



Etude de l'hémostase et de l'endothélium dans les déficits héréditaires de la glycosylation des protéines (CDG)

Tiffany Pascreau

► To cite this version:

Tiffany Pascreau. Etude de l'hémostase et de l'endothélium dans les déficits héréditaires de la glycosylation des protéines (CDG). Endocrinologie et métabolisme. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS602 . tel-03091990

HAL Id: tel-03091990

<https://theses.hal.science/tel-03091990>

Submitted on 1 Jan 2021

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.

Etude de l'hémostase et de l'endothélium dans les déficits héréditaires de la glycosylation des protéines (CDG)

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'université Paris-Sud

Unité UMR_S INSERM 1176,
Hémostase Inflammation et Thrombose (HITH)

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: physiologie physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Kremlin-Bicêtre, le 20 décembre 2019, par

Tiffany PASCREAU

Composition du Jury :

Pascale De Lonlay PU-PH, Hôpital Necker-Enfants Malades AHP (Institut Necker-Enfants Malades (INEM) UMR 1151)	Président
Véronique Régnault Directrice de recherche, Nancy Université (UMR_S 1116)	Rapporteur
François Foulquier Directeur de recherche, Université de Lille 1 (UMR 8576)	Rapporteur
Marc Vasse PU-PH, Université Paris-Saclay (UMR_S 1176)	Examineur
Delphine Borgel PU-PH, Université Paris-Saclay (UMR_S 1176)	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Madame Le Professeur Delphine Borgel, pour m'avoir encadrée tout au long de ces trois années de thèse.

Je lui suis reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, sa grande disponibilité, ses qualités pédagogiques et scientifiques, son soutien et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés, de mon stage d'internat à l'élaboration de cette thèse, et je l'en remercie infiniment.

Ils m'ont fait l'honneur de leur présence à mon jury de thèse. Je les remercie chaleureusement : Madame le Professeur Pascale de Lonlay que je tiens à assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail. Je la remercie de m'avoir permis de mettre un pied dans le monde passionnant du CDG. Monsieur le Professeur Marc Vasse qui m'a récemment accueillie dans son service où nous travaillerons sur de nouvelles thématiques tout aussi passionnantes.

Un grand merci aux rapporteurs de cette thèse, Madame le Docteur Véronique Regnault et Monsieur le Docteur François Foulquier, d'avoir accepté d'évaluer et examiner mon travail en un temps record et de braver les grèves pour être présents à la soutenance.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide des membres de l'unité U1176 dirigée par le Docteur Cécile Denis. Je souhaite en particulier remercier les chercheurs François Saller, Elsa Bianchini, Frédéric Adam, Régis Bobe, Alexandre Kauskot, Marijke Bryckaert, Peter Lenting, Jean-Philippe Rosa, Olivier Christophe, Caterina Casari ; les techniciens Christelle Reperant, Alan de Carvalho, et les anciens membres de l'unité Paulette Legendre (assistante ingénieure) et Vincent Muczynski (Post-doctorant) qui ont à un moment ou un autre été confrontés à une de mes interrogations et ont su m'apporter toute l'aide nécessaire à l'avancée de mon travail. Je remercie également les étudiants : Mahita, Miao, Kathia, Stephen et Josepha pour leur soutien et les moments de détente que nous nous sommes octroyés.

J'adresse ensuite mes sincères remerciements à l'équipe du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Necker, en particulier au Docteur Dominique Lasne et aux techniciennes Peggy, Daphnée, Catherine, Aurore et Laurianne qui ont, toujours dans la bonne humeur, largement participé à la collecte des échantillons et à la réalisation des examens d'hémostase.

J'exprime également ma gratitude au laboratoire de biochimie de l'hôpital Bichat, en particulier au Professeur Nathalie Seta, au Docteur Arnaud Bruneel et au Docteur Thierry Dupré qui ont participé au diagnostic des patients.

Une pensée particulière à Teddy, AHU en biochimie, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant quatre années mais également de nombreuses discussions scientifiques.

Enfin, je remercie ma famille, mes amis, et Laurent pour leur soutien sans faille depuis tant d'années.

Résumé

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer le rôle des N-glycosylations sur l'hémostase, à la fois sur les protéines de la coagulation et sur l'endothélium vasculaire. L'hémostase est un processus physiologique qui s'articule en deux phases : (i) l'hémostase primaire et (ii) la coagulation. L'ensemble des acteurs de ce processus sont des glycoprotéines, dont les chaînes glycaniques peuvent être impliquées dans différentes fonctions de ces protéines. Le rôle des chaînes glycaniques des protéines de l'hémostase a été principalement étudié à l'aide des méthodes de déglycosylation enzymatique et de mutagenèse dirigée. Afin d'étudier le rôle des chaînes glycaniques sur l'hémostase dans un système global, nous nous sommes intéressés aux déficits héréditaires de glycosylation (CDG). Les patients atteints de ce syndrome présentent fréquemment des anomalies de l'hémostase principalement caractérisées par des déficits en facteurs de la coagulation comme le facteur XI (FXI) (plus rarement le facteur IX) et en inhibiteurs physiologiques comme l'antithrombine (AT), la protéine C (PC) et la protéine S (PS). Ces anomalies de l'hémostase s'accompagnent de complications neurologiques aiguës appelées stroke-like (SL) dont le mécanisme physiopathologique n'est pas complètement élucidé, ainsi que des complications vasculaires, le plus souvent thrombotique mais aussi parfois hémorragique. Afin d'évaluer de façon globale l'impact de l'ensemble des anomalies rencontrées chez les patients sur la coagulation nous avons choisi d'utiliser le test de génération de thrombine (TGT) en absence et en présence de thrombomoduline soluble (TMs) de manière à mobiliser le système de la PC. Ainsi nous avons déterminé la fréquence des déficits sur une série de 35 patients atteints de CDG dont la majorité est atteinte de PMM2-CDG. Les déficits en AT et FXI sont les plus fréquents (71% et 57% des patients respectivement), suivi des déficits en PC et PS (29% et 26% respectivement). Seulement 11% des patients présentent un déficit en FIX. En l'absence de TMs, le TGT révèle un profil hypercoagulant. Après addition de TMs on observe une résistance à la mobilisation du système de la PC, ce qui renforce l'hypercoagulabilité observé sans TMs. Ce profil hypercoagulant est retrouvé chez tous les patients avec un antécédent de SL ou de thrombose. L'endothélium est une interface dynamique entre le sang et les vaisseaux et joue un rôle capital dans le contrôle de l'hémostase et de l'homéostasie des tissus en formant une barrière entre la circulation sanguine et les tissus. Afin d'étudier les propriétés de

l'endothélium affecté par un défaut de glycosylation, nous avons développé un modèle cellulaire inactivé pour PMM2 à partir d'une lignée endothéliale issue de la microcirculation cérébrale hCMEC/D3. L'endothélium est doté de propriétés anticoagulantes en exprimant entre autres les récepteurs impliqués dans l'activation de la PC, la TM et l'*endothelial protein C receptor* (EPCR). Nous avons montré que les cellules inactivées pour PMM2 présentent un défaut d'activation de la PC dû à une diminution des transcrits des gènes codant pour la TM (THBD) et l'EPCR (PROCR) et donc une diminution de l'expression de la TM et de l'EPCR concourant à une perte du potentiel anticoagulant de l'endothélium. Par ailleurs nous avons mis en évidence une hyperperméabilité de la barrière endothéliale à l'état basal en partie expliquée par la perte d'intégrité des jonctions adhérentes formées par la VE-cadherine. De plus, nous avons montré que la barrière formée par les cellules inactivées pour PMM2 est plus sensible à un stimulus déstabilisateur comme la thrombine. En revanche les effets cytoprotecteurs de la protéine C activée (PCA) sont conservés puisque la PCA induit une récupération de l'intégrité de barrière significativement plus rapide sur les cellules inactivées comparé aux cellules contrôles. La dysfonction endothéliale ainsi mise en évidence pourrait jouer un rôle dans le développement de l'hyperperméabilité rencontrée dans les épisodes de SL. De plus, malgré l'absence de mise en évidence de thrombus au cours des SL, l'hypothèse de la formation de micro-thrombi et d'ischémie transitoire favorisés par les anomalies de la coagulation observées chez les patients atteints de CDG ne peut être exclue.

Table des matières

RESUME.....	1
TABLE DES MATIERES.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLES.....	6
PARTIE I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1. Biosynthèse des glycoprotéines	7
1.1 Principes généraux	7
1.2 Rôles des chaînes glycaniques dans le développement.....	10
1.2.1 Rôle des N-glycannes.....	10
1.2.2 Rôle des O-glycannes de type mucine	11
1.2.3 Rôle des glycosphingolipides	12
2. Les défauts de glycosylation : congenital disorder of glycosylation (CDG) syndrome.....	13
2.1 Définition et classification	13
2.2 Épidémiologie	16
2.3 Diagnostic	17
2.3.1 Dépistage.....	17
2.3.2 Confirmation	19
2.3.3 Génétique	23
2.4 Phénotype des CDG	25
2.4.1 Phénotype général des CDG.....	25
2.4.2 Phénotype du PMM2-CDG	26
3. Anomalies de l'hémostase chez les patients atteints de CDG.....	29
3.1 Rappels sur la physiologie de l'hémostase.....	29
3.1.1 L'hémostase primaire.....	29
3.1.2 La coagulation.....	31
a) La cascade de la coagulation	31
b) La régulation de la coagulation.....	33
3.2 Le rôle des glycosylations dans l'hémostase primaire	34
3.2.1 Le rôle des glycosylations sur le facteur von Willebrand	35
3.2.2 Le rôle des glycosylations sur les glycoprotéines plaquettaires	38
3.2.3 Les anomalies de l'hémostase primaire rencontrées dans les CDG	40
3.3 Le rôle des glycosylations dans la coagulation	41
3.3.1 Le rôle des glycosylations sur les protéines de la coagulation.....	41
a) Le rôle des glycosylations sur les facteurs procoagulants.....	43
b) Le rôle des glycosylations sur les inhibiteurs de la coagulation.....	48
3.3.2 Les anomalies de la coagulation rencontrées dans les CDG	49
3.3.3 Conséquences cliniques de la coagulopathie observée dans les CDG.....	51
4. Étude du profil global de coagulation en test de génération de thrombine	52
4.1 Exploration usuelle des coagulopathies au laboratoire	52
4.2 Principe de la thrombinographie (ou test de génération de thrombine)	53
4.3 Les applications du test de génération de thrombine	54
OBJECTIF I	57
ARTICLE I : ÉTUDE DU PROFIL DE COAGULATION DES PATIENTS ATTEINTS DE CDG PAR THROMBINOGRAPHIE	59
PARTIE II - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	73
1. Le système de la protéine C.....	73
1.1 La protéine C.....	73
1.2 Les récepteurs du système de la protéine C.....	74
1.3 L'activation de la protéine C.....	77
2. Les effets anticoagulant et cellulaires de la protéine C activée.....	78
2.1 L'activité anticoagulante de la protéine C activée	78
2.2 Les effets cellulaires de la protéine C activée	79
2.2.1 Les effets anti inflammatoires de la protéine C activée	79
2.2.2 Les effets anti-apoptotiques de la protéine C activée	79
2.2.3 Les effets stabilisateurs de barrière	80

a) <i>Rappels sur la physiologie des jonctions inter-cellulaires et la signalisation induite par des stimuli stabilisateur ou perturbateur.....</i>	80
b) <i>Les effets stabilisateurs de barrière de la protéine C activée.....</i>	82
c) <i>Le rôle des PAR's sur la stabilisation de la perméabilité endothéliale</i>	83
3. Le rôle des glycosylations sur le système de la protéine C.....	85
3.1 Les rôle des glycosylations sur les récepteurs du système de la protéine C.....	85
3.2 Le rôle des glycosylations sur les effets cellulaires de la protéine C activée	86
4. Évaluation thérapeutique de la protéine C activée.....	86
OBJECTIFS II.....	89
ARTICLE II : ÉTUDE DE L'ENDOTHELIUM ET DU SYSTEME DE LA PROTEINE C A L'AIDE D'UN MODELE DE CELLULES ENDOTHELIALES CÉREBRALES INACTIVÉES POUR LA PHOSPHOMANNOMUTASE (PMM2)	91
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	115
ANNEXES.....	125
Annexe I : Classification des CDG par localisation cellulaire : état des lieux en 2017	125
Annexe II: Revue "International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up"	135
Annexe III: Article "A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation"	161
Annexe IV: Article "Long-term follow-up in PMM2-CDG: are we ready to start treatment trials?"	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	179

Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
AT	Antithrombine
CDG	Congenital disorder of glycosylation
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
GPIb-V-IX	Glycoprotéine Ib-V-IX
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$
GPVI	Glycoprotéine VI
IEF	Isoélectrofocalisation
LLO	Lipid Linked Oligosaccharide
MPI	Mannose Phosphate Isomerase
PAR	Protease activated Receptor
PLs	Phospholipides
PC	Protéine C
PS	Protéine S
PCA	Protéine C Activée
PMM2	Phosphomannomutase 2
RE	Reticulum Endoplasmique
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SL	Stroke-like
TCA	Temps de Céphaline + Activateur
TEER	Transendothelial Electrical Resistance
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGT	Test de Génération de Thrombine
TQ	Temps de Quick
TM	Thrombomoduline
TMs	Thrombomoduline soluble
vWF	von Willebrand factor

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des liaisons N- et O-glycosidiques	7
Figure 2 : Biosynthèse des N-glycosylations	9
Figure 3 : Synthèse de l'oligosaccharide lié au dolichol-phosphate dans le cytosol et le reticulum endoplasmique	14
Figure 4 : Maturation des chaînes glycaniques dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi	15
Figure 5 : Distribution des CDG de type I (A) et de type II (B) diagnostiqués en Europe	17
Figure 6 : Représentation schématique des isoformes de la transferrine à l'isoélectrofocalisation (IEF)	18
Figure 7 : Analyse en électrophorèse SDS-page et western blot de différentes protéines circulantes	20
Figure 8 : Électrophorèse bidimensionnelle de N-glycoprotéines du sérum d'un sujet sain	21
Figure 9 : Dépistage des anomalies de O-glycosylation de l'APOC3	22
Figure 10: Proposition d'arbre diagnostique des CDG	24
Figure 11 : Panel de gènes séquencés en Next Generation Sequencing (NGS) selon le profil biochimique de CDG observé	24
Figure 12 : Caractéristiques morphologiques des enfants atteints de PMM2-CDG	27
Figure 13 : Adhésion plaquettaire au sous-endothélium	30
Figure 14 : Représentation schématique de la cascade de la coagulation	32
Figure 15 : Structure du facteur Willebrand mature et ses glycosylations	36
Figure 16 : Représentation schématique du complexe d'adhésion plaquettaire GPIb-V-IX	39
Figure 17 : Exploration de la voie du facteur tissulaire et de la voie contact de la coagulation.	53
Figure 18 : La génération de thrombine en 3 phases et les principaux paramètres analysés	54
Figure 19 : Structure de la protéine C	74
Figure 20 : Glycoformes de la protéine C humaine en western blot	74
Figure 21 : Structure de la thrombomoduline et domaines d'interaction avec ses ligands	75
Figure 22 : Les acteurs et les différentes fonctions du système de la protéine C	77
Figure 23 : Signalisation des molécules pro-inflammatoire à l'origine d'une augmentation de la perméabilité vasculaire	82
Figure 24 : Effets cytoprotecteurs de la protéine C activée sur la barrière endothéliale	83
Figure 25 : Localisation de PAR-1 à la membrane	84

Liste des tables

Tableau 1 : Modifications post traductionnelles des facteurs de la coagulation	42
Tableau 2 : Implication des glycosylations dans les fonctions des protéines de la coagulation	45
Tableau 3 : Profil de coagulation atypique rencontré dans le PMM2-CDG	50

Partie I - Introduction bibliographique

1. Biosynthèse des glycoprotéines

1.1 Principes généraux

La glycosylation est le principal processus de modification post traductionnelle ubiquitaire que l'on rencontre chez les Eucaryotes mais aussi chez certaines bactéries^{1,2}. La glycosylation consiste en l'attachement de chaînes glycaniques aux protéines grâce à des liaisons N-glycosidiques ou O-glycosidiques.

