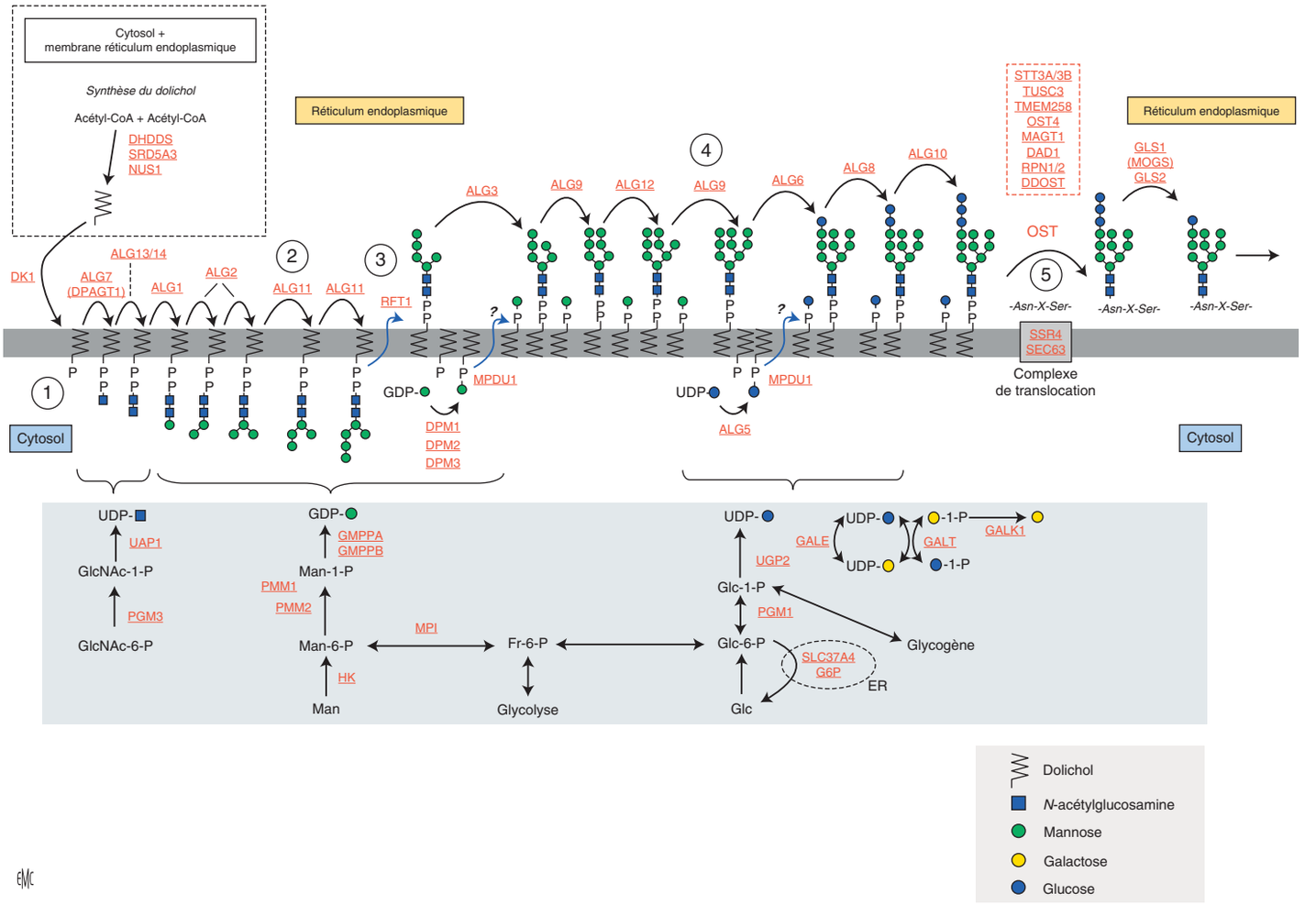


**Figure 1.** N-glycosylation : étapes cytosoliques et premières étapes dans le réticulum endoplasmique (RE). La N-glycosylation est initiée par : la réaction d'un nucléotide-sucre (synthétisé dans le cytosol) avec un dolichol-phosphate (dol-P) ancré à la membrane du RE, avec formation d'une liaison pyrophosphate (1) ; les ajouts d'une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et de cinq mannoses, catalysés par des glycosyltransférases spécifiques (ALG) (2) ; la translocation du dol-PP-glycane de la face cytosolique à la face luminale du RE, catalysée par la flippase RFT1 (3) ; l'ajout de quatre mannoses et de trois glucoses (4) ; et le transfert de ce proto-N-glycane sur l'amide d'une asparagine (Asn) d'une protéine en cours de traduction, catalysé par le complexe oligosaccharyltransférase (OST), suivi par l'élimination de deux glucoses (5). Les acteurs moléculaires décrits comme impliqués dans la pathogénie de désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) sont indiqués en rouge.

appelée core 1 synthase). Ce disaccharide Gal-GalNAc- correspond au motif « core 1 » qui est partagé par de nombreuses autres glycoprotéines et sert de base à l'assemblage de structures plus complexes. Dans le cas de l'apoC-III, un premier SA est le plus souvent greffé au core 1 par la β-galactoside α-2,3-sialyltransférase 1 (ST3Gal1), produisant la glycoforme apoC-$III_1$. Un second SA peut être ajouté sous l'action de l'α-N-acétylgalactosaminide α-2,6-sialyltransférase 1 (ST6GalNAc I), produisant la glycoforme apoC-$III_2$ [23, 24] (Fig. 3).

## Synthèse des glycosaminoglycanes (GAG)

Les GAG sont des chaînes glycaniques caractérisées par la répétition d'un motif disaccharidique comprenant une hexosamine (par ex. GlcNAc) et un acide uronique (par ex. l'acide glucuronique [GlcA]) (Fig. 4). La chaîne GAG est le plus souvent liée à une protéine (exceptions : héparine et acide hyaluronique) par l'intermédiaire d'un *linker* tétrasaccharidique commun GlcA-Gal-Gal-Xyl-, lui-même lié à la protéine au niveau de la fonction hydroxyle d'une Ser (O-xylosylation). Cela concerne les héparane-sulfates (HS), les chondroïtine-sulfates (CS) et les dermatane-sulfates (DS). Les kératane-sulfates (KS) sont des exceptions car ils se lient à la protéine sans *linker* intermédiaire, au niveau des fonctions hydroxyles ou amides [25]. La synthèse des GAG débute dans le RE, à l'interface avec l'appareil de Golgi, par l'élongation du *linker* (ou des premiers oses dans le cas des KS). Une fois le linker synthétisé, différentes glycosyltransférases peuvent alors y ajouter (un nombre variable de fois) un motif disaccharidique répété [26]. Comme pour la O-glycosylation de type mucine, les oses constituant les chaînes GAG proviennent du cytosol, sous forme de nucléotides-sucres acheminés dans l'appareil de Golgi par des transporteurs de la famille SLC35. De plus, les chaînes GAG sont souvent abondamment sulfatées, ce qui leur confère une charge fortement négative à l'origine de propriétés hydrophiles importantes notamment au niveau des matrices extracellulaires (Fig. 4).

## Désordres congénitaux de la glycosylation (CDG)

La pléthore d'enzymes impliquées dans la glycosylation, très spécifiques et sensibles à l'environnement biochimique (pH, cofacteurs, etc.) ainsi que la variété de transporteurs et autres acteurs moléculaires font de la glycosylation un processus particulièrement complexe et fragile. Des anomalies de glycosylation peuvent apparaître au cours de certaines pathologies acquises (par ex. insuffisance hépatique, certains cancers). Les maladies héréditaires du métabolisme définies par une atteinte de la glycosylation sont regroupées sous le terme de « désordres congénitaux de la glycosylation » ou CDG pour *congenital disorders of glycosylation*. À ce jour, plus de 160 CDG ont été identifiés, de transmission principalement autosomique récessive (exceptionnellement,

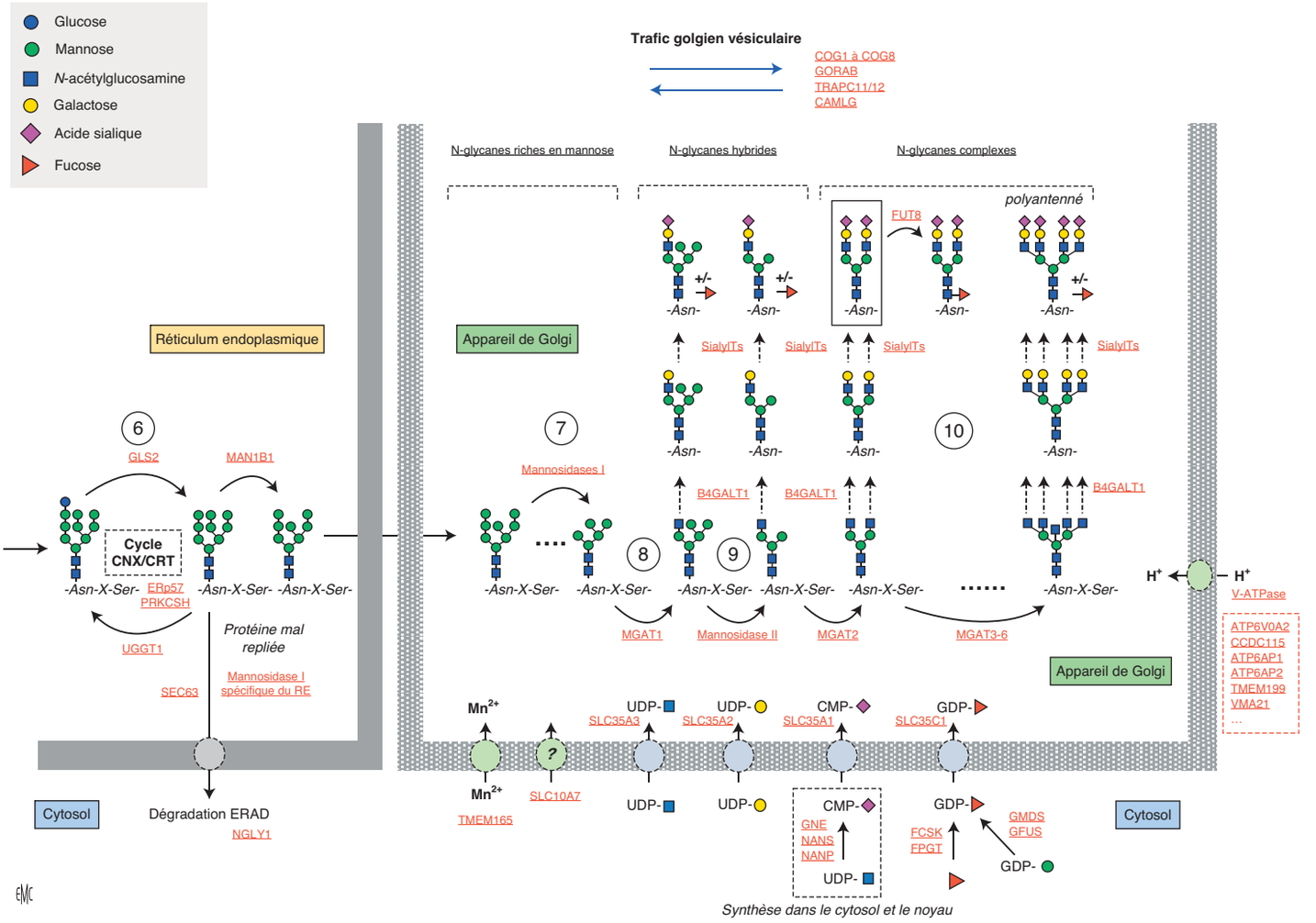


**Figure 2.** N-glycosylation : suite et fin des étapes dans le réticulum endoplasmique (RE) et étapes golgiennes. La glycoprotéine subit d'abord un contrôle de qualité, consistant en sa reconnaissance par les chaperonnes calnexine/calréticuline (CNX/CRT) (6). L'oxydoréductase ERp57 pourra participer à la correction d'éventuelles anomalies de repliement en remaniant les liaisons disulfures au sein de la glycoprotéine. L'élimination du glucose résiduel permettra de libérer la glycoprotéine de ses chaperonnes. Si les anomalies de repliement persistent, l'UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) rajoutera un glucose, entraînant une nouvelle reconnaissance de la glycoprotéine par ses chaperonnes. Après quelques cycles de contrôle de qualité, si la glycoprotéine n'est toujours pas correctement repliée, elle sera orientée vers le cytosol pour être dégradée et recyclée. Si la glycoprotéine est correctement repliée, elle sera transportée vers l'appareil de Golgi liée à des chaperonnes, grâce au trafic vésiculaire antérograde. Dans l'appareil de Golgi, le N-glycane, qualifié à ce stade de « riche en mannose », pourra être maturé suite à l'ajout puis à l'hydrolyse de différents sucres : trois mannoses sont retirés du N-glycane, sous l'action des mannosidases I golgiennes (7) ; une *N*-acétylglucosamine est ajouté grâce à une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) transférase (8) ; deux mannoses sont retirés par des mannosidases II golgiennes (9) ; et différents sucres activés, provenant du cytosol, sont ajoutés par différentes glycosyltransférases, produisant un N-glycane mature (de type soit « complexe » soit « hybride ») (10). Les acteurs moléculaires décrits comme impliqués dans la pathogénie de désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) sont indiqués en rouge. ERAD : *endoplasmic-reticulum-associated protein*.

autosomique dominante ou liée à l'X) [27]. Ces pathologies sont rares, la plupart d'entre elles n'ayant été rapportées que chez un faible nombre d'individus [28]. Les variants pathogènes concernent des gènes codant pour des enzymes de la glycosylation (glycosyltransférases, glycosidases, isomérases, mutases, etc.), des protéines du trafic golgien (comme les protéines COG pour *conserved oligomeric Golgi complex*), des transporteurs de nucléotides-sucres (famille SLC35) ou certains transporteurs d'ions (par ex. pompe à protons, transport golgien du manganèse) [27]. Les premiers CDG décrits (MGAT2-CDG, PMM2-CDG, MPI-CDG, etc.) ont été caractérisés sur la base d'anomalies de la glycosylation des protéines. Depuis, d'autres CDG ont été caractérisés sur la base d'anomalies de la glycosylation des lipides, ou de défauts de synthèse des ancres GPI [29–32]. Les CDG sont des pathologies aux tableaux cliniques hétérogènes, regroupant des symptômes souvent peu spécifiques et de sévérité variable. La plupart des patients présentent des signes neurologiques auxquels sont fréquemment associés un retard de croissance, une hypotonie, une hépatopathie, une coagulopathie et une dysmorphie. Bien que ces pathologies soient aujourd'hui pour la plupart incurables, la prise en charge de certains CDG comme MPI-CDG, PGM1-CDG, SLC39A8-CDG et TMEM165-CDG a connu des progrès significatifs avec des traitements (mannose et/ou galactose per os, manganèse per os) permettant une amélioration des anomalies de la glycosylation, voire des signes cliniques [33, 34].