La N-glycosylation permet l'attachement d'une chaîne glycanique par l'intermédiaire d'un résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) à l'azote du groupement amide d'une asparagine. La O-glycosylation de type mucine est la plus fréquente et relie la chaîne glycanique au groupement hydroxyle d'une serine ou d'une thréonine par l'intermédiaire d'un résidu N-acétylgalactosamine (GalNAc) (**Figure 1**). Il existe d'autres types de O-glycosylation qui relient la chaîne glycanique par l'intermédiaire d'un résidu GlcNAc (O-GlcNAcylation), d'un fucose (O-fucosylation), d'un mannose (O-mannosylation), d'un glucose (O-glucosylation) ou encore d'un galactose (O-galactosylaion).

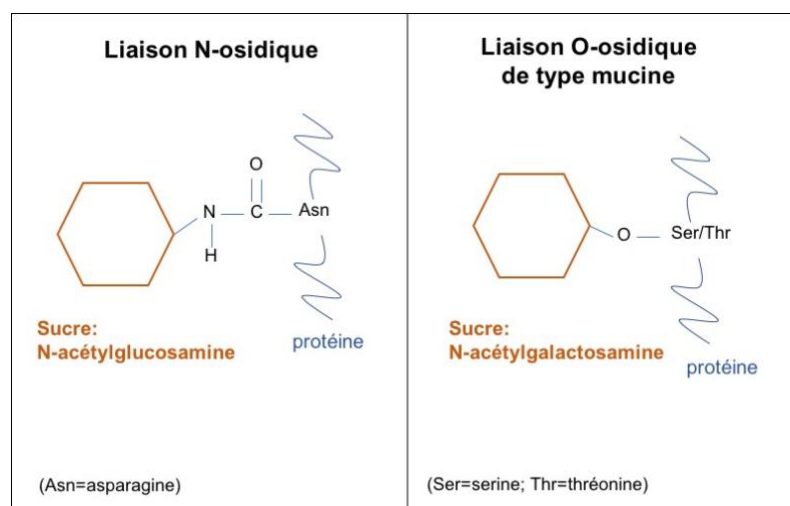


Figure 1 : Représentation schématique des liaisons N- et O-glycosidiques

La N-glycosylation se déroule en trois étapes : (i) la formation des glycannes précurseurs, (ii) l'assemblage et (iii) la maturation. Les deux premières étapes ont lieu dans le cytosol et le réticulum endoplasmique (RE), tandis que la maturation est assurée dans l'appareil de Golgi (**Figure 2**). Les monosaccharides sont d'abord activés en sucre-nucléotides (UDP-ose et GDP-ose) dans le cytosol avant d'être transférés sur un intermédiaire membranaire, le dolichol-phosphate (dol-P). Ainsi 2 résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc) et 5 mannose (Man) sont ajoutés au dol-P. L'intermédiaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dolichol}$ est ensuite basculé du cytosol vers la lumière du RE. Les ajouts ultérieurs de mannose et glucose (Glc) sous l'action d'une succession de glycosyltransférases aboutissent à la formation d'un précurseur glycanne constitué de 14 oses : $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. L'attachement de ce précurseur au dol-P constitue le lipid-linked oligosaccharide (LLO). L'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est ensuite transféré sur l'asparagine d'une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr d'un polypeptidique en cours de biosynthèse grâce à l'oligosaccharyl transférase (OST). La maturation dans l'appareil de Golgi permet ensuite de générer une grande diversité de chaînes glycanne pour chaque type de glycoprotéine par une succession d'étapes de clivage et d'addition d'oses assurée par des glycosylhydrolases et glycosyltransférases.

A la différence de la N-glycosylation, la O-glycosylation ne nécessite pas la formation d'un précurseur glycanne puisque les sucres sont ajoutés directement sur les acides aminés, les uns après les autres, sous forme de sucre-nucléotides. Selon le type de O-glycosylation, la modification peut avoir lieu dans le cytosol, le RE ou le golgi.

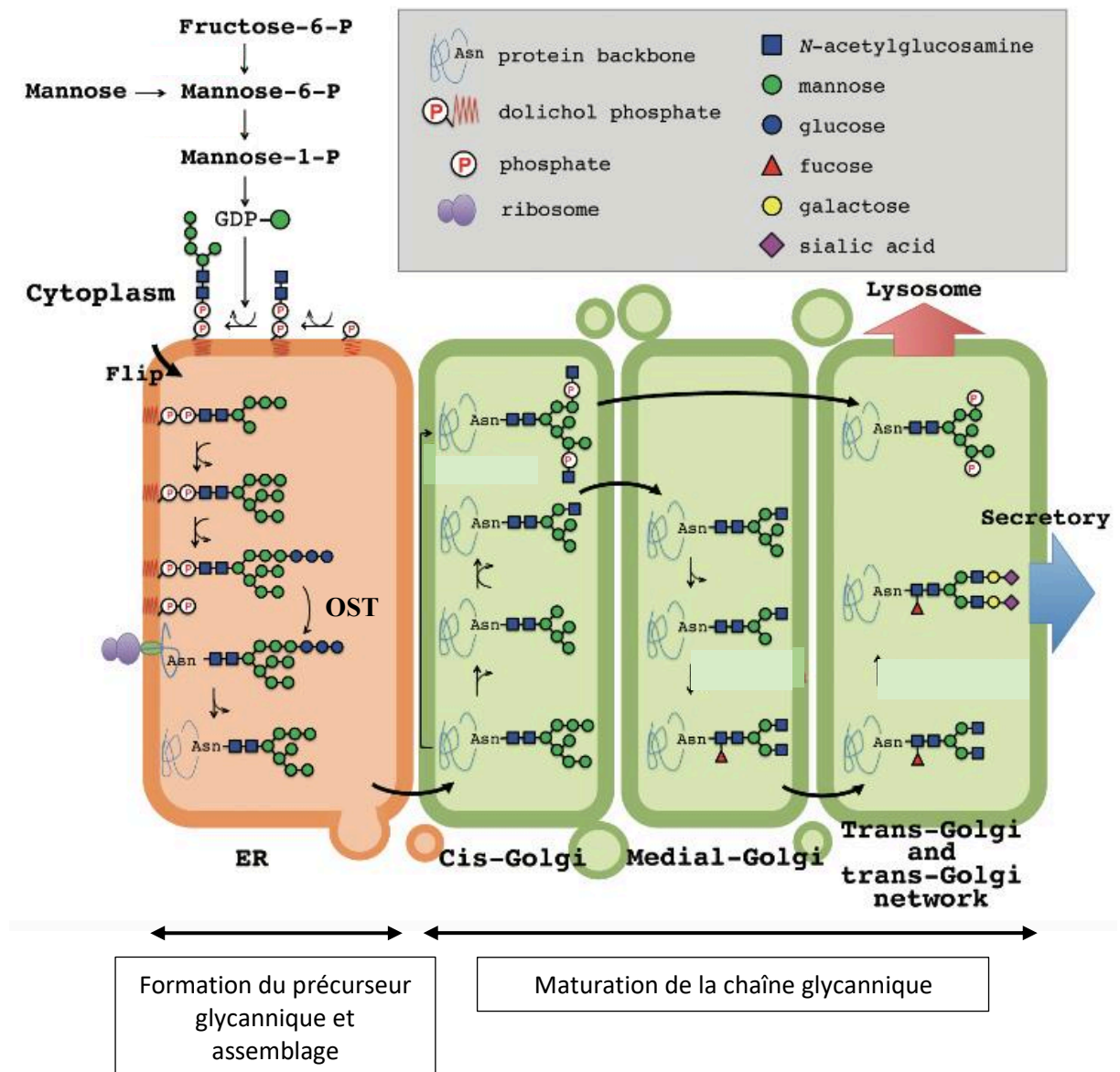


Figure 2 : Biosynthèse des N-glycosylations

Le précurseur glycanique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est formé dans le cytosol puis le réticulum endoplasmique où il sera greffé à l'asparagine de la protéine en cours de synthèse. Le processus de maturation aura lieu ensuite dans l'appareil de Golgi au cours duquel l'ajout de fucose, galactose ou d'acide sialique permettra de générer une grande variété de structures glycaniques.

ER : endoplasmic reticulum ; Asn : asparagine ; OST : oligosaccharyl transférase

D'après Nakayama et al 2013³

1.2 Rôles des chaînes glycaniques dans le développement

1.2.1 Rôle des N-glycannes

La plupart des protéines membranaires ou sécrétées sont modifiées par des structures glycaniques attachées aux résidus asparagine que l'on appelle N-glycannes. Les N-glycannes, composés d'au moins 7 monosaccharides, sont des structures complexes, compte tenu de la diversité des monosaccharides pouvant être attachés, des différentes liaisons possibles entre les monosaccharides, et du processus de maturation. Les N-glycannes jouent un rôle primordial dans la sécrétion ou la stabilité d'une protéine et participent à des processus cellulaires comme l'adhésion et la migration^{1,4}. Les N-glycannes jouent également un rôle majeur dans le développement des mammifères⁵. Ce rôle fut mis en évidence dans un premier temps par l'observation des effets de la tunicamycine, un antibiotique qui inhibe l'enzyme UDP-GlcNAc : dolichol phosphate N-acétylglucosamine-1-phosphate transférase (GPT), bloquant ainsi toute synthèse de N-glycannes, sur des embryons murins. Chez la souris, dès le stade embryonnaire l'absence de N-glycannes obtenue par un traitement à la tunicamycine est responsable d'un défaut de compactage de l'embryon et d'un défaut d'adhésion au trophoblaste⁶. Dans le RE il existe un système de contrôle de la qualité du repliement des protéines. Les protéines correctement repliées seront adressées vers le golgi pour être sécrétées tandis que les protéines mal repliées seront dégradées. Une accumulation excessive de protéines mal repliées dans le RE entraîne une réponse cellulaire physiologique appelée UPR (*unfolded protein response*) dont le rôle est d'augmenter les capacités de repliement, de maturation ou de dégradation des protéines mal repliées. Le défaut de synthèse de N-glycannes entraîne une réponse UPR, qui, lorsqu'elle est prolongée, peut conduire à l'apoptose⁷.

Les premières observations faites avec la tunicamycine furent ensuite confirmées par de nombreux modèles murins de déficit en enzymes impliquées dans la N-glycosylation. La délétion homozygote des gènes codant pour des enzymes responsables du transfert du GlcNAc comme la GPT ou les N-acétylglucosaminyltransférases (MGAT1 et MGAT2) entraîne une létalité embryonnaire, associée, dans le cas de MGAT1, à un défaut de développement encéphalique, de vascularisation, une inversion de la position du cœur et un défaut de formation du tube neural^{8,9}.

Le défaut de galactosylation des N- et O-glycannes est aussi délétère puisque les souris homozygotes déficientes en galactosyltransférase-1 (GalT-1) présentent un retard de croissance et décèdent prématurément¹⁰.

Les polysialyltransférases, elles, sont en charge de l'ajout de résidus acide sialique, particulièrement retrouvés sur les molécules d'adhésion des cellules neurales (*neural cell adhesion molecule*, NCAM). Cette polysialylation module les propriétés d'adhésion des NCAM et participe au développement du système nerveux central in utero¹¹. Les souris déficientes en polysialyltransférase ST8SiaIV présentent une polysialylation normale des NCAM à la naissance, qui sera en revanche perdue au cours du développement cérébral post natal¹².

1.2.2 Rôle des O-glycannes de type mucine

Les O-glycannes de type mucine sont des chaînes glycaniques attachées principalement aux résidus serine ou thréonine par l'intermédiaire d'un GalNAc. Les O-glycannes de type mucine décorent principalement les protéines membranaires ou sécrétées contenant un domaine riche en serine ou thréonine. L'épithélium, les leucocytes et l'endothélium vasculaire génèrent ce type de O-glycannes. Les enzymes de la famille UDP-N- acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransférase (ppGalN-Tase) assurent le transfert du premier motif GalNAc sur la protéine naissante. La délétion homozygote de ppGalN-Tase n'entraîne pas d'anomalie du développement chez la souris bien que l'expression des O-glycannes de type mucine soit altérée dans les cellules de Purkinje et les lymphocytes¹³. Les enzymes responsables de l'élongation de la chaîne de type mucine par addition de GlcNAc, acide sialique, fucose ou galactose sont respectivement les GlcNAc transférase, sialyltransférases, fucosyltransférases et galactosyltransférases. L'inactivation chez la souris des gènes codant pour la sialyltransférase ST3Gal-I, la GlcNAc transférase GlcNAcT-I ou pour les fucosyltransférases FucTIV et FucTVII n'induit pas d'anomalie majeure du développement à la naissance. Cependant à un l'âge adulte ces souris présentent des anomalies de différenciation thymocytaire ou de recrutement leucocytaire¹⁴.

1.2.3 Rôle des glycosphingolipides

Les glycolipides ou glycosphingolipides sont constitués d'une chaîne glycanne reliée de façon covalente à un sphingolipide membranaire, la céramide. Leur processus de fabrication ressemble à celui des O-glycannes car les monosaccharides sont directement assemblés sur le motif céramide dans le golgi. Ces glycolipides peuvent être sialylés, dans ce cas on les appellera gangliosides. Les glycolipides participent aux mécanismes de transduction du signal membranaire et d'adhésion cellulaire^{15,16}.

La plupart des glycolipides sont constitués d'un cœur glucosylcéramide formé par la glucosylcéramide synthase. La délétion du gène codant pour cette enzyme chez la souris conduit à la mort in utero par apoptose de l'ectoderme embryonnaire¹⁷.

D'autres glycolipides sont constitués d'un cœur galactosylcéramide et sont particulièrement retrouvés dans la myéline du système nerveux central et périphérique. La galactosylcéramide synthase (CGT) participe à la formation de ce cœur galactosylcéramine qui pourra ensuite subir une sulfatation ou une sialylation. La démyélinisation et le défaut de conduction nerveuse observés chez les souris déficientes en CGT conduisent à leur décès prématuré entre 18 et 90 jours. Un défaut de spermatogenèse est aussi constaté chez ces souris^{18,19}.

Les souris déficientes en complexes gangliosides, par délétion de gènes codant par exemple pour la ganglioside GM2/GD2 synthase, la β 1-4GalNAc transférase, la galactosyltransférase GalT2 ou les sialyltransférases SAT IV et SAT V présentent un défaut de conduction nerveuse puis une dégénération axonale du système nerveux central et périphérique ; cette dégénération s'accompagnant d'une démyélinisation et de troubles moteurs^{20,21}.

L'ensemble de ces études résumées par Haltiwanger et al⁵ montrent l'importance des glycolipides dans le développement embryonnaire. Les gangliosides, en particulier, sont indispensables au bon fonctionnement du système nerveux et à la fonction de reproduction masculine.

En pathologie humaine les déficits héréditaires en glycosylation (*Congenital Disorder of Glycosylation* ou CDG) sont caractérisés par des anomalies génétiques touchant la synthèse des glycoprotéines. Ce syndrome fut décrit pour la première fois par le Docteur Jaak Jaeken en 1980²²⁻²⁵. Un pourcent du génome étant dédié au processus de glycosylation, de nombreux gènes impliqués dans les CDG ont depuis été identifiés. Compte tenu de l'implication des

chaînes glycaniques dans le développement, les CDG sont des maladies multi systèmes pouvant inclure une atteinte neurologique, un dysmorphisme, un retard de croissance et des atteintes spécifiques d'organe.

2. Les défauts de glycosylation : congenital disorder of glycosylation (CDG) syndrome

2.1 Définition et classification

Les syndromes CDG désignent un groupe de maladies rares caractérisé par un déficit enzymatique ou d'un transporteur impliqué dans la synthèse des N-glycoprotéines (pour la plupart), des O-glycoprotéines, la synthèse des glycosphingolipides ou encore des celle des ancras glycosylphosphatidylinositol. Parmi les CDG affectant la N-glycosylation, on distingue schématiquement les CDG affectant la synthèse du précurseur oligosaccharidique ou son transfert sur la chaîne peptidique (CDG de type I) (**Figure 3**) des CDG affectant la maturation des chaînes glycaniques (CDG de type II) (**Figure 4**). La déficience d'une enzyme impliquée dans la synthèse du précurseur oligosaccharidique dans le RE aboutit à la formation d'une chaîne glycanne incomplète non reconnue par l'OST qui n'assurera donc pas son transfert sur la chaîne peptidique. L'activité enzymatique n'étant jamais réduite à zéro, quelques chaînes complètes seront transférées. Les anomalies des CDG I sont dites « quantitatives » puisqu'elles entraînent un défaut de chaînes glycaniques complètes sur les protéines (**Figure 3**). Les anomalies rencontrées dans les CDG II surviennent après le transfert du précurseur oligosaccharidique sur la protéine et perturbent la maturation de la chaîne glycanique. Les CDG II sont dits « qualitatifs » : les chaînes sont bien présentes sur les protéines mais de composition modifiée (**Figure 4**).

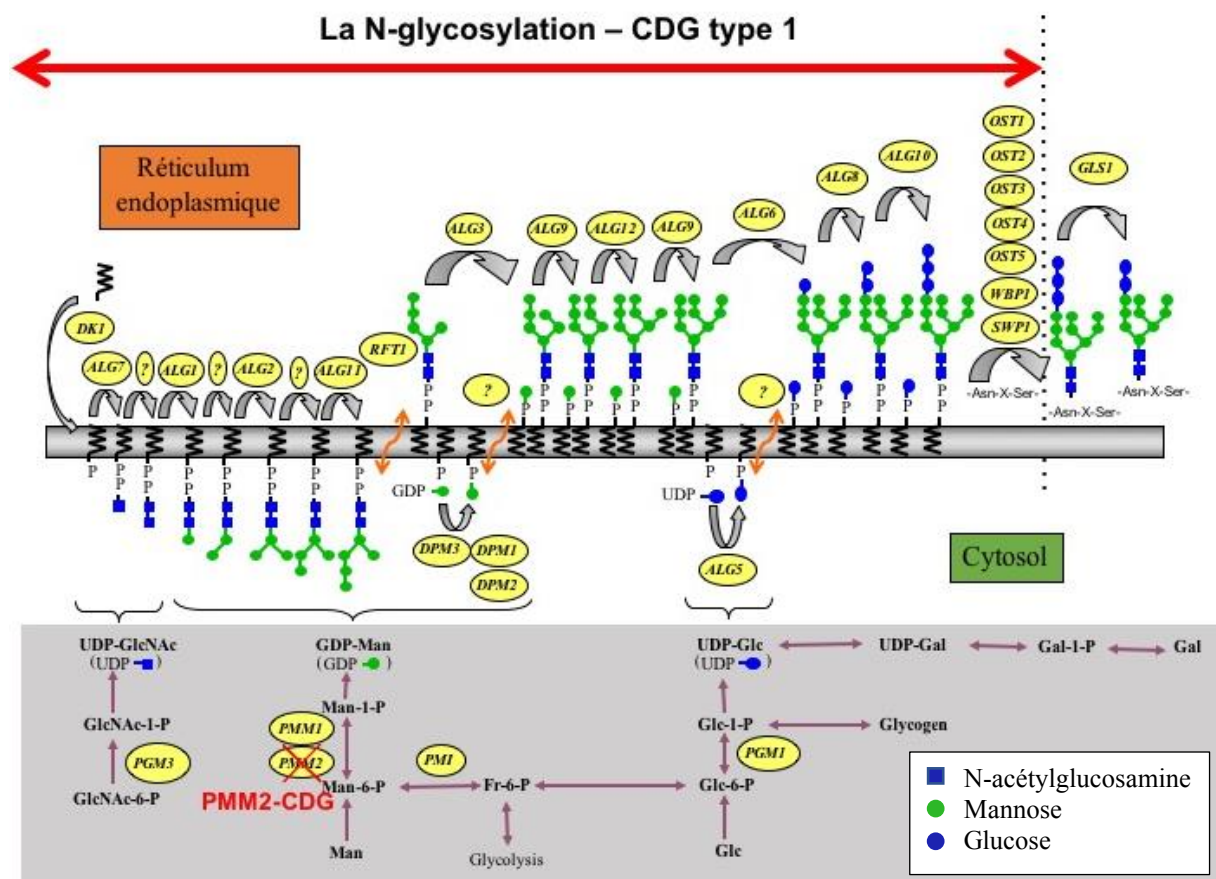


Figure 3 : *Synthèse de l'oligosaccharide lié au dolichol-phosphate dans le cytosol et le reticulum endoplasmique*

Les enzymes impliquées dans la synthèse du précurseur oligosaccharidique et les protéines assurant son transfert sont encerclées en jaune. 17 d'entre elles sont responsables de CDG. L'enzyme la plus fréquemment déficiente dans les CDG I est la phosphomannomutase 2 (PMM2) qui assure la conversion du mannose-6-P en mannose-1-P. Le CDG correspondant est le PMM2-CDG (ancien CDG-Ia).

Adapté de T Dupré 2004²⁶ (avec l'autorisation de T Dupré)

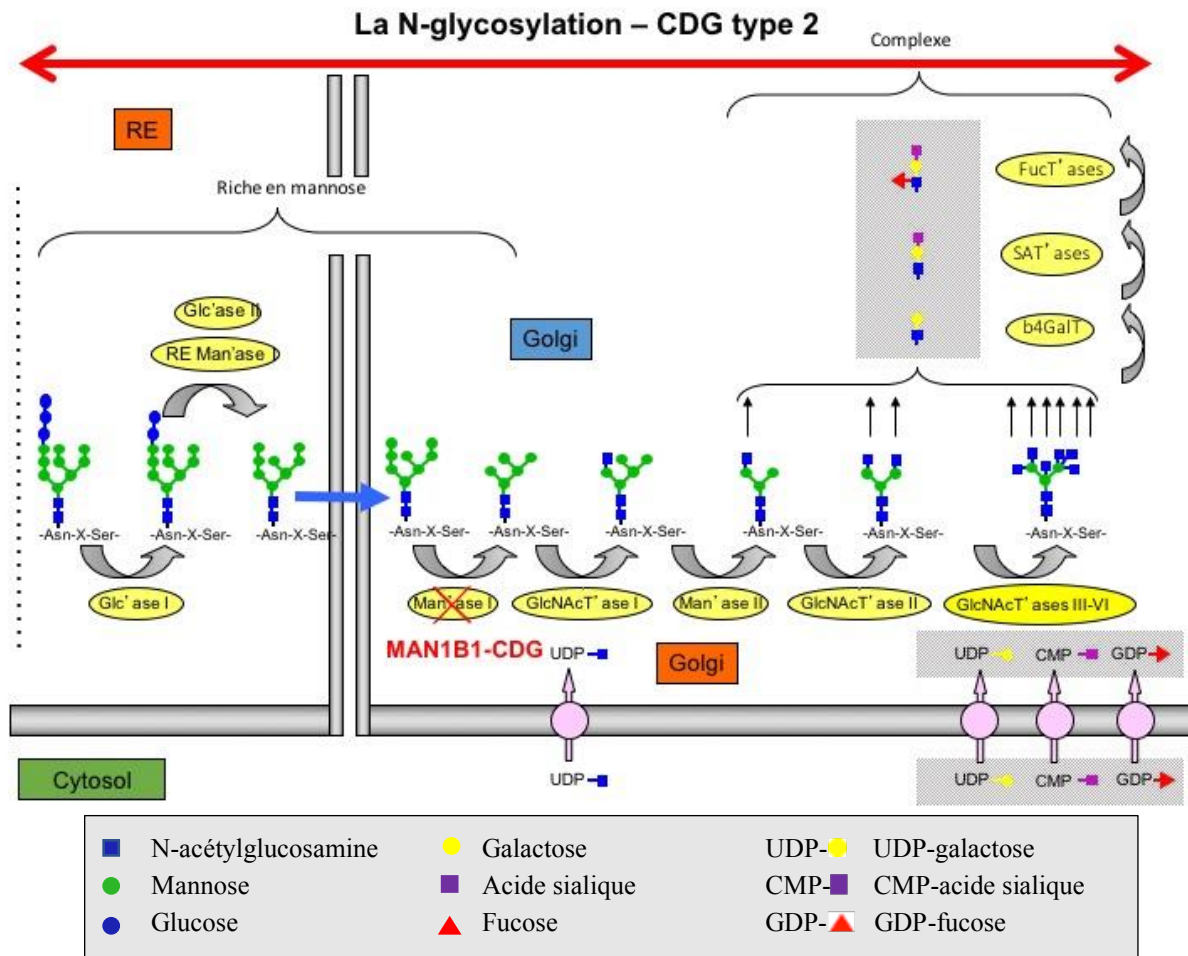


Figure 4 : **Maturation des chaînes glycaniques dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi**

Les enzymes impliquées dans la maturation de la chaîne glycanne sont encerclées en jaune. La golgi α 1-2 mannosidase 1 (Man'ase I) est responsable du CDG II le plus fréquent MAN1B1-CDG.

Adapté de T Dupre et al 2004²⁶ (avec l'autorisation de T Dupré).

Dès la découverte des premiers cas de CDG dans les années 80 une classification basée sur le profil de sialylation de la transferrine (Tf) a été proposée pour distinguer les CDG de type I des CDG de type II. Ainsi le déficit en phosphomannomutase (PMM2) fut le premier CDG de type I découvert et nommé CDG-Ia. Les CDG I découverts par la suite eurent comme dénomination CDG-Ix (x étant la lettre suivante de l'alphabet).

Cette première classification des CDG devient inadaptée pour les CDG au profil de sialylation de la Tf normal ou ceux combinant les défauts de N- et O-glycosylation. Par conséquent, J Jaeken et al propose en 2009 une nouvelle nomenclature basée sur le nom du gène impliqué

dans le CDG²⁷. Ainsi CDG-Ia devient PMM2-CDG. Cette nomenclature permet la distinction des anomalies de N-glycosylation, de O-glycosylation, de glycosylation de glycosphingolipides ou des ancras glycosylphosphatidylinositol (GPI), ou encore des anomalies multiples. Les CDG sont traditionnellement caractérisés par un défaut d'une enzyme ou d'un transporteur directement impliqué dans le processus de glycosylation. Cependant, de nouveaux types de CDG liés à des anomalies du trafic vésiculaire ou de l'homéostasie du pH et du manganèse ont émergés ces dernières années²⁸⁻³⁰. En termes de localisation cellulaire, l'anomalie en cause intervient dans environ 80% des cas dans le réticulum endoplasmique (RE) et le Golgi, les autres anomalies sont localisées dans le compartiment intermédiaire RE-Golgi, le cytosol et la membrane. L'ensemble des CDG identifiés en 2017³¹ sont répertoriés dans l'**Annexe I** selon la localisation du défaut et le type de glycosylation impactée.

2.2 Epidémiologie

En l'absence de registre mondial sur les CDG, il est difficile de définir l'incidence de la maladie. Cependant le réseau de travail européen EURO-CDG a mis en place en 2016 un registre européen dans lequel 1350 patients diagnostiqués sur le plan moléculaire ont été enregistrés. Ce registre révèle que les CDG-I sont beaucoup plus fréquents que les CDG-II (94% des patients vs 6%). Le CDG-I le plus fréquent est le PMM2-CDG diagnostiqué chez 66% des patients (**Figure 5**)³². D'après les données recueillies en Europe, la prévalence du CDG est estimée aux alentours de 0,1-0,5/100 000. Cette prévalence observée est inférieure à celle calculée à partir des fréquences alléliques déterminées au sein d'une population saine, estimée à 1/20 000 dans la population allemande ou danoise³³ et 1/77 000 en Estonie³⁴. Ces données suggèrent que le CDG est une maladie largement sous-diagnostiquée.

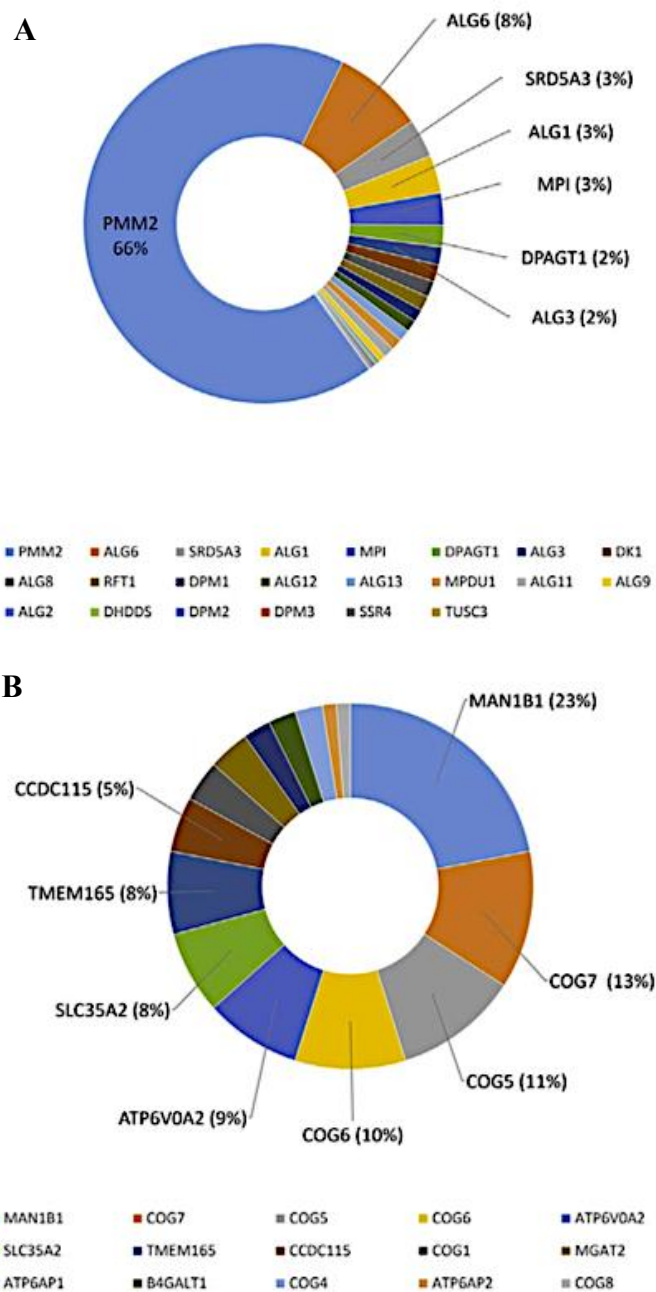


Figure 5 : *Distribution des CDG de type I (A) et de type II (B) diagnostiqués en Europe*

D'après Péanne et al, 2018³²

2.3 Diagnostic

2.3.1 Dépistage

Le diagnostic d'un CDG consiste dans un premier temps à dépister des anomalies de la N-glycosylation (les plus fréquentes) par l'étude d'une protéine N-glycosylée, la transferrine (Tf). La Tf est une protéine plasmatique chargée de transporter le fer et qui possède 2 chaînes N-glycanniques chacune pouvant porter un ou plusieurs acides sialiques terminaux. Le point isoélectrique (PI) de la Tf est déterminé par son contenu en glycosylation (en particulier en acide sialique). Ainsi, son étude par isoélectrofocalisation (IEF), dont le principe repose sur la séparation des protéines selon leur point isoélectrique, est la méthode de choix pour dépister les déficits en N-glycosylation associé à une perte d'acide sialique²³. La forme circulante dominante est la tétrasialo-transferrine suivi de la forme penta-, tri- et disialo-transferrine (**Figure 6**). Un défaut de N-glycosylation entraînera une diminution des acides sialiques terminaux à l'origine d'une modification du profil de sialylation de la Tf. Cette technique permet de distinguer deux types de profils : (i) les profils de type I observés dans les CDG-I, caractérisés par une diminution de la fraction tétra- et une augmentation des fractions di- et/ou asialo-Tf, et (ii) les profils de type II définis par une augmentation globale des formes hypoglycosylées tri-, di-, mono- et/ou asialo-Tf qui eux seront évocateurs d'un CDG-II (**Figure 6**).