Bien que l'histoire naturelle des CDG soit à ce jour imparfaitement comprise, il est probable qu'une partie des signes cliniques se développent avant la naissance. Plusieurs études sur modèles animaux et chez l'Homme ont souligné le rôle majeur des glycoprotéines dans l'embryogenèse et le développement fœtal [35–39]. Les défauts de glycosylation pourraient, dans ce contexte, entraîner des défauts de repliement protéique, de transport, ou de liaison ligand–récepteur, à l'origine de désordres dans des voies de signalisation essentielles au développement prénatal (par ex. TGF-β, *Sonic Hedgehog*, *Notch*), ou altérant directement les fonctions de certaines protéines (par ex. les protéoglycanes dans le contexte du développement des cartilages et des os).

Le tableau clinique des CDG étant classiquement peu spécifique, leur diagnostic nécessite des analyses biochimiques et

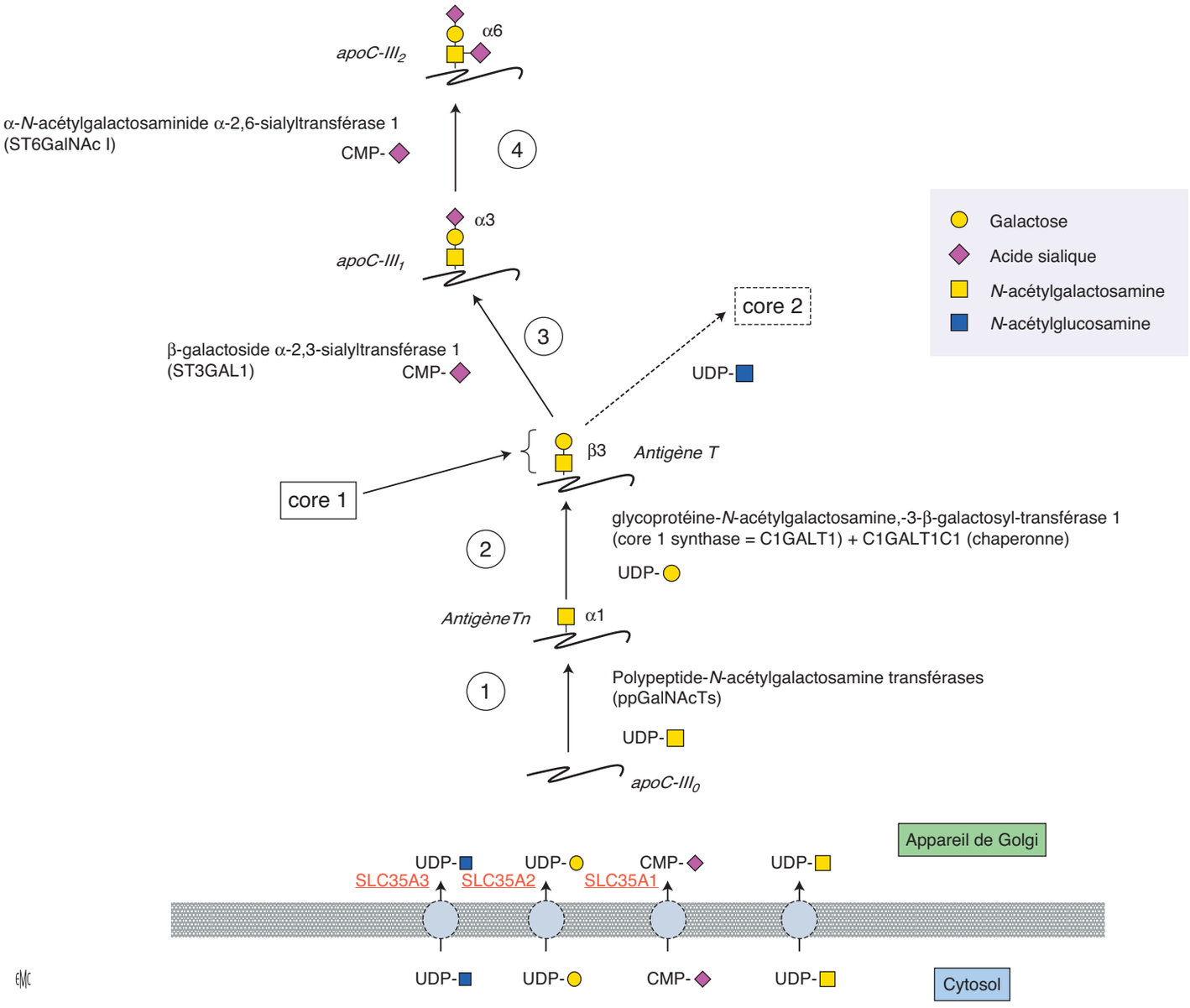


**Figure 3.** O-glycosylation de type mucine core 1 : exemple de l'apolipoprotéine C-III (apoC-III). Une *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) est greffée sur l'oxygène de la chaîne latérale d'une thréonine par une polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase (ppGalNAcT) (1), puis un galactose est ajouté grâce à la glycoprotéine-*N*-acétylgalactosamine,3-β-galactosyltransférase 1 (aussi appelée C1GalT1 ou core 1 synthase), produisant le motif mucine core 1 (2). Puis un acide sialique est greffé sur le galactose par la β-galactoside α-2,3-sialyltransférase (ST3Gal1) (3). Parfois, un deuxième acide sialique est greffé à la GalNAc par la α-N-acétylgalactosaminide α-2,6-sialyltransférase (ST6GalNAc I) (4). Les glycoformes asialylée, monosialylée et disialylée de l'apoC-III sont dénommées respectivement apoC-$III_0$, apoC-$III_1$ et apoC-$III_2$.

génétiques complémentaires. Les analyses biochimiques étudient la glycosylation des protéines (charge, masse moléculaire, structure des glycanes) et permettent généralement d'orienter vers un type de CDG voire, plus exceptionnellement, vers un sous-type précis (voir infra) [40]. Les analyses génétiques permettent d'identifier le variant pathogène, ce qui, au-delà de l'aspect diagnostique (d'une maladie souvent incurable), présente un intérêt majeur dans le cadre d'un éventuel conseil génétique. Les analyses biochimiques et génétiques sont complémentaires dans la démarche diagnostique, la génétique seule étant souvent insuffisante (découverte de variants de signification indéterminée [VSI]).

L'approche analytique à l'origine de la découverte des CDG a consisté en l'étude des N-glycoformes de la transferrine (Tf) sérique par isoélectrofocalisation (IEF). Deux types de profils anormaux de la Tf ont été caractérisés, donnant naissance à la distinction historique entre CDG de type I (CDG-I) et CDG de type II (CDG-II) [41]. Les CDG-I impliquent les premières étapes de la N-glycosylation (synthèse de l'oligosaccharide précurseur et transfert sur la protéine en cours de synthèse), avec des variants pathogènes de gènes codant pour des enzymes du cytosol ou du RE, à l'origine d'un défaut partiel de structure du glycane précurseur, et de sa non-reconnaissance par le complexe OST. Pour la Tf, cette non-reconnaissance se traduit par une sous-occupation des sites de N-glycosylation. Les CDG-II impliquent des déficiences dans les étapes suivantes du processus de N-glycosylation (maturation du N-glycane après sa liaison à la protéine), avec des variants pathogènes de gènes codant pour des acteurs moléculaires des compartiments terminaux du RE ou de l'appareil de Golgi. Dans les CDG-II, la Tf porte ses chaînes de N-glycanes, mais celles-ci présentent des structures anormales, le plus souvent tronquées. Au fur et à mesure de l'augmentation du nombre de CDG identifiés et de la nature très diverse des gènes impliqués, la classification historique en CDG-I/CDG-II (CDG-Ia, CDG-Ib, CDG-Iia, etc.) a évolué, et repose maintenant sur une nomenclature associant le nom du gène muté au suffixe « -CDG » (PMM2-CDG, MPI-CDG, MGAT2-CDG, etc.) [42].