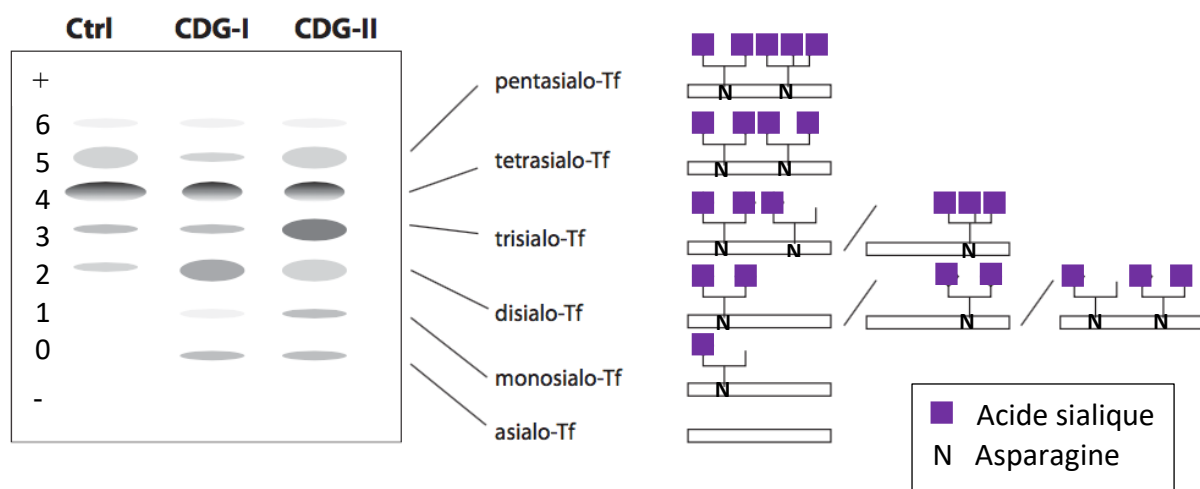


Figure 6 : Représentation schématique des isoformes de la transferrine à l'isoélectrofocalisation (IEF)

L'isoforme circulante prédominante est la tétrasialotransferrine chez un sujet control (Ctrl). Un profil de CDG de type I (CDG-I) correspond à une baisse de la tétrasialotransferrine au profit des formes disialo et asialotransferrine, tandis qu'un profil de type II (CDG-II) montre une élévation globale des formes hyposialylées tri-, di-, mono- et asialotransferrine. La représentation structurale schématique des différentes glycoformes est à droite du schéma. Adapté de Goreta et al, 2012³⁵

Plusieurs techniques permettent de dépister les isoformes de la Tf : l'IEF (séparation selon le PI de la protéine) sur sérum, plasma ou buvard, reste le test standard. L'étude de la transferrine carboxydéficiente (CDT) en Elisa/electrophorese capillaire ou HPLC, aussi utilisée comme marqueur de l'alcoolisme, est utile au diagnostic du CDG³⁶⁻³⁸. Cette technique a l'avantage d'être automatisable et rapide. L'électrophorèse capillaire de la Tf ne peut cependant pas être réalisée sur buvard ou plasma EDTA mais seulement sur sérum ou plasma hépariné.

Avant de pousser les investigations il est important d'éliminer les causes d'hypoglycosylation secondaire observés par exemple chez les patients atteints de galactosémie ou d'intolérance héréditaire au fructose et à l'origine de faux positifs^{39,40}. Des anomalies de glycosylations peuvent aussi être acquises au cours de certaines maladies comme les maladies chroniques du foie ou l'alcoolisme⁴¹⁻⁴³. Certains polymorphismes de la Tf modifient le point isoélectrique de la protéine sans que les chaînes glycaniques ne soient touchées et sont à l'origine d'un profil anormal de la Tf. Ces faux positifs disparaissent à l'étude en western blot puisque la masse moléculaire de la protéine n'est pas affectée.

Enfin, une mauvaise conservation des échantillons (risque de clivage des acides sialiques par des neuraminidases de micro-organismes) peut être à l'origine d'une augmentation des formes hyposialylées. La congélation à -20°C des échantillons permet de limiter ce phénomène.

A l'inverse, certaines situations sont à l'origine de faux négatifs. Sans que nous en connaissions la raison, certains patients adultes CDG-Ia peuvent présenter un profil normal de la Tf alors que l'activité enzymatique PMM2 est bien effondrée conduisant à l'étude du profil de glycosylation d'autres protéines⁴⁴.

De plus, le diagnostic est particulièrement difficile en période néonatale en raison de la présence de formes hypoglycosylées de la Tf jusqu'à l'âge d'un ou deux mois.

2.3.2 Confirmation

La suite des investigations dépendra du profil de la Tf obtenu à la première étape.

Un profil de type 1 à l'IEF de la Tf met en évidence un défaut d'assemblage ou de transfert du précurseur glycanique localisé dans le cytosol ou le RE évocateur d'un CDG-I. L'étude en

électrophorèse SDS-page et western blot de la Tf et d'autres protéines N-glycosylées comme l'haptoglobine et l'alpha1-glycoprotéine confirmera l'absence de chaînes N-glycanniques complètes traduite par la présence de plusieurs bandes de masse moléculaire inférieure à la protéine intacte encore présente (**Figure 7**).

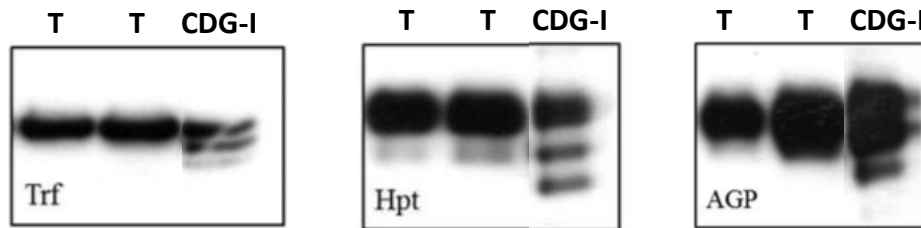


Figure 7: Analyse en électrophorèse SDS-page et western blot de différentes protéines circulantes

Analyse en SDS-page western blot de la transferrine (Tf), l'haptoglobine (Hpt) et de l'alpha1-glycoprotéine (AGP) chez 2 contrôles (T) et un patient CDG-I. La présence de plusieurs bandes de masse moléculaire inférieure à la protéine intacte traduit un défaut quantitatif de chaînes glycanniques caractéristique des CDG-I.

Adapté de Bruneel et al⁴⁵

Le PMM2-CDG étant le plus fréquent des CDG de type I, une méthode de mesure de l'activité enzymatique de PMM2 a été développée sur les leucocytes ou fibroblastes de patients. Le MPI-CDG (ancien CDG-Ib) fut le second CDG de type I identifié et caractérisé par un déficit en mannose-6-phosphate isomérase (MPI) dont l'activité peut aussi être mesurée sur les leucocytes et fibroblastes dans les laboratoires spécialisés dans le diagnostic du CDG. Il n'est cependant pas aisé d'interpréter l'activité de PMM2 en raison de l'instabilité de l'enzyme dans les leucocytes et de l'absence chez certains malades atteints de PMM2-CDG d'une baisse d'activité PMM2 mesurable⁴⁶. En cas de déficit enzymatique en PMM2 ou MPI les gènes codant pour ces enzymes seront séquencés à la recherche de mutations permettant de poser le diagnostic de PMM2-CDG ou de MPI-CDG respectivement. Au contraire, si les activités enzymatiques sont normales, une analyse en chromatographie liquide haute performance (ou HPLC) de la biosynthèse du lipid-linked oligosaccharide (LLO) après marquage des fibroblastes de patients en culture par du mannose tritié pourra aider à l'identification de l'enzyme impliquée et au diagnostic de CDG de type I^{47,48}.

Un profil de type 2 à l'IEF de la Tf évoque un CDG-II, c'est-à-dire un défaut postérieur à l'étape de transfert du précurseur glycanique dans le RE ou au cours du processus de maturation golgien. Les CDG de type II n'entraînent pas systématiquement une anomalie du profil de migration de la Tf à l'IEF. Dans certains cas de déficit en glucosidase I (GCSI) ou en transporteurs SLC35C1 (CMP-fucose transporteur) et SLC35A1 (CMP-sialic acid transporteur) les profils de la Tf peuvent être normaux. A l'inverse des CDG-I, les CDG-II n'entraînent pas de perte de masse suffisamment importante pour permettre leur détection en électrophorèse SDS-page et western blot, à l'exception du MGAT2-CDG (ancien CDG-IIa) dans lequel le défaut en N-Acetylglucosaminyltransférase 2 survient assez précocement dans les étapes de maturation pour induire une perte massique. En revanche l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) dont le principe repose sur la séparation des protéines selon leur point isoélectrique et leur masse moléculaire apporte des informations complémentaires quant aux défauts de charge des N-glycoprotéines (**Figure 8**). La présence de glycoformes anormalement moins acide sera à l'origine d'un décalage vers la droite des spots à l'électrophorèse 2D.

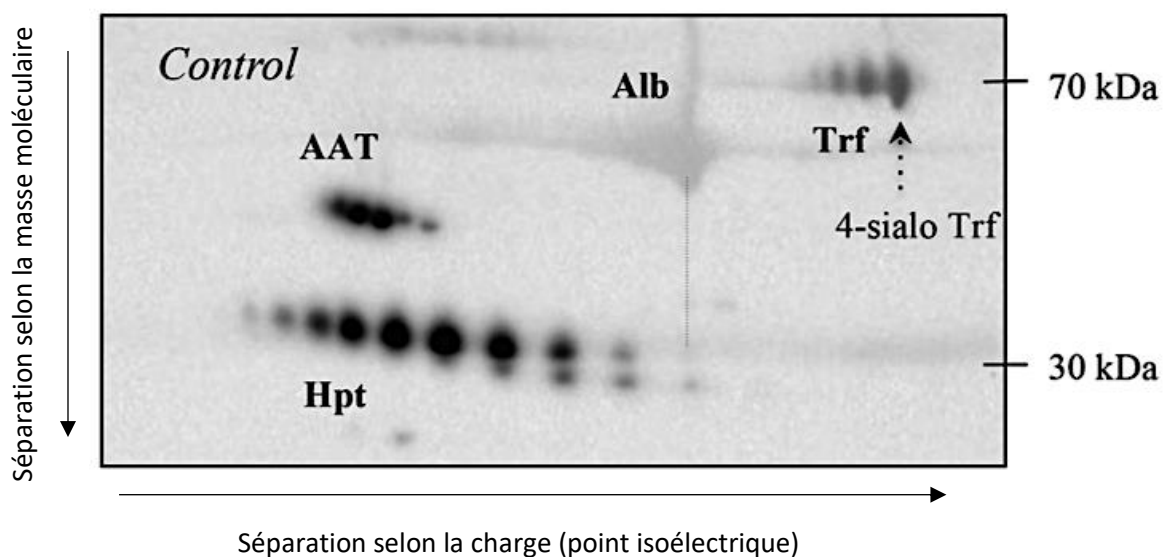


Figure 8 : Électrophorèse bidimensionnelle de N-glycoprotéines du sérum d'un sujet sain

AAT : alpha1-antitrypsine ; Alb : albumine ; Trf : transferrine ; Hpt : haptoglobine. Adapté de A Bruneel, Electrophoresis⁴⁵.

En cas de suspicion d'un CDG-II, il est primordial de savoir si une anomalie de O-glycosylation est associée. Pour cela l'étude du profil de glycosylation d'une protéine O-glycosylée comme

l'apolipoprotéine CIII (APOC3) est couramment réalisée. L'APOC3 possède en position 74 une chaîne O-glycannique porteuse de 2 acides sialiques responsable de la présence des formes di-, mono- et asialylée en circulation mises en évidence par IEF ou électrophorèse 2D⁴⁵ (Figure 9).

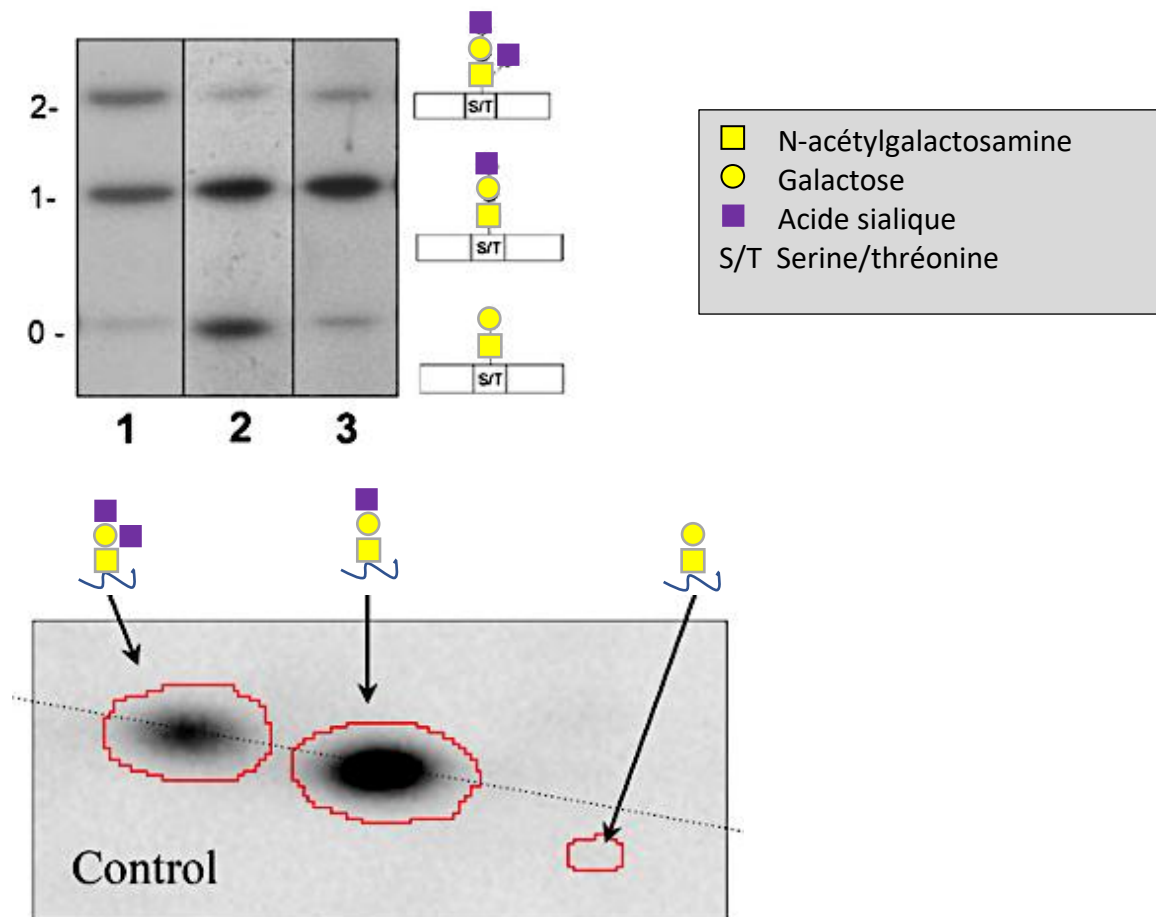


Figure 9 : Dépistage des anomalies de O-glycosylation de l'APOC3

Haut : Isoélectrofocalisation de l'apolipoprotéine CIII (APOC3). Ligne 1 : contrôle ; lignes 2 et 3 : profils anormaux. D'après Lefeber et al, 2011⁴⁹

Bas : Électrophorèse 2D de l'APOC3 chez un sujet sain. D'après A Bruneel 2019⁴⁵

L'étude en spectrométrie de masse des N-glycannes du serum obtenu après clivage de la liaison entre le GlcNAc et l'asparagine par la N-glycosidase F (PNGaseF) permet de compléter les investigations. Le profil de N-glycannes en spectrométrie de masse permet assez aisément l'identification de CDG-II causés par des anomalies de N-glycosylation isolées comme le MGAT2-CDG, B4GALT1-CDG (déficit en B-1,4-galactosyltransferase) ou SLC35C1-CDG⁵⁰.

Cependant, la plupart des CDG-II combinent à la fois des anomalies de N- et O-glycosylation à l'origine de profils souvent aspécifiques en spectrométrie de masse, même si, après extraction du sérum, les glycoformes de l'APOC3 peuvent être étudiées en spectrométrie de masse et aider à la caractérisation du déficit⁵¹. Les CDG-II caractérisés par une perturbation du trafic vésiculaire ou de l'homéostasie sont eux aussi plus difficiles à diagnostiquer.

2.3.3 Génétique

Le séquençage du gène impliqué dans l'anomalie de glycosylation caractérisera le type de CDG et sera orienté selon les résultats des investigations biochimiques et du phénotype clinique. En effet certains CDG sont associés à un phénotype bien particulier que nous développerons dans la suite de ce mémoire.

L'identification du gène impliqué sera évidente devant un profil de type 1 à l'IEF de la Tf et une activité enzymatique PMM2 ou MPI diminuée. Dans ce cas le séquençage des gènes PMM2 et MPI sera ciblé. En l'absence de baisse d'activité enzymatique PMM2 ou MPI, un panel de gènes impliqués dans des CDG-I sera appliqué devant un profil de CDG-I (**Figure 10**). De la même manière, un panel de gènes impliqués dans les CDG-II sera utilisé dans les situations dont le profil biochimique est évocateur d'un CDG-II, excepté pour certains types de CDG-II dont le phénotype ou le profil des N-glycannes en spectrométrie de masse ferait d'emblée évoquer un gène candidat. Dans les situations où aucun gène n'est identifié, un séquençage d'exome entier peut être envisagé.

Depuis l'avènement des méthodes de séquençage l'arbre diagnostique a été peu à peu modifié pour orienter assez rapidement vers des panels de gènes à séquencer⁴⁵ (Arbre diagnostique **Figure 10**). A l'hôpital Bichat-Claude Bernard – APHP, un panel NGS de 39 gènes est utilisé pour le diagnostic des CDG (**Figure 11**)

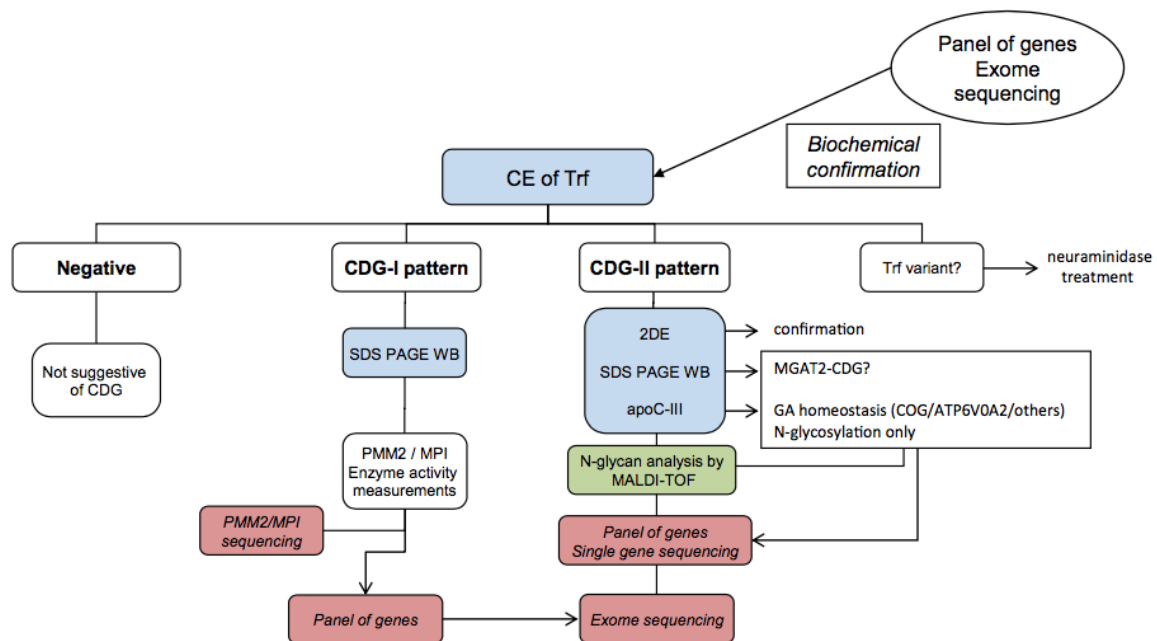


Figure 10: Proposition d'arbre diagnostique des CDG

CE : électrophorèse capillaire ; Trf : transferrine ; 2DE : électrophorèse 2D. D'après Bruneel et al, electrophoresis 2019⁴⁵

Panel NGS (Mars 2019)

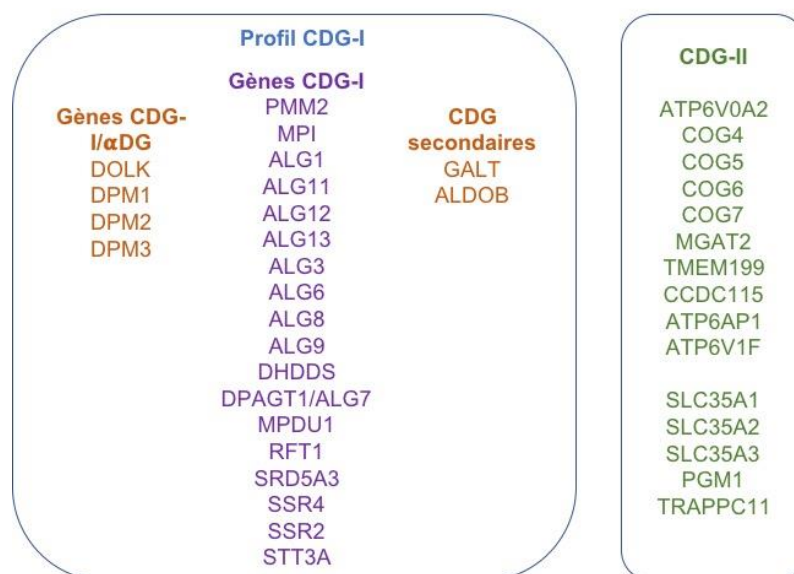


Figure 11 : Panel de gènes séquencés en Next Generation Sequencing (NGS) selon le profil biochimique de CDG observé

CDG-I/αDG : CDG-I associé à un syndrome de dystroglycanopathie ; GALT : gène codant pour la galactose 1-phosphate uridylyltransférase impliqué dans la galactosémie ; ALDOB : gène codant pour l'aldolase B impliqué dans l'intolérance héréditaire au fructose. D'après la présentation d'A Bruneel - Journée CDG 22 mars 2019 - hôpital Necker-Enfants malades – APHP (avec l'autorisation du Dr S Vuillaumier-Barrot).

Le mode de transmission génétique du CDG est autosomique récessif dans la plupart des cas. Quelques CDG associés à un défaut de N- ou O-glycosylation se transmettent selon un mode autosomique dominant et d'autres CDG sont de transmission liée à l'X (**Annexe I**)³¹.

Rien que sur le gène PMM2 plus d'une centaine de mutations, faux-sens majoritairement, ont été décrites à ce jour. La mutation R141H, retrouvée chez plus de 75% des patients caucasiens est de loin la plus fréquente et n'a jamais été retrouvée à l'état homozygote car très probablement létale avant la naissance^{52,53}. Les patients sont généralement hétérozygotes composites. A ce jour, aucune corrélation génotype/phénotype n'a été établie en raison de la très grande hétérogénéité allélique^{52,54}.

2.4 Phénotype des CDG

2.4.1 Phénotype général des CDG

Depuis la première description clinique de CDG en 1980 par Jaak Jaeken, l'entité clinique des CDG ne fait que de s'enrichir. A ce jour on dénombre plus de 100 types de CDG différents. Le spectre phénotypique des CDG est très étendu et hétérogène selon le type. Les CDG peuvent être associés à des formes très sévères s'exprimant in utero et d'issue fatale le plus souvent. En 2019, 21 cas d'hydrops fœtal non-immun associés à un CDG sont recensés dans la littérature, parmi eux 16 sont décédés avant la naissance ou dans les semaines qui suivent^{55,56}. L'hydrops fœtal n'est pas spécifique d'un seul type de CDG puisque les auteurs recensent par ordre de fréquence les formes PMM2-CDG, ALG9-CDG, ALG8-CDG, ALG1-CDG, MGAT2-CDG et COG6-CDG. D'autres anomalies anténatales sont décrites chez les patients atteints de PMM2-CDG comme les cardiopathies hypertrophiques, la ventriculomégalie cérébrale, l'hypoplasie/atrophie cérébelleuse ou encore des déformations squelettiques (membre court, lordose lombaire)⁵⁷.

L'atteinte de la plupart des CDG causé par un défaut de N-glycosylation est multi organe associant une atteinte neurologique. En principe, un CDG doit être recherché devant tout syndrome inexpliqué associant une atteinte neurologique ou non. Certains phénotypes sont plus spécifiques de certain type de CDG et peuvent orienter le diagnostic. Par exemple, l'atteinte hépatique fibrosante évoque un MPI-CDG, une distribution anormale des graisses

associée à un strabisme et des tétons inversés évoque un PMM2-CDG tandis que la *cutis laxa* fait suspecter un ATP6V0A2-CDG⁵⁸. Le phénotype peut aussi varier au sein d'un même type de CDG. Ainsi, parmi les PMM2-CDG on distingue les formes neurologiques des formes multiviscérales de présentation plus sévère et plus précoce⁵⁹. Le CDG étant une maladie sous-diagnostiquée, seuls les cas les plus sévères conduisent au diagnostic, les formes asymptomatiques ou très modérées sont découvertes de manière fortuite⁶⁰.

2.4.2 Phénotype du PMM2-CDG

L'âge moyen au diagnostic du PMM2-CDG, relativement jeune, est de 6,8 ans dans la série de Schiff et al⁶¹. Dès les premiers mois de vie, le PMM2-CDG se manifeste fréquemment par un retard de croissance, un strabisme, des tétons inversés, une mauvaise répartition des graisses et une hypotonie musculaire^{62,63} (**Figure 12**). Le PMM2-CDG est une maladie évoluant en quatre phases de la petite enfance jusqu'à l'âge adulte⁶⁴. L'atteinte multisystémique prédomine pendant la petite enfance avec les atteintes hépatique et cardiaque et la sensibilité accrue aux infections. L'enfance est ensuite ponctuée par l'épilepsie et la survenue des stroke-like, particulièrement en période de fièvre. Puis l'atrophie des membres, l'ataxie, le retard intellectuel et l'atteinte ophtalmique s'installent à l'adolescence. Enfin, à l'âge adulte, le déficit neurologique n'évolue plus et les patients présentent un hypogonadisme. Les patients atteints des formes les plus sévères, appelées multiviscérales, n'atteignent pas toujours l'âge adulte puisque ces formes sont associées à un taux de mortalité de 20%⁶⁵. Une revue récente et exhaustive de la littérature décrit de manière très détaillée le phénotype de ces patients par atteinte d'organe⁵⁷.



Figure 12 : *Caractéristiques morphologiques des enfants atteints de PMM2-CDG*

Les enfants présentent fréquemment un strabisme (A), des tétons inversés (B) et une anomalie de répartition des graisses (C)

Les patients atteints de PMM2-CDG présentent fréquemment des **malformations congénitales** incluant des dysmorphies faciales dans 29% à 65% des cas (front proéminent, visage long, plis épicanthaux, yeux en amande, long philtrum, oreilles larges et saillantes), une micro/macrocéphalie, une répartition anormale des graisses (25 à 91% des cas), des tétons inversés (25 à 100% des cas) et une cryptorchidie chez les garçons⁵⁸.

L'**atteinte neurologique** est constante qu'elle soit associée ou non à une atteinte multiviscérale et se traduit principalement par un trouble du développement de sévérité variable retrouvé chez 96% des patients. Près de 35% des patients présentent un handicap mental dont le degré est difficile à évaluer compte tenu de la mortalité précoce des cas sévères. Dès la naissance ou au cours des premières années la plupart des patients (95,4%) développeront aussi une atrophie cérébelleuse dont l'ataxie sera la principale manifestation privant la majorité des patients de la marche autonome. Le tableau neurologique se complique d'une hypotonie et d'une neuropathie périphérique. Cette dernière survient généralement plus tardivement (après l'âge de 10 ans). Certains patients peuvent développer une épilepsie. La principale complication neurologique aigue pouvant survenir chez les patients atteints de PMM2-CDG est le stroke-like (SL). Très probablement sous-estimé en raison de la difficulté du diagnostic, le nombre de cas de SL rapportés dans la littérature n'est que de 36⁵⁷. Ces épisodes de SL, parfois récurrents, surviennent généralement avant l'âge de 10 ans en contexte fébrile ou traumatique. Les épisodes de SL se traduisent par une symptomatologie proche de celle des accidents vasculaires aigus, d'où la terminologie de

stroke-like. Cette présentation clinique inclue somnolence, irritabilité, mono- ou hémiparésie, maux de tête, vomissements, troubles de la parole, cécité, épilepsie. Ces épisodes sont transitoires et les symptômes régressent en quelques heures à quelques mois selon les cas sans entraîner de séquelles. L'IRM permet de poser le diagnostic lorsqu'elle est réalisée dans les 6 heures qui suivent le début de l'épisode. Dans certains cas l'IRM révèle la présence d'un œdème associé aux anomalies focales. Les SL ne sont pas spécifiques des CDG puisque d'autres pathologies comme le syndrome MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode)⁶⁶, la migraine, l'épilepsie ou encore certaines tumeurs peuvent être accompagnés de ce type d'évènement⁶⁷.