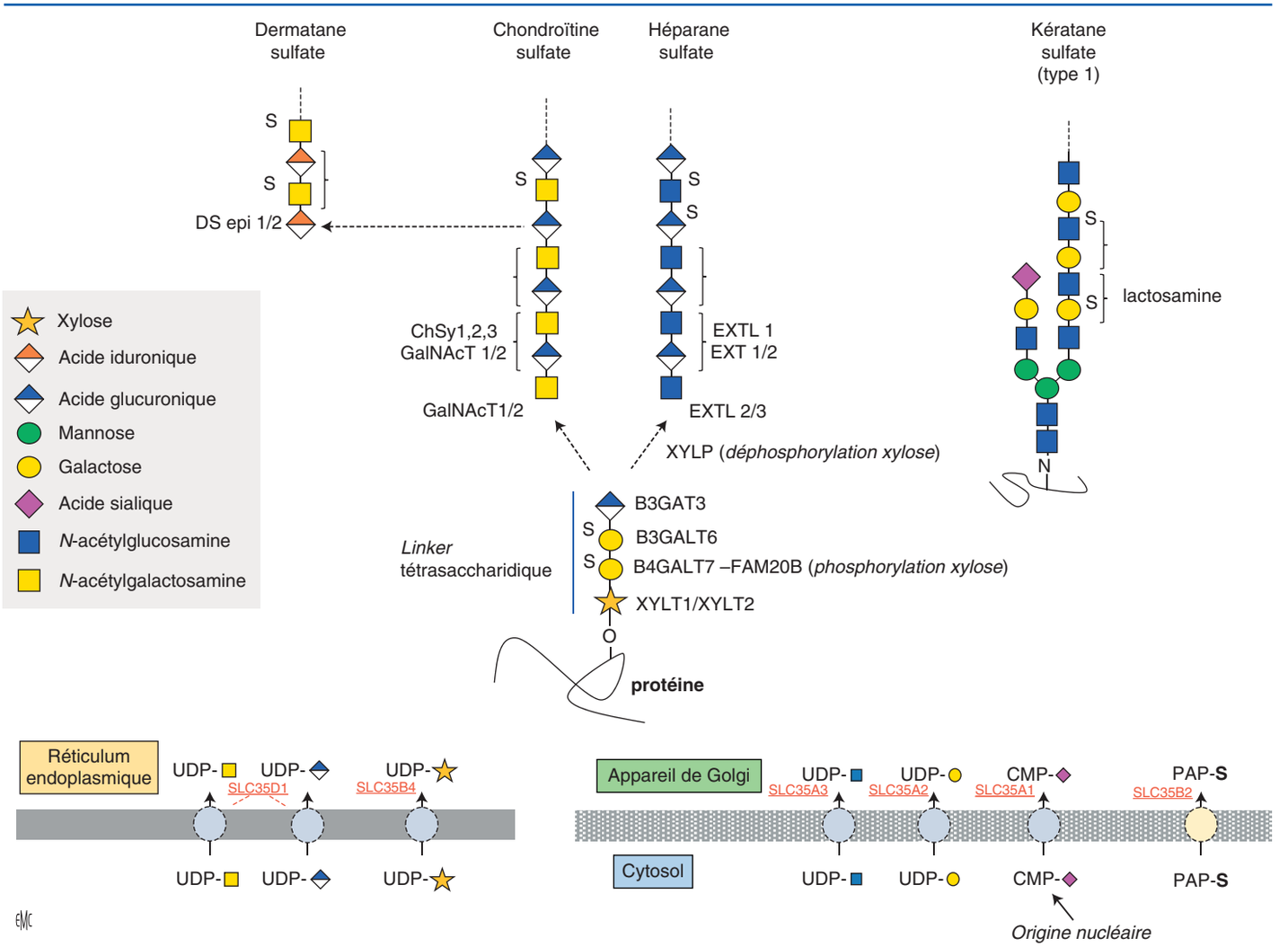


**Figure 4.** Biosynthèse et modifications des glycosaminoglycanes (GAG) (à l'exclusion de l'héparine et des kératane-sulfates de types II et III). À l'extrémité libre du tétrasaccharide *linker* (GlcA-Gal-Gal-Xyl) lié à la protéine (O-xylosylation), la polymérisation de la chaîne GAG est initiée par le transfert d'une première osamine (*N*-acétylgalactosamine [GalNAc] pour la chondroïtine sulfate [CS], *N*-acétylglucosamine [GlcNAc] pour l'héparane sulfate [HS]) et se poursuit par l'ajout d'un nombre variable de motifs disaccharidiques répétés (GlcA-GalNAc pour les CS, GlcA-GlcNAc pour les HS). À ce stade, un phénomène d'épimérisation du GlcA de la chaîne CS peut être à l'origine d'un dermatane sulfate (DS ; IdoA-GalNAc). Les chaînes GAG sont par ailleurs abondamment sulfatées. Chaque voie de synthèse implique l'action de glycosyltransférases spécifiques, ainsi que celle de sulfotransférases (non illustrées ici) et d'épimérases. Pour le kératane sulfate (KS ; GlcNAc-Gal), la synthèse peut s'initier de trois façons. Les oses utilisés dans la synthèse des GAG proviennent du cytoplasme, sous la forme de nucléotide-oses, avant d'être transloqués dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi grâce à des transporteurs de la famille SLC35. XylT : Xylosyltransférase ; β4Gal-T7 : β-4-galactosyltransférase 7 ; β3Gal-T6 : β-3-galactosyltranférase 6 ; β3GAT3 : β-3-glucuronyltransférase 3 ; CSGalNAcT1/2 : N-acétylgalactosaminyltransférase 1/2 ; ChSy : complexe chondroïtine synthase ; DS epi : dermatane sulfate épimérase ; EXT : famille de protéines exostosine ; EXTL : exostosine-*like*.

# ■ Biomarqueurs classiques des CDG et techniques analytiques associées

## Analyse de la transferrine sérique (N-glycosylation) par techniques électrophorétiques

La Tf est une N-glycoprotéine de 679 acides aminés (masse moléculaire : ≈ 80 kDa) synthétisée par les hépatocytes et sécrétée en concentration importante (1 à 4 g/l) dans le plasma. Elle joue un rôle majeur dans l'homéostasie du fer, pouvant fixer jusqu'à deux ions ferriques ($Fe^{3+}$) qu'elle transporte dans le sang. Elle possède deux sites de N-glycosylation, sur les Asn 413 et 611 [43]. Chez le sujet sain, ces deux sites sont occupés par des N-glycanes complexes biantennés, et la glycoforme majoritaire de la Tf porte donc quatre acides sialiques terminaux (4-sialoTf). Les autres glycoformes sont présentes en quantités moins importantes, voire indétectables, et on retiendra, à côté de la 4-sialo Tf, la séparation en quantités significatives de 5-, 3- et 2-sialoTf [44] (Fig. 5).

La première technique mise au point pour étudier les glycoformes de la Tf a été l'IEF sur gel, suivie d'une immunofixation et d'une coloration protéique [45]. Dans cette technique, les glycoformes sont séparées selon leur point isoélectrique (p*I*), qui varie selon le nombre d'acides sialiques terminaux (chargés négativement) portés par les chaînes N-glycanes. Avant l'IEF, les échantillons (plasma/sérum) sont préincubés avec du $Fe^{3+}$ pour saturer la Tf, car une hétérogénéité de charge en fer induirait une forte hétérogénéité des p*I*, cela indépendamment du nombre d'acides sialiques terminaux.

Il est à noter que des altérations dans les proportions des glycoformes de la Tf ont initialement été découvertes chez des sujets alcooliques chroniques, et que l'analyse de la « transferrine désialylée » (*carbohydrate-deficient transferrin*, CDT) a été popularisée dans ce contexte [46, 47]. L'observation de profils anormaux de la Tf dans le liquide céphalorachidien de patients présentant des troubles neurologiques a, par la suite, été à l'origine de la découverte des CDG [32, 48]. Comme évoqué supra, deux types de profils

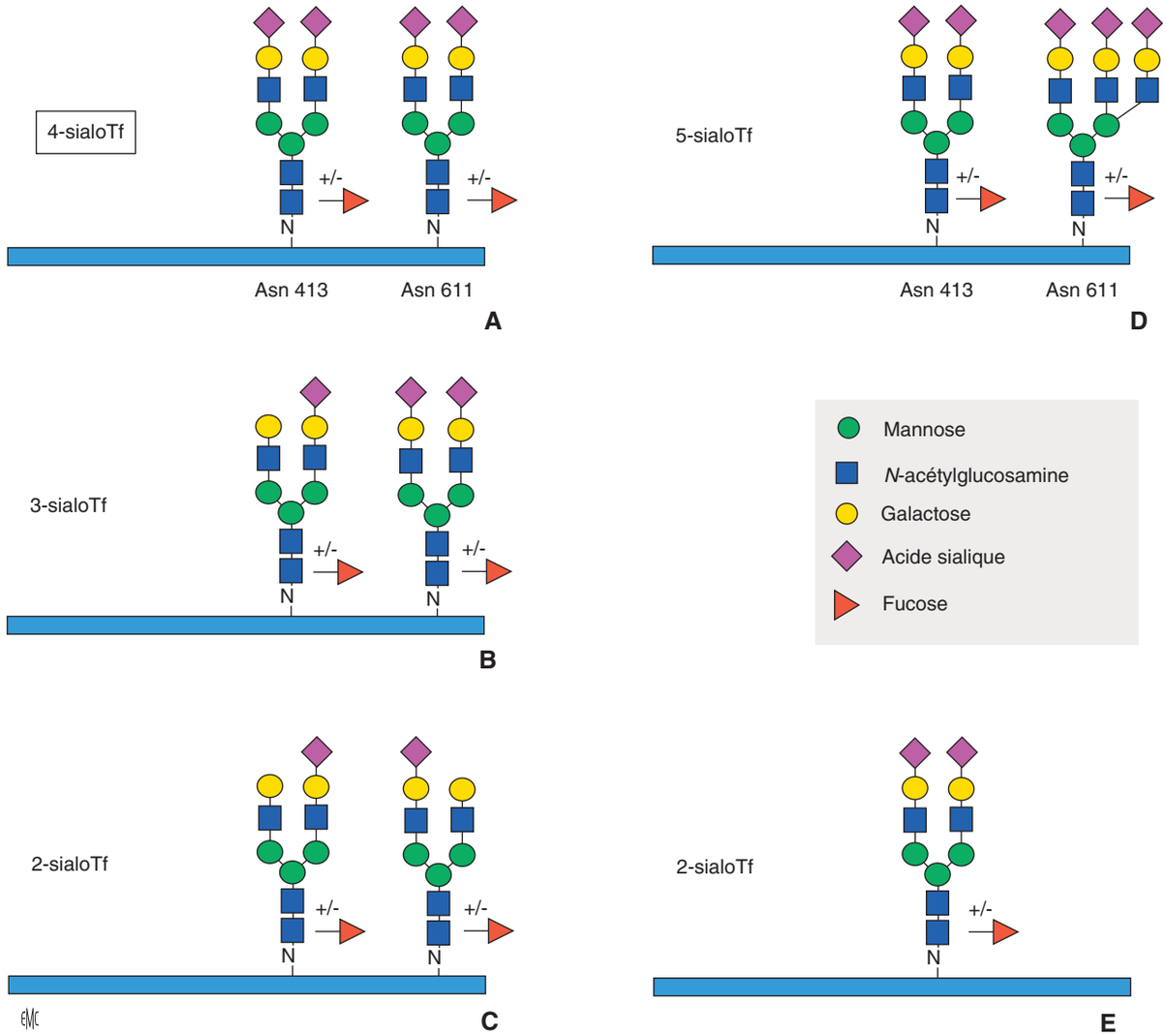


**Figure 5.** Exemples de glycoformes sanguines de la transferrine. Tétrasialotransferrine (4-sialoTf), la glycoforme de la transferrine (Tf) la plus abondante dans le sang (78–86 % du total), portant deux chaînes N-glycane et exposant donc quatre acides sialiques terminaux (A) ; trisialotransferrine (3-sialoTf) (B) ; et disialotransferrine (2-sialoTf), deux glycoformes mineures (< 6 % et < 1,6 % du total, respectivement), caractérisées par l'absence d'un 3-sialoTf ou de deux 2-sialoTf acides sialiques terminaux (C, D). Les glycoformes hyposialylées peuvent résulter d'un défaut de maturation des N-glycanes (par ex. C) et/ou de l'absence d'une ou de deux chaînes N-glycanes entières (par ex. D). Ces glycoformes sont typiquement présentes en proportions augmentées dans le sang des patients atteints de désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) (aux dépens de la forme 4-sialoTf). Elles sont identifiables grâce à leurs différences de charges électriques (techniques telles que l'isoélectrofocalisation ou l'électrophorèse capillaire). À noter que sont présentes en proportions variables des glycoformes de Tf portant des chaînes N-glycanes polyantennées, avec plus de quatre acides sialiques terminaux (par ex. la 5-sialoTf (11–18 % du total [E]). Les différentes glycoformes de la Tf peuvent être fucosylées.

anormaux de la Tf ont pu être observés dans le sérum/plasma : un profil « CDG-I », avec une élévation des proportions de 2- et de 0-sialoTf (traduisant la perte d'une ou de deux chaînes N-glycanes entières) ; et un profil « CDG-II », avec une élévation en proportions variables des glycoformes hyposialylées (3-sialo à 0-sialo Tf ; traduisant la présence de chaînes tronquées) (Fig. 5). La majorité des cas de CDG sont détectables avec cette technique. Par ailleurs, le profil de la Tf peut, dans de rares cas, suggérer un CDG précis : par exemple, MGAT2-CDG et B4GALT1-CDG présentant un décalage cathodique complet ; PGM1-CDG présentant un profil mixte CDG-I + CDG-II ; et MAN1B1-CDG présentant une élévation isolée et importante de la forme trisialylée de la Tf [30, 49–51].

L'IEF reste aujourd'hui la technique de référence pour l'étude des glycoformes de la Tf appliquée au dépistage/diagnostic des CDG. Cependant, l'électrophorèse capillaire (CE) s'est imposée comme une alternative de choix [52, 53]. En CE, les glycoformes sont séparées selon leur mobilité électrophorétique, qui dépend de leur charge (nombre d'acides sialiques terminaux) et de leur taille (nombre et longueur des chaînes N-glycanes). Les kits commerciaux, initialement développés dans le contexte du dépistage de l'éthylisme, offrent des performances comparables voire supérieures à l'IEF pour le dépistage des CDG [54, 55]. Outre le fait que la CE présente des avantages d'ordre pratique, avec des analyseurs automatisés et plus simples à déployer que l'IEF, elle permet des séparation et quantification plus précises des glycoformes de la Tf (Fig. 6). De plus, les automates peuvent être utilisés en parallèle pour d'autres applications (électrophorèse des protéines sériques, ou de l'hémoglobine), ce qui est intéressant d'un point de vue organisationnel et financier. Il faut toutefois noter que la CE reste théoriquement sensible aux interférents communs aux techniques d'étude des protéines, tels que le fibrinogène, les immunoglobulines, les protéines du complément, l'hémolyse, la lipémie, l'ictère, ou certaines substances présentes dans les prélèvements sanguins des patients avec hépatopathie sévère [56].

De façon plus notable, l'IEF et la CE sont sensibles à certains polymorphismes génétiques de la Tf, qui impactent le plus souvent son p*I* et sont à l'origine de pics additionnels pouvant être attribués à tort à des troubles innés ou acquis de la glycosylation. Exceptionnellement, ces polymorphismes peuvent affecter un site de N-glycosylation, à l'origine d'une

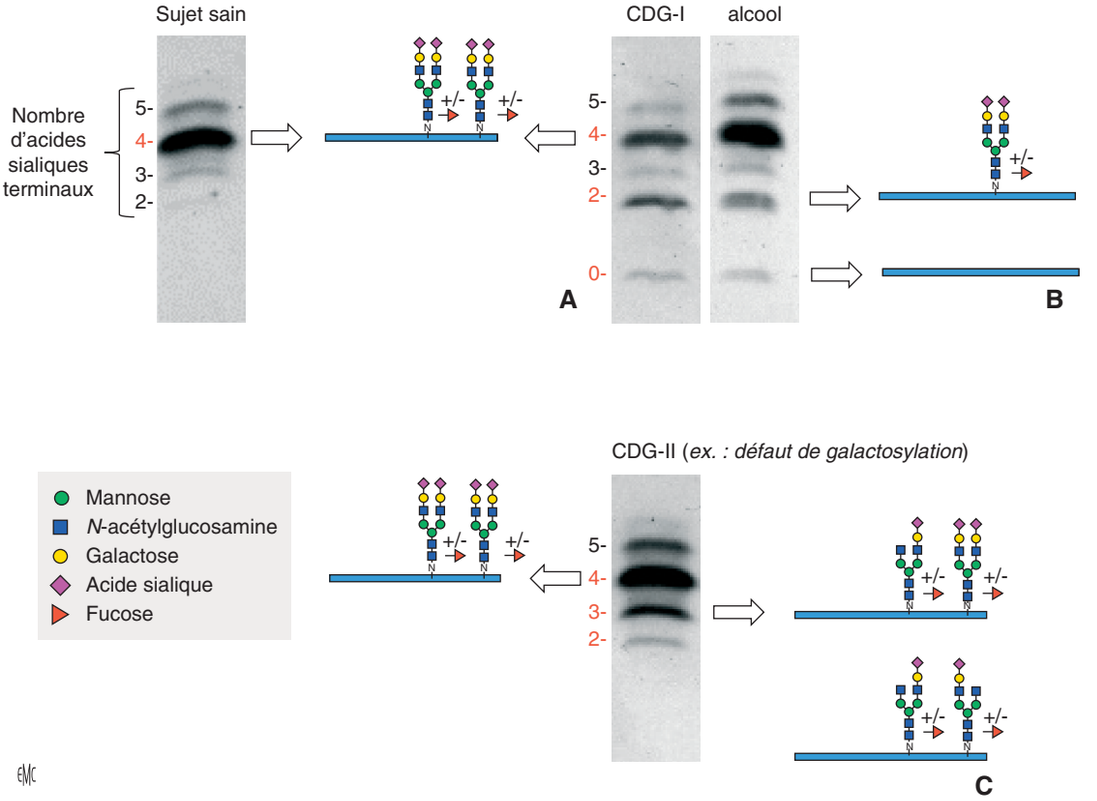


**Figure 6.** Exemples de profils d'isoélectrofocalisation (IEF) de la transferrine (Tf) sérique. En IEF, les glycoformes de la Tf sérique sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (p*I*), qui varie selon le nombre d'acides sialiques terminaux portés par les chaînes N-glycanes.
**A.** Profil d'un individu sain (contrôle). La bande principale est la 4-sialoTf, les autres bandes correspondant aux glycoformes mineures (5-, 3- et 2-sialoTf).
**B.** Profil d'un sujet CDG-I, et d'un sujet éthylique. Ces deux profils sont caractérisés par une diminution de la proportion de 4-sialoTf, et par une augmentation des proportions de 2- et de 0-sialoTf. L'augmentation des pourcentages de ces glycoformes hyposialylées résulte, dans ces deux cas, de la perte d'une ou de deux chaînes N-glycanes entières. Ainsi, un des principaux diagnostics différentiels de CDG-I est l'éthylisme.
**C.** Profil d'un sujet CDG-II, caractérisé par une diminution de la proportion de 4-sialoTf et une augmentation de la 3- à la 0-sialoTf. Ici, l'augmentation des pourcentages des glycoformes hyposialylées résulte d'un défaut de maturation des chaînes N-glycanes, et non pas de la perte de chaînes entières comme dans les CDG-I.

élévation très importante de la fraction 2-sialo [57–59]. Dans tous les cas, le risque est la confusion avec l'alcoolisme chronique ou un CDG, entraînant une errance diagnostique et des analyses complémentaires superflues. Dans la plupart des cas, les polymorphismes de la Tf peuvent être détectés après traitement à la sialidase/neuraminidase (Fig. 7). Cette enzyme permet de retirer les acides sialiques terminaux des chaînes de N-glycanes, ce qui permet de détecter les différences de charges du squelette protéique [58, 60]. Un individu hétérozygote pour le gène de la Tf présentera alors deux pics distincts de 0-sialoTf, contre un seul pour un individu homozygote (*wild-type* comme muté). Cette technique peut cependant être mise en défaut dans les rares cas de polymorphismes avec abolition d'un site de N-glycosylation, et où l'acide aminé « sauvage » est substitué par un acide aminé de p*I* proche auquel cas un seul pic de 0-sialoTf sera présent après traitement [59]. Dans des cas exceptionnels, un individu peut être à la fois porteur d'un polymorphisme de la Tf et atteint de CDG [61].

Chez les patients avec hépatopathie, des anomalies particulières de la N-glycosylation (ex. polyantennarité et/ou fucosylation excessive) peuvent entraîner des défauts de séparation (ex. « bloc 2-3-sialoTf ») à l'origine de difficultés d'interprétation des profils d'IEF ou de CE [62]. Cela a notamment été décrit chez des patients souffrant de cirrhose, de stéatose hépatique dysmétabolique ou d'hépatite C chronique. Dans ces situations, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pourrait permettre de « récupérer » près de la moitié des profils de la Tf initialement non interprétables [62, 63].

Une limite de ces techniques est leur incapacité à dépister les CDG avec anomalies de la fucosylation (le fucose étant latéral et non chargé ; ex : FUT-CDG, FCSK-CDG), ou ceux sans anomalie détectable de la N-glycosylation (ex : GNE-CDG, PIG-CDG) [64]. Enfin, ont été rapportés d'exceptionnels cas avérés de CDG liés à des troubles de la N-glycosylation, mais présentant des profils de la Tf normaux ou subnormaux (par ex. dans certains PMM2-CDG, ATP6V0A2-CDG, SLC35A2-CDG, etc.) [63–69]. Ces cas ne sont à ce jour pas bien expliqués, certains auteurs évoquant (au moins pour le PMM2-CDG) une normalisation des profils de la Tf avec l'âge. En parallèle, des améliorations spontanées des concentrations de certains paramètres biologiques (coagulation, transaminases, *thyroid-releasing hormone* [TRH]) ont aussi pu être notées chez certains patients [70–72]. Toutefois, ces améliorations biologiques ne se sont pas toujours associées à des améliorations cliniques évidentes. Ces données sont à garder en mémoire lorsque les analyses de premières intentions sont normales chez un individu suspect de CDG (et surtout chez l'adulte), et lors du choix des biomarqueurs de suivi dans le cadre d'études thérapeutiques [73, 74].

## Analyse de la transferrine sérique (N-glycosylation) par spectrométrie de masse (SM)

Des techniques basées sur la SM ont été développées, en particulier aux États-Unis, au Japon et aux Pays-Bas, pour l'analyse des glycoformes de la Tf. Ces techniques permettent de détailler avec précision les structures des chaînes N-glycanes liées à la Tf, voire parfois d'orienter vers un gène causal. La technique la plus utilisée est l'analyse de la Tf immunopurifiée intacte, par chromatographie liquide (LC) couplée à une analyse par un spectromètre à haute résolution de type quadripôle–temps de vol équipé d'une

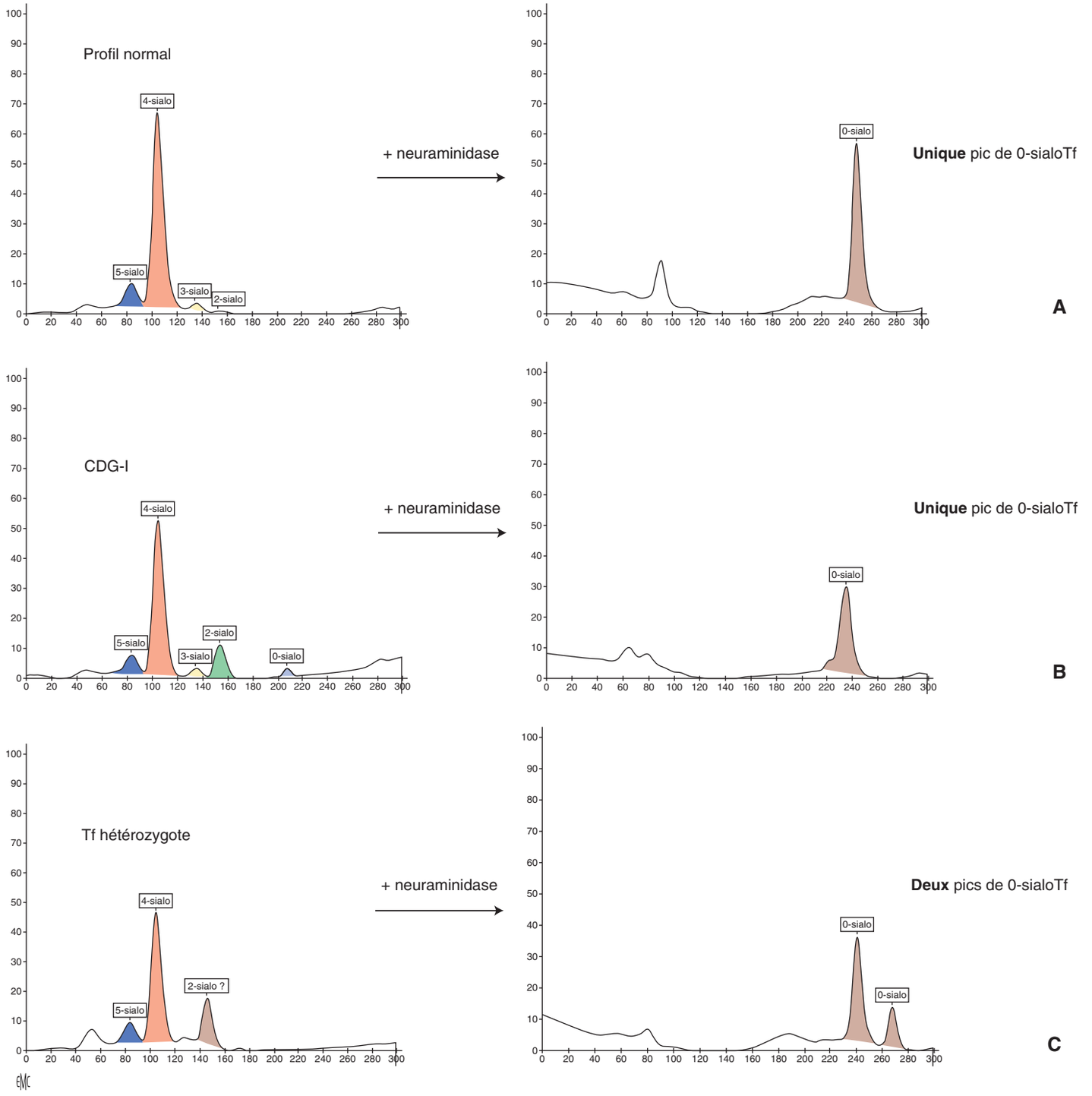


**Figure 7.** Exemples de profils d'électrophorèse capillaire (CE) de la transferrine (Tf) sérique, et utilisation de la neuraminidase/sialidase pour la détection des polymorphismes protéiques. En CE, les glycoformes de la Tf sanguine sont séparées principalement en fonction de leur p*I*, qui varie selon le nombre d'acides sialiques terminaux.

**A.** Profil d'un individu sain. Le pic principal correspond à la 4-sialoTf et les autres pics correspondent aux autres glycoformes notables (5-, 3- et 2-sialoTf). Le traitement par la neuraminidase/sialidase retire les acides sialiques terminaux, produisant un unique pic de 0-sialoTf.

**B.** Profil d'un sujet CDG-I, caractérisé par une proportion diminuée de 4-sialoTf, et des proportions accrues de 2- et de 0-sialoTf. Le traitement par la neuraminidase produit un pic unique de 0-sialoTf.

**C.** Profil d'un individu sain porteur d'un polymorphisme de la Tf à l'état hétérozygote. On note la présence d'un (plus ou moins) grand pic comigrant avec la 2-sialoTf, pouvant être confondu avec un profil CDG-I. Cependant, ici, le traitement par la neuraminidase produit deux pics de 0-sialoTf, chacun correspondant à une isoforme protéique de la Tf.

source d'ionisation *electrospray* (*ESI quadrupole – time-of-flight* [Q-TOF]) [75, 76].

Bien que cette technique ne parvienne pas à discriminer certains sous-types de CDG-I (caractérisés par l'absence d'une ou de deux chaînes N-glycanes), elle peut permettre d'identifier des structures caractéristiques de certains CDG-II (par ex. MGAT2-CDG : N-glycanes monoantennés ; B4GALT1-CDG : agalactosylation complète ; PGM1-CDG : sous-occupation des sites de N-glycosylation et défauts de galactosylation) [51, 77]. Toutefois, cette technique présente des contraintes analytiques particulières.