Outre l'atteinte neurologique, d'autres organes sont la cible de cette forme de CDG. L'**atteinte ophtalmique** peut notamment inclure le strabisme, la rétinite pigmentaire, le nystagmus, la myopie et la perte d'acuité visuelle. Dans les formes multiviscérales **le cœur** est rapidement atteint de péricardite, cardiomyopathies hypertrophiques ou encore d'insuffisance cardiaque⁵⁹. La malformation canotroncale du cœur est aussi la malformation la plus fréquente chez ces patients. Sur le plan **gastro-intestinal**, diarrhées, vomissements et difficultés d'alimentation sont à l'origine d'un retard de croissance chez 66,5% des patients la première année de vie dont le traitement nécessite la mise en place d'une nutrition entérale. Dans les formes néonatales très sévères l'**insuffisance hépatique** peut accompagner d'autres défaillances d'organe, tandis que dans les formes moins sévères on rencontre souvent une hépatomégalie associée à une élévation modérée des transaminases. L'**atteinte rénale** comprend la polykystose rénale, néphromégalie, hydronéphrose et/ou tubulopathie. A l'âge de la puberté, cette dernière ne s'opérera pas normalement, les jeunes filles présenteront une **insuffisance ovarienne** prématurée et les garçons un **hypogonadisme**^{60,68}. Les patients atteints de PMM2-CDG sont aussi plus fragiles sur le plan immunitaire. Hypogammaglobulinémie, immunodépression et mauvaise réponse à la vaccination concourent à une **sensibilité accrue aux infections**. Enfin ces patients présentent des **malformations squelettiques** notamment du thorax et des pieds. Généralement après l'adolescence, ostéoporose ou scoliose peuvent s'installer. Certaines formes de PMM2-CDG peuvent être diagnostiquées plus tardivement, à l'adolescence ou l'âge adulte⁶⁸. Le diagnostic de CDG doit donc être évoqué en cas d'atteinte multi organe, même à l'âge adulte.

3. Anomalies de l'hémostase chez les patients atteints de CDG

Dès les premiers cas de CDG décrits, des anomalies de l'hémostase assez singulières ont été rapportées incluant des anomalies plaquettaires et des déficits en protéines de la coagulation. Dans un premier temps nous rappellerons brièvement la physiologie de l'hémostase qui constitue l'ensemble des phénomènes qui participent au maintien de la circulation sanguine et à l'intégrité vasculaire. L'hémostase est distinguée schématiquement en deux phases : (i) **l'hémostase primaire** au cours de laquelle les plaquettes s'activent à la surface de l'endothélium pour former un clou plaquettaire et (ii) la **coagulation** qui consiste en une succession de réactions enzymatiques qui aboutit à la formation d'un réseau de fibrine qui consolide l'amas de plaquettes pour former le caillot fibrino-plaquettaire. Puis nous exposerons l'ensemble des anomalies décrites chez les patients CDG et nous détaillerons le rôle des chaînes glycaniques pour chacun des acteurs de l'hémostase.

3.1 Rappels sur la physiologie de l'hémostase

3.1.1 L'hémostase primaire

Schématiquement, lors d'une lésion vasculaire, l'hémostase primaire rassemble les premières étapes du processus physiologique qui permet d'arrêter le saignement par la formation d'un thrombus essentiellement plaquettaire. L'hémostase primaire fait intervenir les plaquettes, les forces hémodynamiques induites par le flux sanguin et la composante vasculaire avec notamment les protéines thrombogènes du sous-endothélium comme le collagène et le facteur von Willebrand (VWF).

Lors d'une lésion vasculaire, les protéines thrombogènes du sous-endothélium sont exposées au flux sanguin. En condition de flux sanguin élevé, comme celui rencontré dans les artères, les plaquettes en circulation vont alors être, dans un premier temps, ralenties par l'interaction du complexe des glycoprotéines GPIb-V-IX présentes à leur surface avec le vWF. Les plaquettes ainsi ralenties vont pouvoir alors adhérer de façon stable notamment via les

récepteurs au collagène, GPVI et $\alpha_2\beta_1$ (**Figure 13**)⁶⁹. En conditions de flux veineux, l'adhérence initiale des plaquettes est principalement dépendant des récepteurs au collagène.

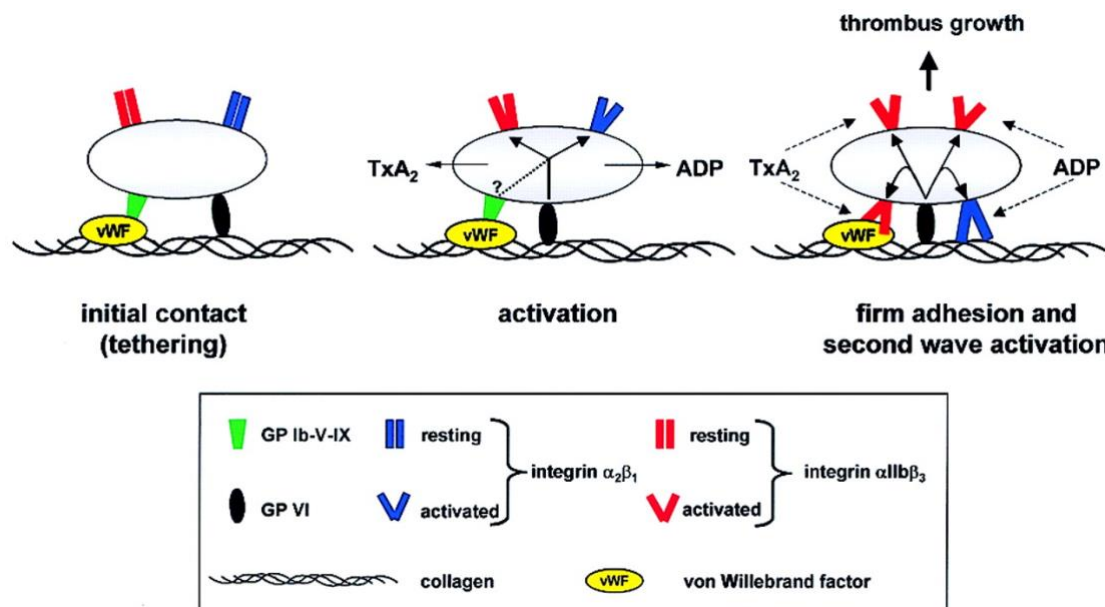


Figure 13 : Adhésion plaquettaire au sous-endothélium

La plaquette entre en contact avec le collagène du sous-endothélium grâce aux récepteurs GPIb-V-IX (par l'intermédiaire du vWF) et GPVI. L'interaction GPIb-vWF-collagène est particulièrement favorisée en présence de forces de cisaillement élevées. L'adhésion de la plaquette au collagène via GPIb et GPVI entraîne l'activation d'intégrines plaquettaires ($\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$) permettant de renforcer l'adhésion plaquettaire et induit une signalisation intra-cellulaire à l'origine du changement de forme de la plaquette, de l'augmentation du calcium intra-cytoplasmique, de la sécrétion d'adénosine diphosphate (ADP) et de la synthèse de thromboxane A2 (TxA_2). D'après Nieswandt 2003⁷⁰

L'engagement des récepteurs plaquettaires GPIb-V-IX et GPVI avec leurs ligands respectifs entraîne la transduction d'un signal permettant l'initiation de voies de signalisation intra plaquettaire conduisant notamment à la mobilisation du calcium intra-cellulaire⁷¹, la libération d'agonistes secondaires tels que le thromboxane A₂ ou l'adénosine diphosphate (ADP) permettant l'amplification de l'activation plaquettaire et le recrutement de nouvelles plaquettes. Par ailleurs l'ensemble de ces signaux intra plaquettaires permettent l'activation d'une intégrine clef, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui en changeant de conformation va lier son ligand principal, le fibrinogène. Cette liaison permet ainsi le pontage de deux plaquettes entre elles via une molécule de fibrinogène, c'est le mécanisme d'agrégation plaquettaire (**Figure 13**). D'autres intégrines capables d'interagir avec le collagène ($\alpha_2\beta_1$), la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$), la

fibronectine ($\alpha_5\beta_1$) ou la laminine ($\alpha_6\beta_1$) seront également activées et renforcent l'adhésion plaquettaire⁷².

Par ailleurs, l'activation des plaquettes entraîne une exposition des phospholipides anioniques sur le feuillet externe de la plaquette. Cette surface chargée négativement est nécessaire à l'interaction de complexes enzymatiques de la cascade de la coagulation qui participent à la génération de thrombine et à la formation du réseau de fibrine localement.

3.1.2 La coagulation

a) La cascade de la coagulation

La coagulation constitue une succession de réactions enzymatiques au cours desquelles des précurseurs inactifs des enzymes de la coagulation, appelés zymogènes, sont activés en cascade. L'activation de la coagulation est initiée par l'exposition du facteur tissulaire (FT). Le FT est exprimé constitutivement par les cellules extra-vasculaires (fibroblastes, cellules épithéliales, péricytes) qui se retrouvent exposées au sang lors d'une brèche vasculaire. Les cellules directement au contact du sang n'expriment pas le FT de manière constitutive afin de prévenir une activation permanente de la coagulation. En revanche l'expression du FT peut être induite dans certaines conditions pro-inflammatoires⁷³. La coagulation est déclenchée par le contact entre le FT et des traces de facteur VII activé (FVIIa) circulantes : le complexe FT-VIIa permet alors l'auto-activation du FVII en FVIIa ainsi que l'activation des facteurs FIX et FX en facteur IX activé (FIXa) et facteur X activé (FXa), respectivement (**Figure 14**). Une fois activés par clivage protéolytique, ces derniers vont pouvoir à leur tour activer leur substrat. En effet, le FIXa catalyse alors l'activation du FX en FXa, qui déclenchera à son tour l'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa)⁷⁴.

Les premières traces de thrombine produites lors de cette phase d'initiation sont capables d'activer les plaquettes ainsi que les cofacteurs de la coagulation, le facteur V (FV) et le facteur VIII (FVIII) impliqués dans la génération de thrombine. En présence de calcium, les FIXa et FXa, ainsi que leurs cofacteurs respectifs, les facteurs FVIIIa et FVa, viennent se fixer aux phospholipides anioniques exposés à la surface des plaquettes activées, pour former deux

complexes procoagulants, le complexe ténase et le complexe prothrombinase. Lorsque le FIXa est associé au FVIIIa au sein du complexe ténase, la vitesse d'activation du facteur FX est multipliée d'un facteur 10^5 à 10^6 par rapport à celle rapportée pour le FIXa seul⁷⁴. Quant au complexe prothrombinase, constitué du FXa et FVa, il accélère la conversion de la prothrombine en thrombine d'un facteur $3 \cdot 10^5$ comparativement au FXa seul. La thrombine est aussi capable d'amplifier sa propre production via l'activation du facteur XI (FXI) en facteur XI activé (FXIa) qui en activant le FIX circulant participe également à la génération de thrombine. La thrombine est alors générée en quantité suffisante pour cliver le fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble. De plus, la thrombine active le Facteur XIII (FXIII) en FXIIIa responsable de la stabilisation du caillot préformé en assurant des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine en présence de calcium⁷⁵. Ce réseau de fibrine est dissout grâce au système de la fibrinolyse une fois les tissus vasculaires sous-jacents régénérés.

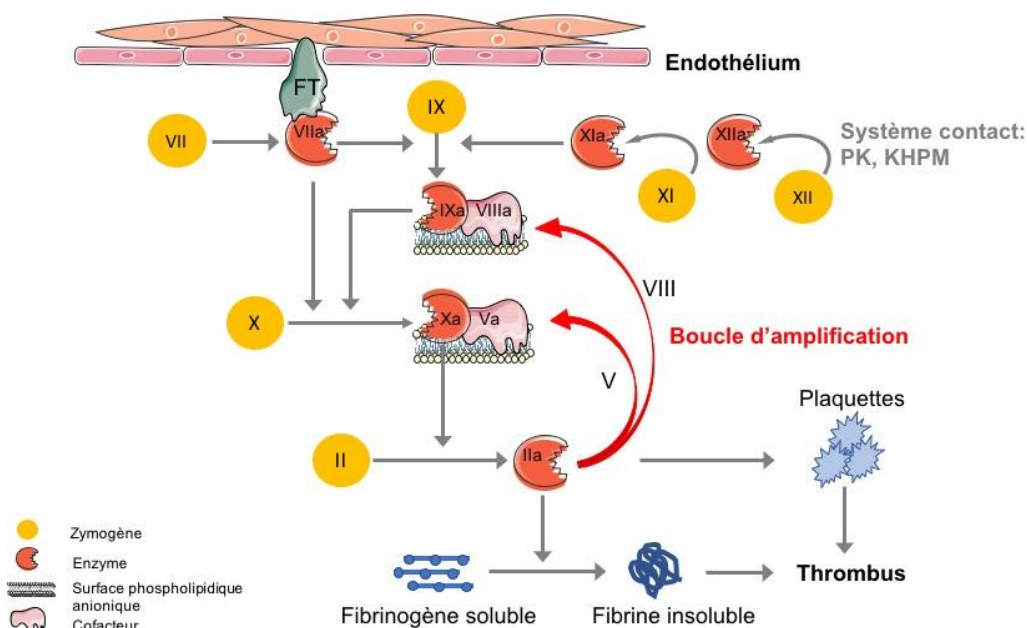


Figure 14 : Représentation schématique de la cascade de la coagulation

PK : prékalikréine ; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire

Une autre voie que celle du FT, appelée voie de contact est capable d'activer le FXI. Cette voie comprend la prékalikréine, le facteur XII (FXII) et le kininogène de haut poids moléculaire

comme cofacteur⁷⁶. L'activation du système de contact est déclenchée par la liaison du FXII à des surfaces chargées négativement (comme le kaolin) ou des activateurs physiologiques comme les acides nucléiques et le collagène, les polyphosphates ou bien encore les bactéries⁷⁶. Le rôle de cette voie dans le processus de coagulation semble mineur puisque le déficit en FXII n'accroît pas le risque hémorragique, ni chez l'animal^{77,78}, ni chez l'homme⁷⁹. En revanche, ces souris présentent un défaut de formation et de stabilisation du thrombus riche en plaquettes⁸⁰. Il a été alors proposé que l'activation de la voie tissulaire par une lésion vasculaire initie la formation du thrombus, celui-ci constituant ensuite une surface propice à l'activation de la voie de contact, cette dernière jouant ainsi un rôle dans le développement et la stabilisation du thrombus⁸¹. Ainsi un déficit sévère en FXII induit un effet protecteur vis-à-vis de la thrombose démontré chez la souris^{82,83}, le rat⁸⁴, le lapin⁸⁵ ou le babouin⁸⁶.

b) La régulation de la coagulation

Le système de la coagulation est finement régulé afin d'empêcher la propagation du caillot en dehors de la zone lésée. De manière non spécifique la dilution des facteurs activés dans la circulation et l'adsorption de la thrombine par la fibrine limitent la génération de thrombine. Parmi les mécanismes plus spécifiques trois principaux systèmes inhibiteurs régulent la coagulation : (i) l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire au niveau de la phase d'initiation, (ii) le système de la protéine C au niveau de la phase d'amplification ou encore (iii) l'antithrombine (AT), inhibiteur des principales enzymes de la coagulation. Il existe d'autres inhibiteurs enzymatiques appartenant à la même famille que celle de l'AT, les Serpines, comme le second cofacteur de l'héparine, l'inhibiteur dépendant de la protéine Z, la protéase nexine-1 et l'inhibiteur de la protéine C1 du complément, ou appartenant à d'autres familles différentes, comme l' α 2 macroglobuline.