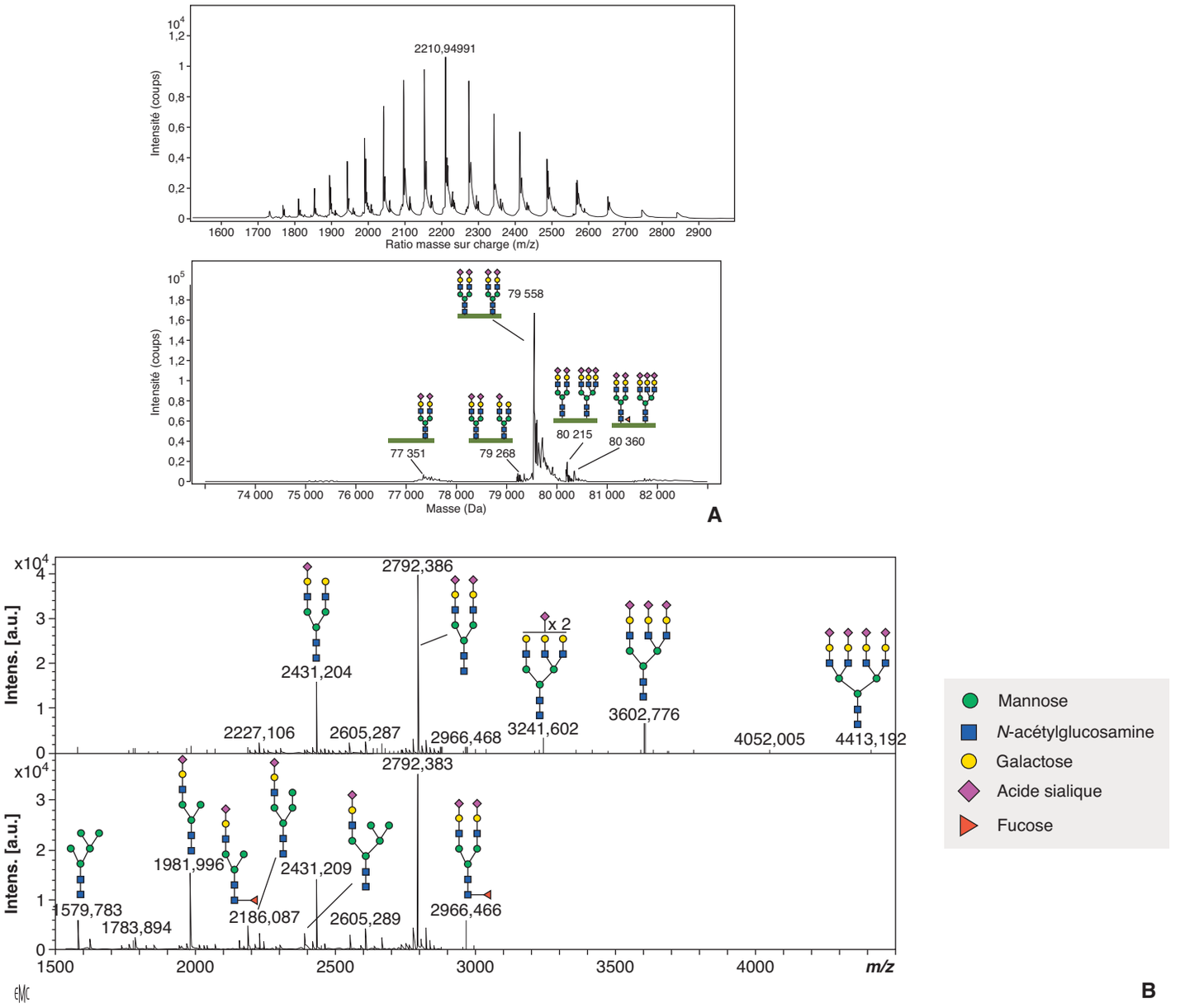


**Figure 8.** Exemples de techniques de spectrométrie de masse appliquées à la transferrine (Tf) sanguine et au N-glycome.
**A.** Distribution des ions multichargés de la Tf (haut) et spectre de masse obtenu après déconvolution (bas).
**B.** Spectres de masse *matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight* des N-glycanes perméthylés libérés après traitement des glycoprotéines par la peptide-N-glycosidase F (PNGase F). En haut, sérum d'un sujet sain ; en bas, sérum d'un patient avec défaut de GlcNAcylation. Les profils ont été obtenus en mode positif, et tous les ions sont sous forme d'adduits sodium.

Les spectres de masse de la Tf sont complexes, et nécessitent d'être déconvolués en un spectre de « charge nulle » afin d'en faciliter l'interprétation (Fig. 8A). Cette étape peut être source d'erreurs, par exemple dans le cas de spectres associant variant(s) de la Tf, assez fréquent(s), et glycoformes multiples. Les risques sont alors que la résolution spectrale et la précision de mesure de masse soient insuffisantes pour discriminer certaines glycoformes qui ne diffèrent que de quelques Da, ou une sensibilité insuffisante pour la détection de glycoformes minoritaires [78]. À titre d'exemple, van Scherpenzeel et al. ont rapporté des masses de la 4-sialoTf variant de 79 546 à 79 560 Da (masse théorique attendue : 79 556 Da) dans une cohorte d'une centaine de témoins et patients [51]. Bien que cela n'empêche pas de détecter des variants de la Tf (différences de masse d'environ 30 Da, telles que rapportées par Zühlsdorf et al.), une telle précision de mesure de masse pourrait être plus problématique pour identifier des glycoformes minoritaires de la Tf de masses proches [78, 79]. Jansen et al. ont publié en 2020 une étude menée chez 247 patients atteints d'hépatopathie et chez 40 témoins, dont les profils de la Tf ont été établis par ESI-Q-TOF. Des spectres interprétables n'ont pu être obtenus que chez 110 patients et 39 témoins (soit environ 52 %), ce qui pose des questions quant aux performances de la méthode dans le contexte du diagnostic biochimique des CDG [76].

De plus, comme pour les techniques précédentes, il existe un certain nombre de CDG ne pouvant être discriminés par SM de la Tf immunopurifiée. En effet, cette protéine est essentiellement synthétisée et sécrétée par le foie, et reflète donc surtout l'état de la machinerie de glycosylation hépatique. Chez les patients atteints de MOGS-CDG, le profil de la Tf est fréquemment normal, quand l'étude des N-glycanes plasmatiques totaux et/ou portés par les immunoglobulines G (IgG) (voir infra) met en lumière des défauts de glycosylation (accumulation de N-glycanes riches en mannose) [80–82]. Cela est également le cas dans les CDG avec troubles de la fucosylation, la Tf étant particulièrement peu fucosylée [83].

Ainsi, chaque technique d'étude de la Tf présente ses avantages et ses inconvénients. Les techniques électrophorétiques basées sur la charge de la protéine sont peu coûteuses et relativement

simples à mettre en œuvre, mais ne proposent que des informations limitées quant aux anomalies de glycosylation. À l'inverse, les techniques basées sur la SM offrent des données structurales précises, mais sont plus coûteuses et peuvent être plus délicates, notamment dans un contexte d'activité à relativement faible débit, telle que celle du dépistage biochimique des CDG.

## Analyse du N-glycome sérique/plasmatique total après traitement par la peptide-N-glycosidase F (PNGase F) ou l'endo-β-N-acétylglucosaminidase H (EndoH)

L'analyse du N-glycome sérique/plasmatique total est une analyse éprouvée qui complémente de manière intéressante le profil de la Tf sérique. Cette technique a été adoptée par de nombreux laboratoires comme outil robuste et efficace de diagnostic de CDG [84–88]. Il a par exemple été montré que le N-glycome plasmatique total suivi d'une approche de classification hiérarchique des données permettait de classer efficacement les patients d'une cohorte de 99 individus présentant des troubles de la glycosylation golgienne. Dans cette même cohorte, la découverte d'anomalies particulières du N-glycome chez quatre patients porteurs de variants dans le gène *SLC10A7* a par ailleurs permis d'établir un lien entre ce transporteur et une modification du N-glycome, lien jusqu'alors non reporté [89].

La réalisation du N-glycome sérique/plasmatique débute par le clivage des chaînes N-glycanes de l'ensemble des glycoprotéines circulantes sous l'action de la peptide-N-glycosidase F (PNGase F). Cette enzyme clive la liaison entre la première GlcNAc du N-glycane et l'Asn qui la porte. Puis, les N-glycanes libres sont généralement modifiés chimiquement avant analyse (par ex. perméthylation ou estérification des acides sialiques), ou dérivés par introduction d'une sonde fluorescente (par ex. 2-aminobenzamide, procaïnamide, acide 8-aminopyrène-1,3, 6-trisulfonique). La technique analytique de choix est la SM, généralement de type *matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight* (MALDI-TOF) et/ou LC-ESI à haute résolution (*high-resolution mass spectrometry* [HRMS]) [85, 88]. Des couplages performants de type LC ou CE avec détection par fluorescence ont également été développés.

Dans le cadre du diagnostic des CDG, la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet une analyse du N-glycome à relativement haut débit, plus facile d'utilisation et produisant des données relativement simples à interpréter (Fig. 8B). Dans un cadre plus fondamental, un défaut de cette approche est son incapacité à distinguer les N-glycanes isomères, par exemple les SA liés en α2,3- ou α2,6-, ou les différentes structures polymannosylées. Dans le cas des SA, une dérivation chimique spécifique des SA liés en α2,3- ou α2,6- peut permettre de les distinguer efficacement [83]. Plus récemment, l'analyse par HRMS de type Q-TOF des N-glycanes préalablement marqués par une sonde *N*-hydroxysuccinimide carbamate (*Rapi*Fluor-MS®) a permis d'obtenir des niveaux de spécificité et sensibilité particulièrement élevés et grandement améliorés en ce qui concerne le diagnostic de CDG [90, 91]. Avec cette méthode, l'analyse des échantillons par injection directe (sans séparation préalable des N-glycanes par LC) est possible et peut permettre d'assurer un haut débit analytique [90]. La séparation des N-glycanes par LC d'interactions hydrophiles (HILIC) suivie par une analyse par ESI-HRMS peut permettre de différencier les isomères de configuration, ainsi que les isomères de liaison : cette méthode a notamment permis d'obtenir des résultats intéressants chez des patients MAN1B1-CDG et TMEM199-CDG [81]. Elle a également permis de mettre en évidence des défauts de N-glycosylation sur des protéines sériques spécifiques, comme la Tf, les IgG ou l'$\alpha_1$-antitrypsine [83, 88, 92].

Il est à noter que ces techniques de SM d'analyse du N-glycome ont principalement démontré leur intérêt dans le diagnostic des CDG-II (défaut de maturation des N-glycanes), où elles permettent parfois d'orienter vers l'étape limitante de la synthèse des N-glycanes, et donc vers une étiologie précise [83, 93]. Leur application au diagnostic des CDG-I, caractérisés par la perte de chaînes N-glycanes entières, a été décrite plus récemment avec la mise en évidence de l'accumulation d'un N-tetrasaccharide caractéristique (SA-Gal-GlcNAc$_2$-, aussi nommé « N-tetra ») et de N-glycanes polymannosylés chez des patients atteints d'ALG1-CDG, PMM2-CDG, MPI-CDG, ALG3-CDG, ALG13-CDG et DPM1-CDG [94, 95].

Une limite de l'étude du N-glycome sérique/plasmatique total par SM est que, dans certains CDG, des N-glycanes d'intérêt diagnostique produisent des pics de trop faible intensité pour être exploitables. Dans le cas de certains CDG avec défauts de mannosylation, l'utilisation de l'EndoH, qui clive préférentiellement la liaison entre les deux premières GlcNAc des chaînes N-glycanes hybrides et riches en mannose, a pu permettre d'augmenter la sensibilité de l'analyse par SM. Ainsi, l'approche avec utilisation de l'EndoH a montré de meilleures performances diagnostiques que celles utilisant la PNGase F chez des patients MAN1B1-CDG et SLC37A4-CDG, tous deux caractérisés par des troubles de la (dé)mannosylation [96–98]. Ces résultats suggèrent qu'il existe un potentiel important à l'utilisation d'enzymes alternatives à la PNGase F et à l'EndoH pour l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité des techniques de SM appliquées au diagnostic biochimique de certains CDG.

## Analyse de l'apolipoprotéine C-III sérique (O-glycosylation de type mucine core 1)

L'apolipoprotéine C-III (apoC-III) est une O-glycoprotéine de 79 acides aminés synthétisée et sécrétée par les hépatocytes, mais également par les entérocytes. Elle intervient dans le métabolisme des lipoprotéines, en inhibant l'action de la lipoprotéine lipase [99]. Comme décrit supra (partie « O-glycosylation de type mucine »), sa structure primaire contient un unique site de O-glycosylation sur la Thr 74 [22]. Chez les sujets sains, l'apoC-III porte un O-glycane de type mucine core 1 (Gal-GalNAc-O) essentiellement mono- et disialylé, avec une forme non glycosylée parfois détectable en faible proportion [24] (Fig. 3). La première technique mise au point pour l'étude des glycoformes de l'apoC-III a été l'IEF sur gel suivie par un transfert passif et une immunorévélation [24]. Cette technique a permis de distinguer trois profils anormaux de l'apoC-III : « apoC-III$_2$ », « apoC-III$_1$ » et « apoC-III$_0$ », caractérisés respectivement par des proportions élevées de 2-, 1- et 0-sialo apoC-III par rapport aux valeurs normales. Certaines pathologies acquises (obésité, maladies hépatiques, réanimation) pouvant être à l'origine de profils de l'apoC-III anormaux, il est aujourd'hui établi que dans le cadre des CDG, cette analyse doit essentiellement s'envisager en seconde intention, après la découverte d'un profil de la Tf de type II, à la recherche d'un CDG lié à un trouble de l'homéostasie golgienne [100]. Ainsi, des profils apoC-III$_0$ et apoC-III$_1$ sont très fréquemment retrouvés chez des patients atteints de CDG avec troubles du trafic ou de la régulation du pH golgien (COG-CDG, ATP6V0A2-CDG, CCDC115-CDG) affectant à la fois la N- (CDG-II) et la O-glycosylation [24]. Par ailleurs, tout comme la Tf, l'analyse des glycoformes de l'apoC-III peut être perturbée par des polymorphismes chez les patients hétérozygotes. Le traitement à la neuraminidase permet là aussi de résoudre l'essentiel des cas [24]. Des cas exceptionnels de polymorphismes abolissant le site accepteur de O-glycosylation ont également été rapportés [101].

Bien que l'IEF soit une technique performante pour étudier les glycoformes de l'apoC-III, elle reste soumise aux mêmes limitations que l'IEF de la Tf : la technique est manuelle, et nécessite un personnel expérimenté. Contrairement au cas de la Tf, la CE de l'apoC-III reste encore à développer dans le contexte des CDG, malgré des premiers résultats prometteurs [102]. À noter également que des approches par MALDI-TOF et ESI-MS ont présenté des performances intéressantes pour le dépistage de CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne [103, 104].

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) a également été appliquée à l'apoC-III dans l'objectif d'affiner les résultats obtenus par IEF seule. En 2-DE, une électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée après l'IEF, permettant une seconde séparation des glycoformes de l'apoC-III en fonction de leur masse moléculaire [105] (Fig. 9A). Cette technique présente un intérêt particulier pour la séparation des différentes glycoformes asialylées de l'apoC-III. Celles-ci comprennent l'apoC-III$_{0a}$ (apoC-III non glycosylée),

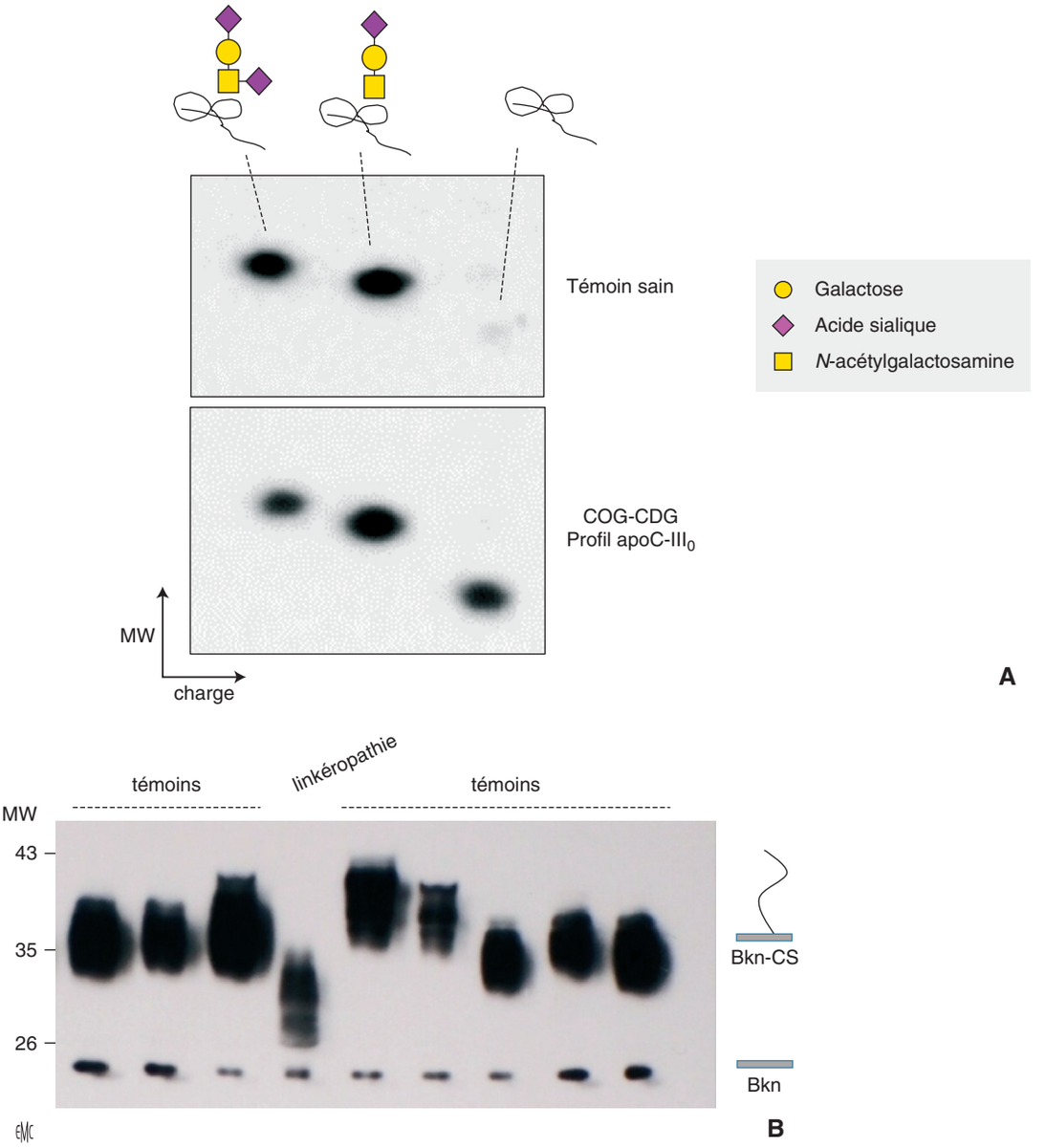


**Figure 9.** Analyse des glycoformes de l'apolipoprotéine C-III par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) et de la bikunine par western blot.
**A.** Électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) des glycoformes de l'apoC-III. Dans un sérum/plasma d'individu sain (haut), les formes apoC-$III_1$ et apoC-$III_2$ sont majoritaires (% apoC-$III_1$ > % apoC-$III_2$), alors que l'apoC-$III_{0a}$ est présente à l'état de traces (< 5 %), voire indétectable. Dans un sérum/plasma d'individu atteint de COG-CDG (bas), l'apoC-$III_{0a}$ est souvent présente en proportion très augmentée.
**B.** Western blot des formes légères de la bikunine sérique/plasmatique. Comparativement aux cas d'individus sains, le western blot des formes légères de la bikunine sérique/plasmatique d'un patient atteint de linkéropathie révèle une bande de masse moléculaire (MW) diminuée, témoignant d'un défaut de synthèse précoce de la chaîne chondroïtine sulfate (CS).

l'apoC-$III_{0b}$ (GalNAc-apoC-III), et l'apoC-$III_{0c}$ (Gal-GalNAc-apoC-III) avec une valeur diagnostique importante d'une augmentation de la forme apoC-$III_{0a}$ vis-à-vis des COG-CDG [105]. Enfin, le profil de l'apoC-III peut présenter un intérêt particulier chez des patients chez qui un CDG est très fortement suspecté (notamment sur une base génétique), mais dont le profil de la Tf est normal. En effet, nous avons rapporté des cas de patients atteints de CDG avec profils de la Tf normaux, et dont les profils de l'apoC-III étaient eux significativement altérés [65].

## Biomarqueurs cellulaires des CDG

Bien qu'utiles pour la caractérisation des CDG dans des cellules en culture (en particulier dans les fibroblastes cutanés de patients), peu de biomarqueurs cellulaires des CDG ont été validés à ce jour. Par exemple, l'*intracellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) est un biomarqueur intéressant pour le diagnostic des CDG-I, car il a été montré qu'une diminution du nombre de ses chaînes N-glycaniques favorisait sa dégradation, avec une diminution de sa concentration cellulaire (appréciée le plus souvent par western blot) par rapport à des cellules contrôles [106, 107]. Les glycoprotéines LAMP2 (*lysosomal-associated membrane protein 2*) et TGN46 (*trans-Golgi network 46*) sont quant à elles des biomarqueurs en développement notamment pour le diagnostic des CDG avec troubles de la N- et/ou de la O-glycosylation. LAMP2 est une protéine membranaire lysosomale richement N-glycosylée, et des anomalies de son profil de migration ont été décrites dans les fibroblastes de patients atteints de certains CDG-II [108–110]. Cette protéine a été particulièrement utilisée pour le suivi d'anomalies de la N-glycosylation dans des fibroblastes de patients atteints de CDG avec trouble de l'homéostasie golgienne, comme les COG-CDG ou le TMEM165-CDG (lié à un déficit d'entrée du manganèse dans la lumière golgienne). TGN46 est, elle, une protéine fortement O-glycosylée, et des anomalies de son profil de migration ont également été décrites dans des fibroblastes de patients

TMEM165-CDG [111]. Enfin, l'alphadystroglycane est une protéine O-mannosylée (la seule connue à ce jour), particulièrement intéressante dans le diagnostic de maladies neuromusculaires graves (les « alphadystroglycanopathies ») associées à des déficits enzymatiques à l'origine de troubles de la O-mannosylation (par ex. POMT1/2-CDG, B3GALNT2-CDG) [112, 113].

Toutefois, ces biomarqueurs cellulaires sont plus ou moins sensibles selon le CDG, certains ne produisant pas ou peu d'altérations de leurs profils de glycosylation, possiblement en lien avec des mécanismes compensatoires développés par les cellules en culture (et souvent au fur et à mesure des « repiquages »).

Par ailleurs, au-delà des applications diagnostiques, les biomarqueurs cellulaires de la glycosylation pourraient présenter un intérêt particulier dans le cadre de la recherche et du développement de thérapies des CDG (par ex. l'epalrestat dans le PMM2-CDG) [114].

### Analyse de la bikunine sérique (O-xylosylation des GAG)

La bikunine est une « protéine-glycosaminoglycane-protéine » synthétisée essentiellement par les hépatocytes et sécrétée sous diverses isoformes présentes en concentrations élevées dans le sang. Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques, telles que la stabilisation des matrices extracellulaires, l'inhibition de protéases inflammatoires et le développement fœtal [26]. Les principales isoformes de la bikunine circulante sont :

- la bikunine libre (Bkn), correspondant à la protéine seule ;
- la bikunine liée à une chaîne GAG de type chondroïtine sulfate (O-xylosylation avec *linker* GlcA-Gal-Gal-Xyl ; Bkn-CS) ;
- la Bkn-CS estérifiée par une ou deux protéine(s) nommée(s) *heavy chain* (HC) à l'origine respectivement de la PαI (*pro-α-trypsin inhibitor*) et de l'ITI (*inter-α-trypsin inhibitor*) [26].

Notre équipe a développé la Bkn-CS sérique comme biomarqueur des « linkeropathies », c'est-à-dire de déficits congénitaux affectant l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse du *linker* GlcA-Gal-Gal-Xyl [115, 116]. Chez les individus atteints (par ex. B4GALT7-CDG et B3GAT3-CDG), nous avons montré une forte augmentation de formes légères de la Bkn sérique suggérant un défaut majeur de synthèse du *linker* tétrasaccharidique (Fig. 9B). De plus, en 2-DE, certains profils caractéristiques d'un gène causal ont pu être observés [115]. Enfin, la Bkn-CS étant abondamment sulfatée, nous avons également montré que l'étude de ses isoformes pourrait permettre de dépister des anomalies de la sulfatation de certains GAG [117].

Comme tout biomarqueur, l'analyse de la Bkn-CS présente elle aussi certaines limites. La bikunine étant synthétisée essentiellement par les hépatocytes, seuls les déficits de la synthèse des GAG issus du foie sont a priori détectables. Par exemple, les patients atteints de XYLT1-CDG présentent des profils de la Bkn-CS normaux, car l'enzyme xylosyltransférase 1 (XYLT1) n'est pas exprimée dans les hépatocytes, contrairement à XYLT2 [116]. De plus, la bikunine portant une chaîne CS, son analyse ne permet théoriquement pas de dépister les anomalies spécifiques à la synthèse des GAG de types dermatane sulfate, héparane sulfate et kératane sulfate.

## ■ Rôle et importance de la génétique dans le diagnostic des CDG

Comme évoqué précédemment, les techniques biochimiques présentent deux principales limites dans le contexte du diagnostic des CDG : premièrement, elles ne permettent que rarement d'orienter vers un gène causal (des profils caractéristiques sont notamment retrouvés dans PGM1-CDG, B4GALT1-CDG, MGAT2-CDG et MAN1B1-CDG), et ne permettent pas d'identifier précisément une mutation. Deuxièmement, certains CDG « échappent » aux techniques actuelles de dépistage. Ainsi, la génétique peut jouer un rôle majeur de deuxième intention dans le diagnostic biologique des CDG. Des analyses biochimiques contributives, ainsi que l'histoire clinique et familiale, peuvent amener à cibler un gène (ou un panel de gènes) précis (par exemple, un profil de la Tf de type II associée à un *cutis laxa* amène à séquencer prioritairement *ATP6V0A2*). En cas de dépistage biochimique négatif, mais de suspicion clinique ou familiale forte, la découverte de variants pathogènes peut permettre d'affirmer le diagnostic [69].