La phase d'initiation est régulée par **l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire** (TFPI: *Tissue factor pathway inhibitor*), un inhibiteur enzymatique à 3 domaines types Kunitz. Le TFPI existe sous deux principales isoformes α et β qui résultent d'un épissage alternatif. Le TFPI est synthétisé par les cellules endothéliales principalement de la microcirculation⁸⁷. Ces deux isoformes diffèrent par le domaine Kunitz III absent dans l'isoforme β qui présente à la place un groupement C-terminal « glycosylphosphatidyl inositol » nécessaire pour s'ancrer à la surface des cellules endothéliales. Le TFPI α est aussi capable de se lier à l'endothélium sur les

glycosaminoglycannes (GAGs) grâce à une extrémité C-terminale très basique. Le TFPI limite la génération de thrombine en inhibant le complexe FVIIa-TF. Ainsi, le domaine Kunitz I interagit avec le FXa et le domaine Kunitz II avec le site actif du facteur VIIa, formant ainsi un complexe quaternaire inactif FXa-TFPI-FVIIa-TF⁸⁸. Le TFPI α a joué aussi un rôle dans l'inhibition du FV grâce à son extrémité C-terminale basique⁸⁹.

Le second inhibiteur de la coagulation, l'**antithrombine** (AT) joue un inhibiteur majeur capable d'inhiber différentes serine protéases de la coagulation : la thrombine, le FXa, le FIXa, le FXIa, le FXIIa et le FVIIa⁹⁰. L'AT appartient à la superfamille des Serpines (pour *SERine Protease INhibitors*), et possède à son extrémité C-terminale une boucle réactive vis-à-vis de certaines protéases de la coagulation qui lui permet de former un complexe enzyme-inhibiteur covalent et irréversible. L'activité inhibitrice de l'AT vis-à-vis de la thrombine et d'autres sérine protéases est fortement accélérée en présence d'héparine (jusqu'à un facteur 1000)⁹¹.

Le troisième système inhibiteur physiologique de la coagulation est le **système de la protéine C** qui comprend la protéine C (PC), son cofacteur la protéine S (PS), et deux récepteurs membranaires, le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) et la thrombomoduline (TM) dont il existe des formes solubles⁹². La protéine C circule sous forme de zymogène, qui, une fois activée par la thrombine et la TM principalement acquiert une activité protéolytique vis-à-vis des cofacteurs de la coagulation (Va et VIIIa). La dégradation par la PCa des FVa et FVIIIa ne permet plus aux complexes ténase et prothrombinase de se former, ce qui limite considérablement la génération de thrombine. L'activité catalytique de la PCa est elle-même régulée par deux inhibiteurs de la famille des Serpines majoritairement par l'inhibiteur de la protéine C (PCI : *Protein C inhibitor*) et d'un effet moindre par l' α 1 antitrypsine. La PS est aussi capable d'interagir comme cofacteur du TFPI via son domaine Kunitz III pour accélérer son inhibition du FXa⁹³.

3.2 Le rôle des glycosylations dans l'hémostase primaire

L'hémostase primaire a été peu étudiée dans les CDG bien que les glycoprotéines plaquettaires et le facteur vWF soient riches en chaînes glycaniques. Les glycosylations du vWF ont d'ailleurs été largement étudiées et sont impliquées dans les différentes fonctions de

la protéine que nous détaillerons ci-après. Nous détaillerons également le rôle des glycosylations des glycoprotéines plaquettaires. En particulier l'implication des acides sialiques dans l'élimination des plaquettes de la circulation.

3.2.1 Le rôle des glycosylations sur le facteur von Willebrand

Le vWF est une protéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales et mégacaryocytaires. Comparé au vWF endothélial, le vWF d'origine plaquettaire est minoritaire car il ne représente que 10 à 20% du vWF présent dans un plasma riche en plaquettes⁹⁴⁻⁹⁶. Le vWF est stocké dans les granules alpha plaquettaires et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales sous forme de multimères de très haut poids moléculaires (jusqu'à 60 sous-unités dimériques). Une fois sécrété le vWF est clivé par une métalloprotéase présente dans le plasma, l'ADAMTS13 (*α -disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif*), en multimères de plus petit poids moléculaire (2-40 sous-unités dimériques), de conformation globulaire beaucoup moins adhésive vis-à-vis des plaquettes. Le vWF est très riche en glycosylations (N- et O- glycosylations) représentant 20% de la masse monomérique de la protéine. L'étude en spectrométrie de masse du vWF plasmatique révèle l'occupation de 12 sites de N-glycosylation répartis sur l'ensemble du monomère par des structures glycaniques majoritairement complexes et particulièrement riche en acides sialiques terminaux puisqu'elles renferment 80% de l'acide sialique total de la protéine^{97,98} (**Figure 15**). En plus de ces nombreuses N-glycosylations, le vWF possède 10 sites de O-glycosylations regroupés autour du domaine A1 (domaine de liaison à la GPIIb) de la protéine⁹⁹.

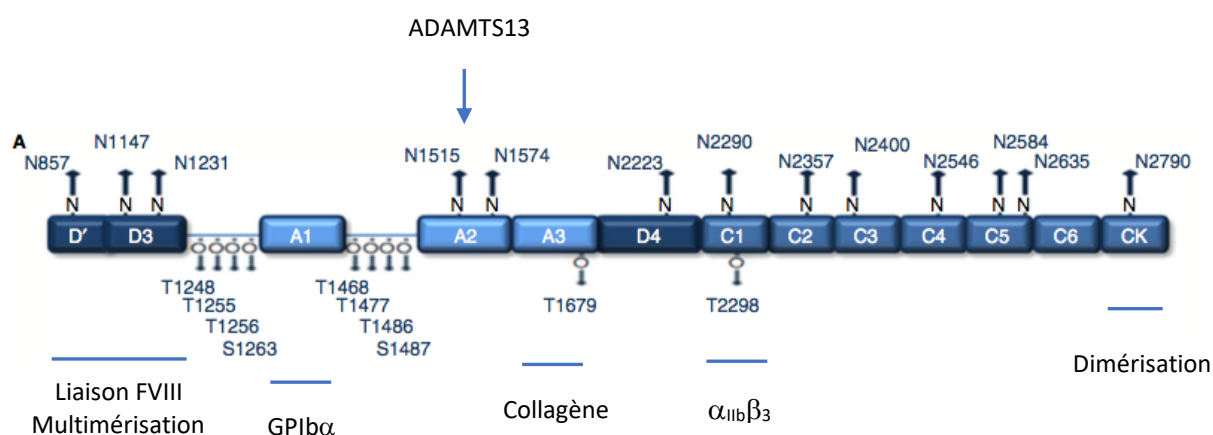


Figure 15 : *Structure du facteur Willebrand mature et ses glycosylations*

Les sites de N-glycosylation sont répartis sur l'ensemble de la protéine tandis que les O-glycosylations sont regroupés autour du domaine A1. Les interactions avec les glycoprotéines plaquettaires, le FVIII ou le collagène sont mentionnées sur le schéma, de même que les domaines importants pour la dimérisation/multimérisation de la protéine. D'après Ward et al, JTH 2019¹⁰⁰

Il est intéressant de noter que le profil de glycosylation du vWF présente une grande hétérogénéité physiologique. En effet, chez des individus sains, l'étude du profil de glycosylation du vWF plasmatique à l'aide d'un panel de lectines révèle une importante hétérogénéité des structures N- et O-glycanniques¹⁰¹. Par ailleurs, le contenu en acide sialique du vWF diffère selon le lieu de synthèse de la protéine. Le vWF plaquettaire est en effet 2 fois moins riche en acides sialiques totaux que le vWF plasmatique¹⁰² en raison d'une réduction spécifique des acides sialiques terminaux des chaînes N-glycanniques⁹⁶. De plus, le contenu en acide sialique varie au cours du temps. La reconnaissance par la lectine *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) des acides sialiques terminaux reliés en alpha(2-6) est plus importante lorsque le vWF est fraîchement sécrété à partir des cellules endothéliales par rapport au vWF basal circulant¹⁰¹. La diminution du contenu en acide sialique du vWF participerait donc au vieillissement de la protéine et à son élimination.

La glycosylation du vWF intervient aussi dans différentes fonctions de la protéine. D'une part, les N-glycosylations sont impliquées dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion du vWF. McKinnon et al¹⁰³ a montré par mutagenèse dirigée que l'absence de glycosylation en

position 99, 857, ou 2790 entraîne une diminution de la sécrétion de la protéine par rétention dans le RE et défaut de stockage des cellules HEK293T. D'autre part la glycosylation et la régulation du pH, toutes deux pouvant être impactées dans les CDG sont nécessaires au processus de multimérisation du vWF. En effet, le blocage de la N-glycosylation par la tunicamycine ou une alcalinisation du milieu limite la dimérisation du vWF¹⁰⁴.

Quant aux acides sialiques, dont 80% se trouvent dans les N-glycosylations du vWF, leur rôle a largement été étudié. Ces acides sialiques terminaux jouent un rôle dans l'adhésion du vWF à la GPIb plaquettaire et au collagène. En effet, le clivage des acides sialiques terminaux du vWF par la neuraminidase induit une agrégation spontanée des plaquettes et une meilleure adhésion au collagène¹⁰⁵. Ces effets sont atténués lorsque les résidus galactose démasqués par le clivage des acides sialiques sont à leur tour clivés. La différence de contenu en acides sialiques entre les vWF plaquettaire et plasmatique s'accompagnent de fonctions distinctes entre les protéines. En effet, comparé au vWF plasmatique, le vWF plaquettaire, pourtant enrichi en multimères de haut poids moléculaire, présente une affinité diminuée pour la GPIb, tandis que l'affinité pour l' $\alpha_{2b}\beta_3$ et l'héparine sera augmentée¹⁰². Les O-glycosylations semblent également jouer un rôle dans l'interaction du vWF avec la GPIb plaquettaire. En effet, l'absence de O-glycosylations diminue la liaison du vWF recombinant à la GPIb et s'accompagne d'un défaut d'agglutination plaquettaire en présence de ristocétine¹⁰⁶.

La présence des acides sialiques terminaux intervient aussi dans la régulation de la protéolyse du vWF. Les acides sialiques terminaux protègent le vWF de l'action de différentes protéases comme la cathepsine B, la trypsine, la chymotrypsine^{98,107} tandis qu'ils favorisent spécifiquement le clivage par l'ADAMTS13, en particulier ceux liés en $\alpha(2-6)$ ⁹⁸. La désialylation des chaînes N-glycanniques observée sur le vWF plaquettaire lui confère donc une résistance à l'ADAMTS13¹⁰⁸. McKinnon et al suggèrent l'implication de la chaîne N-glycannique en position Asn1574 dans cette régulation spécifique de l'ADAMTS13¹⁰⁹. L'ADAMTS13 possède elle-même 10 sites de N-glycosylations impliqués dans la régulation de son activité¹¹⁰.

Enfin, les acides sialiques terminaux régulent également la clairance du vWF en limitant son élimination. Il a d'abord été montré en 1977 que la demi-vie du vWF traité à la neuraminidase puis radiomarké était diminuée (d'un facteur 2 environ) chez le lapin¹¹¹ puis chez le rat¹¹². La même observation est faite chez des souris inactivées pour la sialyl-transférase ST3Gal-IV¹¹³. Alors que les acides sialiques liés au galactose en $\alpha(2-6)$ sont importants pour la susceptibilité

à la protéolyse par l'ADAMTS13, ceux liés en $\alpha(2-3)$, principalement retrouvés sur les chaînes O-glycanniques ont cette fois un rôle majeur dans la régulation de la clairance du vWF⁹⁷. Le rôle des domaines D'-D3, situés à proximité de la région O-glycosylée, a ensuite été mis en évidence dans la protection de la clairance du vWF¹¹⁴.

Le profil de glycosylation du vWF est donc impliqué dans la régulation de son élimination. A ce jour trois voies d'élimination du vWF sont décrites, (i) la voie hépatique par l'intermédiaire du récepteur ASGPR (asialoglycoprotein receptor) qui reconnaît les résidus beta-D-galactose ou N-acetyl-D-galactosamine¹¹⁵ exposés après désialylation, (ii) la voie macrophagique par l'intermédiaire du macrophage-galactose-type-lectine (MGL) récepteur qui lui aussi reconnaît les résidus beta-D-galactose ou N-acetyl-D-galactosamine¹¹⁶ et (iii) par l'intermédiaire d'un autre récepteur macrophagique de la famille des sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Siglec 5), qui, comme son nom l'indique reconnaît le vWF sialylé^{117,118}.

3.2.2 Le rôle des glycosylations sur les glycoprotéines plaquettaires

L'adhésion des plaquettes à l'endothélium se fait d'abord par l'interaction entre la GPIb α et le vWF. La GPIb α (environ 25000 copies par plaquette)¹¹⁹ appartient au complexe GPIb-V-IX constitué de glycoprotéines riche en leucine : GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV de stœchiométrie 2 :4 :2 :1. Le domaine N-terminal de la GPIb α contient deux sites de glycosylation (Asn 21, Asn 159) situés dans la région spiralée, ou le domaine d'interaction avec le vWF. La région appelée macroglycopeptide est particulièrement riche en O-glycosylations (42 sites potentiels). La sous-unité GPIb β ne contient qu'un seul site de N-glycosylation en position 41¹²⁰ (**Figure 16**).

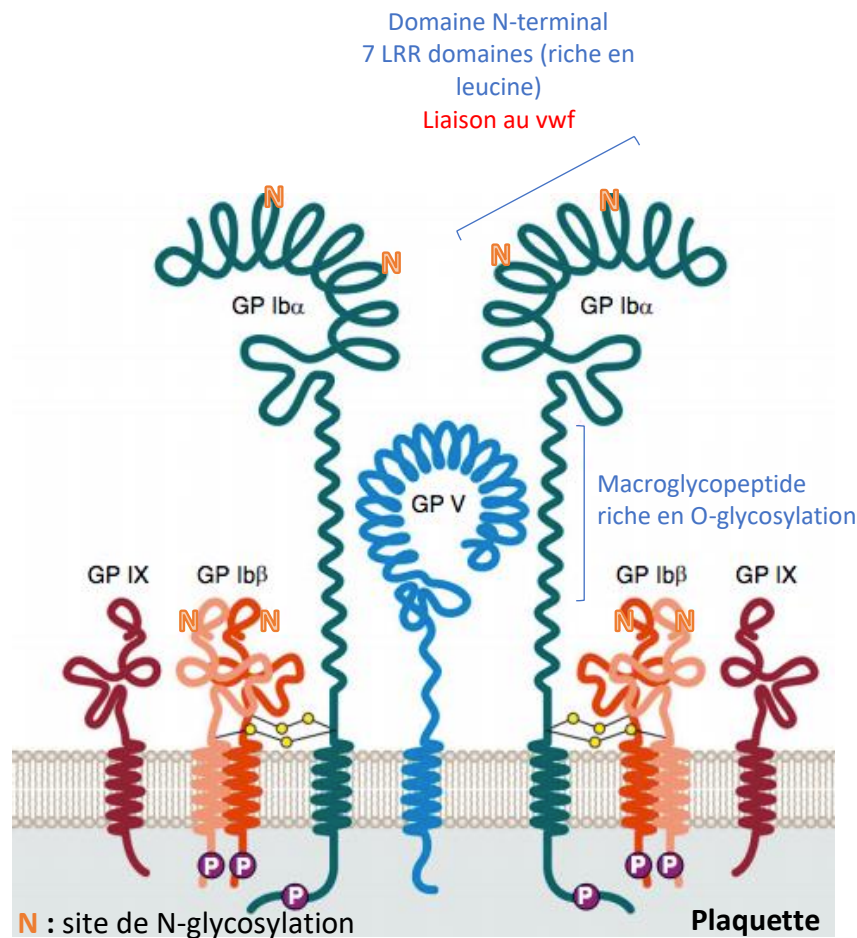


Figure 16 : Représentation schématique du complexe d'adhésion plaquettaire GPIb-V-IX

D'après Rao, Blood 2017¹²¹

Parmi les autres molécules d'adhésion plaquettaire on retrouve les intégrines humaines, toutes porteuses de N-glycosylation à la fois sur la sous-unité α et la sous-unité β . Par exemple l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (environ 70 000 copies/plaquette)¹¹⁹ responsable de l'adhésion au fibrinogène et au vWF porte 11 sites de N-glycosylation (5 sur la sous-unité α_{IIb} et 6 sur la sous-unité β_3) tandis que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (environ 4 000 copies/plaquette)¹¹⁹ qui participe à la liaison au collagène porte 22 sites de N-glycosylation (10 et 12 respectivement sur chacune des sous-unités)¹²². Quant à la GPVI, un seul site de N-glycosylation n'a été identifié, en position 92. Il serait impliqué dans l'adhésion au collagène de type I¹²³.