À l'inverse, avec la croissance exponentielle des séquençages d'exome (WES), de génome entier (WGS) voire de transcriptomique (RNA-Seq), il arrive de plus en plus fréquemment (bientôt majoritairement ?) que des variants soient identifiés et conduisent à réaliser des analyses biochimiques dans l'objectif de valider fonctionnellement leur causalité. Notamment, elles seront indispensables pour confirmer la pathogénicité des VSI. Si les analyses de biomarqueurs circulants s'avèrent négatives, des modèles cellulaires, voire animaux, sont souvent requis pour pouvoir conclure (par ex. SLC35A2-CDG et mesure du transport de l'UDP-Gal dans un modèle cellulaire [69]).

## ■ Conclusion

Compte tenu de la diversité des acteurs moléculaires impliqués dans la glycosylation, les CDG constituent un vaste groupe de maladies héréditaires du métabolisme dont le nombre croît très rapidement avec l'avancée des techniques de diagnostic. En parallèle de l'identification continue de nouveaux CDG, de nombreux biomarqueurs et techniques analytiques ont été développés pour leur dépistage et leur diagnostic. Historiquement basée sur le profil des glycoformes de la transferrine, l'étude biochimique des CDG a évolué pour associer aujourd'hui un panel d'examens (utilisant notamment la spectrométrie de masse) offrant une grande sensibilité et permettant parfois d'orienter vers un gène causal. Avec l'émergence d'options thérapeutiques, le laboratoire spécialisé va sans aucun doute prendre une place centrale dans la prise en charge des patients. Ainsi, le biochimiste clinique doit être averti des intérêts et des limites de chaque biomarqueur et technique, pour pouvoir collaborer fructueusement avec les cliniciens et pouvoir les aider à mieux appréhender le monde de la glycosylation et des maladies associées.

**Déclaration de liens d'intérêts :** les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de liens d'intérêts en relation avec cet article.

## ■ Références

[1] Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017;**27**:3–49.

[2] Colley KJ, Varki A, Haltiwanger RS, Kinoshita T. Cellular organization of glycosylation. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., éd. *Essentials of glycobiology*. 4e éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Disponible sur : www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579926/.

[3] Brockhausen I, Wandall HH, Hagen KGT, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., éd. *Essentials of glycobiology*. 4e éd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Disponible sur : www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579921/.

[4] Rivinoja A, Hassinen A, Kokkonen N, Kauppila A, Kellokumpu S. Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J Cell Physiol* 2009;**220**:144–54.

[5] Ng BG, Freeze HH. Perspectives on glycosylation and its congenital disorders. *Trends Genet* 2018;**34**:466–76.

[6] Ondruskova N, Cechova A, Hansikova H, Honzik T, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: still "hot" in 2020. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2021;**1865**:129751.

[7] Raynor A, Haouari W, Lebredonchel E, Foulquier F, Fenaille F, Bruneel A. Biochemical diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Adv Clin Chem* 2024;**120**:1–43.

[8] Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999;**1473**:4–8.

[9] Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 2011;**1**:90, srep00090.

[10] Gil GC, Velander WH, Van Cott KE. N-glycosylation microheterogeneity and site occupancy of an Asn-X-Cys sequon in plasma-derived and recombinant protein C. *Proteomics* 2009;**9**:2555–67.

[11] Sanyal S, Frank CG, Menon AK. Distinct flippases translocate glycerophospholipids and oligosaccharide diphosphate dolichols across the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 2008;**47**:7937–46.

[12] Breitling J, Aebi M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**:a013359.

[13] Ellgaard L, Frickel EM. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* 2003;**39**:223–47.

[14] Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:181–91.

[15] Parodi AJ. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* 2000;**348**(**Pt. 1**):1–13.

[16] Hosokawa N, Tremblay LO, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J Biol Chem* 2003;**278**:26287–94.

[17] Stanley P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;**3**:a005199.

[18] Schachter H. Complex N-glycans: the story of the "yellow brick road". *Glycoconj J* 2014;**31**:1–5.

[19] Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 2009;**9**:882–913.

[20] Ten Hagen KG, Fritz TA, Tabak LA. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2003;**13**:1R-16R.

[21] Gill DJ, Clausen H, Bard F. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends Cell Biol* 2011;**21**: 149–58.

[22] Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C-III from human plasma very low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1978;**541**:234–40.

[23] Wopereis S, Abd Hamid UM, Critchley A, Royle L, Dwek RA, Morava E, et al. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1762**:598–607.

[24] Wopereis S, Grünewald S, Morava E, Penzien JM, Briones P, García-Silva MT, et al. Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis. *Clin Chem* 2003;**49**:1839–45.

[25] Casale J, Crane JS. Biochemistry, Glycosaminoglycans. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponible sur : www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544295/.

[26] Haouari W, Dubail J, Poüs C, Cormier-Daire V, Bruneel A. Inherited proteoglycan biosynthesis defects-current laboratory tools and bikunin as a promising blood biomarker. *Genes* 2021;**12**:1654.

[27] Lipiński P, Tylki-Szymańska A. Congenital disorders of glycosylation: what clinicians need to know? *Front Pediatr* 2021;**9**:715151.

[28] Pajusalu S, Vals MA, Mihkla L, Šamarina U, Kahre T, Õunap K. The estimated prevalence of N-linked congenital disorders of glycosylation across various populations based on allele frequencies in general population databases. *Front Genet* 2021;**12**:719437.

[29] Francisco R, Marques-da-Silva D, Brasil S, Pascoal C, Dos Reis Ferreira V, Morava E, et al. The challenge of CDG diagnosis. *Mol Genet Metab* 2019;**126**:1–5.

[30] Jaeken J, Schachter H, Carchon H, De Cock P, Coddeville B, Spik G. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type II: a deficiency in Golgi localised N-acetyl-glucosaminyltransferase II. *Arch Dis Child* 1994;**71**:123–7.

[31] Pedersen PS, Tygstrup I. Congenital hepatic fibrosis combined with protein-losing enteropathy and recurrent thrombosis. *Acta Paediatr Scand* 1980;**69**:571–4.

[32] Jaeken J, van Eijk HG, van der Heul C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 1984;**144**:245–7.

[33] Verheijen J, Tahata S, Kozicz T, Witters P, Morava E. Therapeutic approaches in congenital disorders of glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. *Genet Med* 2020;**22**:268–79.

[34] Durin Z, Raynor A, Fenaille F, Cholet S, Vuillaumier-Barrot S, Alili JM, et al. Efficacy of oral manganese and D-galactose therapy in a patient bearing a novel TMEM165 variant. *Transl Res J Lab Clin Med* 2023;**266**:57–67.

[35] Tomé FM, Matsumura K, Chevallay M, Campbell KP, Fardeau M. Expression of dystrophin-associated glycoproteins during human fetal muscle development: a preliminary immunocytochemical study. *Neuromuscul Disord* 1994;**4**:343–8.

[36] Mulkey SB, Ng BG, Vezina GL, Bulas DI, Wolfe LA, Freeze HH, et al. Arrest of fetal brain development in ALG11-congenital disorder of glycosylation. *Pediatr Neurol* 2019;**94**:64–9.

[37] Flanagan-Steet HR, Steet R. "Casting" light on the role of glycosylation during embryonic development: insights from zebrafish. *Glycoconj J* 2013;**30**:33–40.

[38] Schwartz NB, Domowicz M. Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J* 2004;**21**:329–41.

[39] Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993;**43**:283–93.

[40] Marklová E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 2007;**385**:6–20.

[41] Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG, et al. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J* 1999;**16**:669–71.

[42] Freeze HH, Jaeken J, Matthijs G. CDG or not CDG. *J Inherit Metab Dis* 2022;**45**:383–5.

[43] MacGillivray RT, Mendez E, Shewale JG, Sinha SK, Lineback-Zins J, Brew K. The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J Biol Chem* 1983;**258**:3543–53.

[44] Coddeville B, Carchon H, Jaeken J, Briand G, Spik G. Determination of glycan structures and molecular masses of the glycovariants of serum transferrin from a patient with carbohydrate deficient syndrome type II. *Glycoconj J* 1998;**15**:265–73.

[45] van Eijk HG, van Noort WL, Kroos MJ, van der Heul C. The heterogeneity of human serum transferrin and human transferrin preparations on isoelectric focusing gels; no functional difference of the fractions in vitro. *Clin Chim Acta* 1982;**121**:209–16.

[46] Kapur A, Wild G, Milford-Ward A, Triger DR. Carbohydrate deficient transferrin: a marker for alcohol abuse. *BMJ* 1989;**299**:427–31.

[47] van Eijk HG, van Noort WL, Dubelaar ML, van der Heul C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 1983;**132**:167–71.

[48] Ramaekers VT, Stibler H, Kint J, Jaeken J. A new variant of the carbohydrate deficient glycoproteins syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1991;**14**:385–8.

[49] Guillard M, Morava E, de Ruijter J, Roscioli T, Penzien J, van den Heuvel L, et al. B4GALT1-congenital disorders of glycosylation presents as a non-neurologic glycosylation disorder with hepatointestinal involvement. *J Pediatr* 2011;**159**:1041–3.e2.

[50] Altassan R, Radenkovic S, Edmondson AC, Barone R, Brasil S, Cechova A, et al. International consensus guidelines for phosphoglucomutase 1 deficiency (PGM1-CDG): diagnosis, follow-up, and management. *J Inherit Metab Dis* 2021;**44**:148–63.

[51] van Scherpenzeel M, Steenbergen G, Morava E, Wevers RA, Lefeber DJ. High-resolution mass spectrometry glycoprofiling of intact transferrin for diagnosis and subtype identification in the congenital disorders of glycosylation. *Transl Res J Lab Clin Med* 2015;**166**: 639–49.e1.

[52] Oda RP, Prasad R, Stout RL, Coffin D, Patton WP, Kraft DL, et al. Capillary electrophoresis-based separation of transferrin sialoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Electrophoresis* 1997;**18**:1819–26.

[53] Pérez-Cerdá C, Quelhas D, Vega AI, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem* 2008;**54**:93–100.

[54] Carchon HA, Chevigné R, Falmagne JB, Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clin Chem* 2004;**50**:101–11.

[55] Parente F, Ah Mew N, Jaeken J, Gilfix BM. A new capillary zone electrophoresis method for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDG). *Clin Chim Acta* 2010;**411**:64–6.

[56] Kingma HA, van der Sluijs FH, Heiner-Fokkema MR. Fast screening of N-glycosylation disorders by sialotransferrin profiling with capillary zone electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 2018;**55**:693–701.

[57] Kamboh MI, Ferrell RE. Human transferrin polymorphism. *Hum Hered* 1987;**37**:65–81.

[58] Guillard M, Wada Y, Hansikova H, Yuasa I, Vesela K, Ondruskova N, et al. Transferrin mutations at the glycosylation site complicate diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I. *J Inherit Metab Dis* 2011;**34**:901–6.

[59] Lebredonchel E, Raynor A, Bruneel A, Peoc'h K, Klein A. High CDT without clinical context: beware of the variant. *Clin Chim Acta* 2023;**544**:117333.

[60] Parker WC, Bearn AG. Studies on the transferrins of adult serum, cord serum, and cerebrospinal fluid. The effect of neuraminidase. *J Exp Med* 1962;**115**:83–105.

[61] Raynor A, Bruneel A, Vermeersch P, Cholet S, Friedrich S, Eckenweiler M, et al. "Hide and seek": misleading transferrin variants in PMM2-CDG complicate diagnostics. *Proteomics Clin Appl* 2023:e2300040.

[62] Stewart SH, Comte-Walters S, Bowen E, Anton RF. Liver disease and HPLC quantification of disialotransferrin for heavy alcohol use: a case series. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;**34**:1956–60.

[63] Veronesi A, Cariani E, Trenti T, Rota C. Carbohydrate-deficient transferrin: utility of HPLC in handling atypical samples uninterpretable by capillary electrophoresis. *Alcohol Alcohol* 2019;**54**:510–5.

[64] Lefeber DJ, Morava E, Jaeken J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2011;**34**:849–52.

[65] Raynor A, Vincent-Delorme C, Alaix AS, Cholet S, Dupré T, Vuillaumier-Barrot S, et al. Normal transferrin patterns in congenital disorders of glycosylation with Golgi homeostasis disruption: apolipoprotein C-III at the rescue ! *Clin Chim Acta* 2021;**519**:285–90.

[66] Shimada S, Ng BG, White AL, Nickander KK, Turgeon C, Liedtke KL, et al. Clinical, biochemical and genetic characteristics of MOGS-CDG: a rare congenital disorder of glycosylation. *J Med Genet* 2022, jmedgenet-2021-108177.

[67] van Karnebeek CDM, Bonafé L, Wen XY, Tarailo-Graovac M, Balzano S, Royer-Bertrand B, et al. NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nat Genet* 2016;**48**:777–84.

[68] Gadomski TE, Bolton M, Alfadhel M, Dvorak C, Ogunsakin OA, Nelson SL, et al. ALG13-CDG in a male with seizures, normal cognitive development, and normal transferrin isoelectric focusing. *Am J Med Genet A* 2017;**173**:2772–5.

[69] Ng BG, Sosicka P, Agadi S, Almannai M, Bacino CA, Barone R, et al. SLC35A2-CDG: functional characterization, expanded molecular, clinical, and biochemical phenotypes of 30 unreported individuals. *Hum Mutat* 2019;**40**:908–25.

[70] Willems AP, van Engelen BGM, Lefeber DJ. Genetic defects in the hexosamine and sialic acid biosynthesis pathway. *Biochim Biophys Acta* 2016;**1860**:1640–54.

[71] Casado M, O'Callaghan MM, Montero R, Pérez-Cerda C, Pérez B, Briones P, et al. Mild clinical and biochemical phenotype in two patients with PMM2-CDG (congenital disorder of glycosylation Ia). *Cerebellum Lond Engl* 2012;**11**:557–63.

[72] Witters P, Honzik T, Bauchart E, Altassan R, Pascreau T, Bruneel A, et al. Long-term follow-up in PMM2-CDG: are we ready to start treatment trials? *Genet Med* 2019;**21**:1181–8.

[73] Taday R, Park JH, Grüneberg M, DuChesne I, Reunert J, Marquardt T. Mannose supplementation in PMM2-CDG. *Orphanet J Rare Dis* 2021;**16**:359.

[74] Witters P, Edmondson AC, Lam C, Johnsen C, Patterson MC, Raymond KM, et al. Spontaneous improvement of carbohydrate-deficient transferrin in PMM2-CDG without mannose observed in CDG natural history study. *Orphanet J Rare Dis* 2021;**16**:102.

[75] Abu Bakar N, Lefeber DJ, van Scherpenzeel M. Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Inherit Metab Dis* 2018;**41**:499–513.

[76] Jansen JC, van Hoek B, Metselaar HJ, van den Berg AP, Zijlstra F, Huijben K, et al. Screening for abnormal glycosylation in a cohort of adult liver disease patients. *J Inherit Metab Dis* 2020;**43**:1310–20.

[77] Poskanzer SA, Schultz MJ, Turgeon CT, Vidal-Folch N, Liedtke K, Oglesbee D, et al. Immune dysfunction in MGAT2-CDG: a clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2021;**185**:213–8.

[78] Wada Y, Kadoya M, Okamoto N. Mass spectrometry of transferrin and apolipoprotein CIII from dried blood spots for congenital disorders of glycosylation. *Mass Spectrom Tokyo Jpn* 2022;**11**:A0113.

[79] Zühlsdorf A, Park JH, Wada Y, Rust S, Reunert J, DuChesne I, et al. Transferrin variants: pitfalls in the diagnostics of congenital disorders of glycosylation. *Clin Biochem* 2015;**48**:11–3.

[80] Sadat MA, Moir S, Chun TW, Lusso P, Kaplan G, Wolfe L, et al. Glycosylation, hypogammaglobulinemia, and resistance to viral infections. *N Engl J Med* 2014;**370**:1615–25.

[81] Messina A, Palmigiano A, Esposito F, Fiumara A, Bordugo A, Barone R, et al. HILIC-UPLC-MS for high throughput and isomeric N-glycan separation and characterization in congenital disorders glycosylation and human diseases. *Glycoconj J* 2021;**38**:201–11.

[82] Post MA, de Wit I, Zijlstra FSM, Engelke UFH, van Rooij A, Christodoulou J, et al. MOGS-CDG: quantitative analysis of the diagnostic Glc3 Man tetrasaccharide and clinical spectrum of six new cases. *J Inherit Metab Dis* 2023;**46**:313–25.

[83] Hipgrave Ederveen AL, de Haan N, Baerenfaenger M, Lefeber DJ, Wuhrer M. Dissecting total plasma and protein-specific glycosylation profiles in congenital disorders of glycosylation. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:7635.

[84] Xia B, Zhang W, Li X, Jiang R, Harper T, Liu R, et al. Serum N-glycan and O-glycan analysis by mass spectrometry for diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Anal Biochem* 2013;**442**:178–85.

[85] Saldova R, Stöckmann H, O'Flaherty R, Lefeber DJ, Jaeken J, Rudd PM. N-glycosylation of serum IgG and total glycoproteins in MAN1B1 deficiency. *J Proteome Res* 2015;**14**:4402–12.

[86] Bruneel A, Cholet S, Drouin-Garraud V, Jacquemont ML, Cano A, Mégarbané A, et al. Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation. *Electrophoresis* 2018;**39**:3123–32.

[87] Park JH, Mealer RG, Elias AF, Hoffmann S, Grüneberg M, Biskup S, et al. N-glycome analysis detects dysglycosylation missed by conventional methods in SLC39A8 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2020;**43**:1370–81.

[88] Beimdiek J, Hennig R, Burock R, Puk O, Biskup S, Rapp E, et al. Serum N-glycomics of a novel CDG-IIb patient reveals aberrant IgG glycosylation. *Glycobiology* 2022;**32**:380–90.

[89] Ashikov A, Abu Bakar N, Wen XY, Niemeijer M, Rodrigues Pinto Osorio G, Brand-Arzamendi K, et al. Integrating glycomics and genomics uncovers SLC10A7 as essential factor for bone mineralization by regulating post-Golgi protein transport and glycosylation. *Hum Mol Genet* 2018;**27**:3029–45.

[90] Chen J, Li X, Edmondson A, Meyers GD, Izumi K, Ackermann AM, et al. Increased clinical sensitivity and specificity of plasma protein N-glycan profiling for diagnosing congenital disorders of glycosylation by use of flow injection-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 2019;**65**:653–63.

[91] Alharbi H, Daniel EJP, Thies J, Chang I, Goldner DL, Ng BG, et al. Fractionated plasma N-glycan profiling of novel cohort of ATP6AP1-CDG subjects identifies phenotypic association. *J Inherit Metab Dis* 2023;**46**:300–12.

[92] Sturiale L, Nassogne MC, Palmigiano A, Messina A, Speciale I, Artuso R, et al. Aberrant sialylation in a patient with a HNF1α variant and liver adenomatosis. *iScience* 2021;**24**:102323.

[93] Bruneel A, Cholet S, Tran NT, Mai TD, Fenaille F. CDG biochemical screening: Where do we stand? *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2020;**1864**:129652.

[94] Zhang W, James PM, Ng BG, Li X, Xia B, Rong J, et al. A novel N-Tetrasaccharide in patients with congenital disorders of glycosylation, including asparagine-linked glycosylation protein 1, phosphomannomutase 2, and mannose phosphate isomerase deficiencies. *Clin Chem* 2016;**62**:208–17.

[95] Abu Bakar N, Ashikov A, Brum JM, Smeets R, Kersten M, Huijben K, et al. Synergistic use of glycomics and single-molecule molecular inversion probes for identification of congenital disorders of glycosylation type-1. *J Inherit Metab Dis* 2022;**45**:769–81.

[96] Sakhi S, Cholet S, Wehbi S, Isidor B, Cogne B, Vuillaumier-Barrot S, et al. MAN1B1-CDG: three new individuals and associated biochemical profiles. *Mol Genet Metab Rep* 2021;**28**:100775.

[97] Duvet S, Mouajjah D, Péanne R, Matthijs G, Raymond K, Jaeken J, et al. Use of edoglycosidase H as a diagnostic tool for MAN1B1-CDG patients. *Electrophoresis* 2018;**39**:3133–41.

[98] Raynor A, Haouari W, Ng BG, Cholet S, Harroche A, Raulet-Bussian C, et al. SLC37A4-CDG: new biochemical insights for an emerging congenital disorder of glycosylation with major coagulopathy. *Clin Chim Acta* 2021;**521**:104–6.

[99] Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, Catapano AL. Apolipoprotein C-III: from pathophysiology to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2015;**36**:675–87.

[100] Harvey SB, Zhang Y, Wilson-Grady J, Monkkonen T, Nelsestuen GL, Kasthuri RS, et al. O-glycoside biomarker of apolipoprotein C3: responsiveness to obesity, bariatric surgery, and therapy with metformin, to chronic or severe liver disease and to mortality in severe sepsis and graft vs host disease. *J Proteome Res* 2009;**8**:603–12.

[101] Maeda H, Hashimoto RK, Ogura T, Hiraga S, Uzawa H. Molecular cloning of a human apoC-III variant: Thr 74—-Ala 74 mutation prevents O-glycosylation. *J Lipid Res* 1987;**28**:1405–9.
[102] Ruel C, Morani M, Bruneel A, Junot C, Taverna M, Fenaille F, et al. A capillary zone electrophoresis method for detection of Apolipoprotein C-III glycoforms and other related artifactually modified species. *J Chromatogr A* 2018;**1532**:238–45.
[103] Wada Y, Kadoya M, Okamoto N. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology* 2012;**22**:1140–4.
[104] Yen-Nicolaÿ S, Boursier C, Rio M, Lefeber DJ, Pilon A, Seta N, et al. MALDI-TOF MS applied to apoC-III glycoforms of patients with congenital disorders affecting O-glycosylation. Comparison with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics Clin Appl* 2015;**9**: 787–93.
[105] Bruneel A, Robert T, Lefeber DJ, Benard G, Loncle E, Djedour A, et al. Two-dimensional gel electrophoresis of apolipoprotein C-III and other serum glycoproteins for the combined screening of human congenital disorders of O- and N-glycosylation. *Proteomics Clin Appl* 2007;**1**:321–4.
[106] Ferrer A, Starosta RT, Ranatunga W, Ungar D, Kozicz T, Klee E, et al. Fetal glycosylation defect due to ALG3 and COG5 variants detected via amniocentesis: complex glycosylation defect with embryonic lethal phenotype. *Mol Genet Metab* 2020;**131**:424–9.
[107] He P, Ng BG, Losfeld ME, Zhu W, Freeze HH. Identification of intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1) as a hypoglycosylation marker in congenital disorders of glycosylation cells. *J Biol Chem* 2012;**287**:18210–7.
[108] Lebredonchel E, Houdou M, Potelle S, de Bettignies G, Schulz C, Krzewinski Recchi MA, et al. Dissection of TMEM165 function in Golgi glycosylation and its Mn2+ sensitivity. *Biochimie* 2019;**165**:123–30.
[109] Houdou M, Lebredonchel E, Garat A, Duvet S, Legrand D, Decool V, et al. Involvement of thapsigargin- and cyclopiazonic acid-sensitive pumps in the rescue of TMEM165-associated glycosylation defects by Mn2. *FASEB J* 2019;**33**:2669–79.
[110] Blackburn JB, Kudlyk T, Pokrovskaya I, Lupashin VV. More than just sugars: conserved oligomeric Golgi complex deficiency causes glycosylation-independent cellular defects. *Traffic Cph Den* 2018;**19**: 463–80.
[111] Durin Z, Houdou M, Morelle W, Barré L, Layotte A, Legrand D, et al. Differential effects of D-galactose supplementation on golgi glycosylation defects in TMEM165 deficiency. *Front Cell Dev Biol* 2022;**10**:903953.
[112] Stevens E, Carss KJ, Cirak S, Foley AR, Torelli S, Willer T, et al. Mutations in B3GALNT2 cause congenital muscular dystrophy and hypoglycosylation of α-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2013;**92**: 354–65.
[113] Messina S, Mora M, Pegoraro E, Pini A, Mongini T, D'Amico A, et al. POMT1 and POMT2 mutations in CMD patients: a multicentric Italian study. *Neuromuscul Disord* 2008;**18**:565–71.
[114] Ligezka AN, Radenkovic S, Saraswat M, Garapati K, Ranatunga W, Krzysciak W, et al. Sorbitol is a severity biomarker for PMM2-CDG with therapeutic implications. *Ann Neurol* 2021;**90**:887–900.
[115] Haouari W, Dubail J, Lounis-Ouaras S, Prada P, Bennani R, Roseau C, et al. Serum bikunin isoforms in congenital disorders of glycosylation and linkeropathies. *J Inherit Metab Dis* 2020;**43**:1349–59.
[116] Bruneel A, Dubail J, Roseau C, Prada P, Haouari W, Huber C, et al. Serum bikunin is a biomarker of linkeropathies. *Clin Chim Acta* 2018;**485**:178–80.
[117] Guasto A, Dubail J, Aguilera-Albesa S, Paganini C, Vanhulle C, Haouari W, et al. Biallelic variants in SLC35B2 cause a novel chondrodysplasia with hypomyelinating leukodystrophy. *Brain J Neurol* 2022;**145**:3711–22.

A. Raynor.
Service de biochimie métabolique et cellulaire, Hôpital Bichat, AP–HP, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.

F. Fenaille.
Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département médicaments et technologies pour la santé (DMTS), MetaboHUB, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

E. Lebredonchel.
Service de biochimie métabolique et cellulaire, Hôpital Bichat, AP–HP, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.

F. Foulquier.
Université de Lille, CNRS, UMR 8576 – Unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle (UGSF), 59000 Lille, France.

A. Bruneel (arnaud.bruneel@aphp.fr).
Service de biochimie métabolique et cellulaire, Hôpital Bichat, AP–HP, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.
Inserm UMR 1193, bâtiment Henri-Moissan (HM1), Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay, 17, avenue des Sciences, 91400 Orsay, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Raynor A, Fenaille F, Lebredonchel E, Foulquier F, Bruneel A. Diagnostic biochimique des désordres congénitaux de la glycosylation. EMC - Biologie médicale 2025;0(0):1-16 [Article 90-10-0270-B].