Le rôle des O-glycosylations plaquettaires a été étudié chez des souris dont les cellules endothéliales et hématopoïétique ont été délétées pour le gène lié à l'X Cosmc codant pour une protéine chaperone indispensable à la O-glycosylation. Lorsque ces souris ne meurent pas

d'hémorragie périnatale, elles présentent un temps de saignement prolongé et une macrothrombopénie. La délétion de *Cosmc* diminue l'expression de GPIb α et favorise la protéolyse d' α_{IIb} et GPVI à l'origine d'une perte d'interaction avec le vWF (via la GPIb α) et le fibrinogène (via α_{IIb})¹²⁴. Ces travaux démontrent également la présence de O-glycannes sur GPVI et α_{IIb} . De plus, le complexe GPIb-V-IX est enchâssé dans des régions précises de la membrane plaquettaire appelées microdomaines, riche en glycosphingolipides. Ces microdomaines jouent un rôle dans l'activation plaquettaire dépendante de GPIb. Par mutagenèse dirigée, Cai et al ont montré que l'absence de N-glycosylations de la sous-unité α_{IIb} pouvaient réduire jusqu'à 50% l'expression membranaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ tandis que les N-glycosylations de la sous-unité β_3 sont impliquées dans l'expression de l'intégrine, son activation et sa liaison avec le fibrinogène¹²².

3.2.3 Les anomalies de l'hémostase primaire rencontrées dans les CDG

Le facteur vWF est généralement exploré devant une symptomatologie hémorragique cutanéomuqueuse inexpliquée ce qui explique que peu de patients atteints de CDG ont été explorés. Parmi les patients explorés, peu d'anomalies du vWF ont été rapportées. Un déficit modéré en vWF est décrit dans un cas de STT3A-CDG présentant 35% d'activité et 21% d'antigène vWF associé à une diminution importante du facteur VIII (6-10%) sans qu'aucune mutation n'aient été retrouvées dans les gènes du vWF ou du FVIII¹²⁵. STT3-CDG est un CDG de type I causé par une mutation dans le gène STT3 codant pour le complexe oligosaccharyltransferase (OST) qui assure, dans le RE, le transfert de l'oligosaccharide Glc₃Man₉GlcNAc₂ du dolichol pyrophosphate sur l'asparagine d'un polypeptide en cours de biosynthèse.

Malgré l'absence de déficit en vWF décrit chez les patients atteints de PMM2-CDG, la répartition des multimères de VWF est cependant anormale et se traduit par une élévation des multimères de haut poids moléculaires¹²⁶.

En ce qui concerne l'exploration plaquettaire, Van Geet et al¹²⁷ décrit en 2001 chez les patients atteints de CDG de type I (PMM2-CDG) et de type II (MGAT2-CDG), tous deux affectant la N-glycosylation, des anomalies de la réactivité des plaquettes. D'abord, le traitement des plaquettes à la neuraminidase entraîne une exposition du galactose réduite chez les patients

PMM2-CDG et nulle chez le patient MGAT2-CDG comparé aux plaquettes normales. Tandis que la réponse plaquettaire aux agonistes standards (ADP, collagène, acide arachidonique et ristocétine) est normale chez un des patients PMM2-CDG, les auteurs mettent cependant en évidence une agrégation spontanée de ses plaquettes¹²⁷. Une analyse protéomique des glycoprotéines plaquettaires révèle plus tard que l'expression de GPIb α et $\alpha_{IIb}\beta_3$ est quantitativement et qualitativement normale¹²⁸. Les auteurs suggèrent ainsi que la diminution du contenu en acide sialique mesurée à la surface des plaquettes n'est pas attribuable à un défaut de glycosylation des glycoprotéines plaquettaires mais à une adsorption des protéines hépatiques anormalement glycosylées à la surface des plaquettes. Enfin un défaut du transporteur spécifique de l'acide sialique *solute carrier family 35 member A1* (SLC35A1) entraîne une augmentation de l'expression du galactose à l'origine d'une élimination accélérée des plaquettes expliquant la thrombopénie observée chez les patients atteints de SLC35A1-CDG¹²⁹. Ces résultats ont d'ailleurs fait l'objet d'une publication de notre équipe (**Annexe III**). En effet le processus de désialylation plaquettaire accélère la vitesse d'élimination des plaquettes de la circulation. Le mécanisme fut identifié grâce à l'étude de la demi-vie en circulation de plaquettes refroidies destinées à la transfusion. Le refroidissement des plaquettes entraîne la libération de sialidases (neuraminidases) à l'origine du clivage des acides sialiques de la GPIb α . De plus, la désialylation de la GPIb α initie le clivage par des métalloprotéinases de GPIb α et GPV¹³⁰. Deux voies d'élimination plaquettaire sont décrites : (i) la voie du récepteur macrophagique $\alpha_M\beta_2$ qui reconnaît les résidus GlcNAc à la surface des molécules de GPIb α dont les N-glycannes sont en cours de synthèse ou partiellement dégradés et (ii) la voie du récepteur Ashwell-Morell (AMR) hépatique qui reconnaît les résidus galactose démasqués après clivage des acides sialiques par les neuraminidases¹³¹.

3.3 Le rôle des glycosylations dans la coagulation

3.3.1 Le rôle des glycosylations sur les protéines de la coagulation

L'ensemble des protéines de la coagulation (à la fois les facteurs procoagulants et les inhibiteurs) possèdent des sites potentiels de N-glycosylations. Certaines protéines possèdent

également des sites potentiels de O-glycosylation comme les facteurs procoagulants VII, IX, X, XII, et les inhibiteurs TFPI et PZ (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Modifications post traductionnelles des facteurs de la coagulation

Protéine	Glycosylations
Récepteur membranaire	
FT	N-glycosylations : Asn124, Asn137
Protéines pro-coagulantes	
<i>Zymogènes de sérine protéase</i>	
FII	N-glycosylations : Asn78, Asn100, Asn373
FVII	N-glycosylations : Asn145, Asn322
	O-glycosylations :(-Glc): Ser52, (-Fuc): Ser60
FIX	N-glycosylations : Asn157, Asn167
	O-glycosylations :(-GalNAc): Thr39, Thr159, Thr169, Thr179, (-Glc): Ser53, (-Fuc): Ser61
FX	N-glycosylations : Asn181, Asn191
	O-glycosylations :(-GalNAc): Thr159, Thr171
FXI	N-glycosylations : Asn72, Asn108, Asn145, Asn432, Asn473
FXII	N-glycosylations : Asn230 et Asn414
	O-glycosylations : (-Fuc): Thr90, (-GalNAc): Thr280, Thr286, Ser289, Thr309, Thr310, Thr318
<i>Cofacteurs</i>	
FV	N-glycosylations : Asn23, Asn27, Asn211, Asn269, Asn354, Asn432, Asn440, Asn526, Asn639, Asn713, Asn724, Asn732, Asn748, Asn754, Asn793, Asn910, Asn949, Asn1046, Asn1055, Asn1075, Asn1078, Asn1175, Asn1193, Asn1229, Asn1238, Asn1265, Asn1283, Asn1310, Asn1319, Asn1347, Asn1356, Asn1451, Asn1471, Asn1531, Asn1675, Asn1982, Asn2181
FVIII	N-glycosylations : Asn41, Asn239, Asn582, Asn757, Asn784, Asn828, Asn900, Asn943, Asn963, Asn1001, Asn1055, Asn1066, Asn1185, Asn1255, Asn1259, Asn1282, Asn1300, Asn1384, Asn1412, Asn1442, Asn1512, Asn1685, Asn1810, Asn2118
PS	N-glycosylations : Asn458, Asn468, Asn489
PZ	N-glycosylations : Asn59, Asn185, Asn193, Asn266, Asn292
	O-glycosylations : (-Glc): Ser53
Inhibiteurs de la coagulation	
TFPI	N-glycosylations : Asn117, Asn167
	O-glycosylations : (-GalNAc): Thr14, Ser174, Thr175
AT	N-glycosylations : Asn96, Asn135, Asn155, Asn192
PC	N-glycosylations : Asn97, Asn248, Asn313, Asn329
ZPI	N-glycosylations : Asn15, Asn159, Asn176, Asn274

Les données de ce tableau ont été recueillies à partir du site Uniprot.org

a) *Le rôle des glycosylations sur les facteurs procoagulants*

Le rôle des glycosylations sur les principales protéines de la coagulation est résumé dans le **tableau 2**.

Pour commencer, le FT est le récepteur membranaire qui initie la coagulation et qui possède 4 sites potentiels de N-glycosylations. La contribution des N-glycosylations du FT est controversée. Il a d'abord été montré que l'activité du FT induite par les endotoxines à la surface des macrophages murins est inhibée en présence de tunicamycine¹³². Puis plusieurs études suggèrent que les glycosylations ne sont pas impliquées dans l'activité du FT^{133–135}. J Krudysz-Amblo et al¹³⁶ montrent que la composition des chaînes glycaniques du FT diffère qu'il soit d'origine recombinante et exprimé par *E. coli*, par les cellules Sf9 d'insectes ou encore d'origine placentaire humaine. Le FT d'origine placentaire est le seul à contenir des acides sialiques (les cellules d'insectes étant incapable de greffer l'acide sialique sur les chaînes carbohydrates) et possède l'activité procoagulante la plus élevée. L'étude des N-glycannes par technique de mutagenèse dirigée ne confirmeront pas leur l'implication ni dans l'expression du FT, ni dans son activité procoagulante^{137,138}.

Plusieurs facteurs de la coagulation sont des zymogènes de sérine protéase dont la synthèse nécessite la présence de vitamine K. Parmi eux, les facteurs VII, IX et X et la protéine C ont une structure commune composée d'un domaine N-terminal riche en acide gamma-carboxyglutamique (Gla) suivi de deux domaines homologue à l'epidermal growth factor (EGF) et d'un domaine serine protéase *trypsin-like* en C-terminal. Dans la structure de la prothrombine, les domaines EGF sont remplacés par deux domaines *kringle*. Enfin, la PS contient 4 domaines EGF et un domaine homologue aux protéines de liaison aux hormones stéroïdes (*Sex Hormone-Binding Globulin* ou SHBG).

La perte des sites de N-glycosylations de la prothrombine entraîne un défaut de sa sécrétion à partir de cellules HEK293 transfectées¹³⁹. Les glycosylations du FVII ont été largement étudiées et celles-ci semblent être impliquées dans la sécrétion, l'affinité vis-à-vis du FT ou encore le transport de la protéine^{140,140,141}.

Les glycosylations du FIX sont impliquées dans l'activité coagulante de la protéine, de tel sorte que la délétion de la région 155-177 (contenant les sites de N-glycosylations) multiplie par 2 l'activité du FIX par rapport à la protéine wild-type¹⁴². La clairance du FIX est également ralentie lorsque les N-glycosylations de la région 155 à 177 sont absentes¹⁴², tandis que le clivage des acides sialiques par la neuraminidase accélère la clairance hépatocytaire chez le rat¹⁴³. Le défaut de glycosylations du FIX peut accélérer son élimination de la circulation^{144,145}. Concernant le FX, le traitement de la protéine par la neuraminidase a d'abord permis de montrer que les acides sialiques sont impliqués dans l'activation du FX par les complexes FT/FVIIa et FIXa/FVIIIa¹⁴⁶. Il a ensuite été démontré que les chaînes N-glycanniques (en particulier celle en position 49 de la chaîne lourde) jouent un rôle critique dans la régulation de l'activation du FX par les facteurs FVIIa et FIXa limitant ainsi la formation de FXa en l'absence de cofacteurs. En effet, en l'absence de cofacteurs, l'activation du variant N49Q par le FVIIa et FIXa est multiplié par 20 et 40 respectivement¹⁴⁷. De plus, les O-glycosylations participent à la spécificité de reconnaissance du FX par le complexe FIXa/FVIIIa puisque l'efficacité catalytique du complexe FIXa/FVIIIa vis-à-vis du FX est réduite de 2 à 5 fois en l'absence de O-glycosylations ou de O- et N- glycosylations¹⁴⁷.

Concernant l'impact des glycosylations sur le FXI, peu de données sont disponibles dans la littérature. McVey et al¹⁴⁸ ont identifié une substitution T475I chez un patient déficitaire en FXI puis généré le variant correspondant. La substitution en position 475 d'une thréonine en isoleucine abolit la séquence consensus de N-glycosylation et entraîne une diminution de la sécrétion du FXI comparé à la protéine wild-type. Cependant la suppression ciblée du site de N-glycosylation en position 473 n'affecte pas la sécrétion de la protéine suggérant un effet direct de la mutation et non un effet de la perte de glycosylation.

A l'interface entre coagulation et inflammation, le FXII est également impliqué dans l'activation de la voie kalikréine-kinine⁷⁶ à l'origine de la formation de bradykinine, un médiateur pro-inflammatoire responsable de vasodilatation, d'augmentation de la perméabilité vasculaire et du recrutement de polynucléaires neutrophiles¹⁴⁹. La bradykinine est le principal médiateur pathologique de l'angioedème héréditaire habituellement causé par un déficit en C1 inhibiteur, le principal inhibiteur des facteurs de la voie contact¹⁵⁰. Un nouveau type d'angioedème héréditaire a émergé ces dernières années grâce à la découverte de mutations sur le FXII à l'origine d'une augmentation de la production de bradykinine¹⁵¹⁻¹⁵³.

Certaines d'entre elles abolissent le site de O-glycosylation en position 309 et induisent chez la souris une augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau de la peau¹⁵⁴.

Les cofacteurs FV et FVIII sont eux aussi homologues et partagent la même organisation en domaines (A1-A2-B-A3-C1-C2), le domaine B étant particulièrement riche en glycosylations. Le FV est sécrété directement sous forme d'une chaîne polypeptidique, tandis que le FVIII doit être clivé au niveau du domaine B dans l'appareil de golgi avant de former un hétérodimère dépendant des ions métalliques qui sera stabilisé par l'interaction avec le vWF. Les chaînes glycaniques du FV sont impliquées dans sa sécrétion¹⁵⁵, son activité procoagulante^{156,157} ou encore son inactivation par la PCA¹⁵⁸. Les N-glycosylations du FVIII sont impliquées dans sa sécrétion¹⁵⁹ et son interaction avec les protéines chaperones¹⁶⁰, d'autant que la reconnaissance des chaînes glycaniques par le récepteur cargo LMAN1 est indispensable à l'export de la protéine du RE¹⁶¹.

Tableau 2 : *Implication des glycosylations dans les fonctions des protéines de la coagulation*

Protéine	Glycosylations/ variants étudiés	Effets	Méthode	Référence
Récepteur membranaire				
FT	rFT (E. coli) ; rFT (cellules Sf9 d'insectes) ; pFT (placentaire humain)	Activité amidolytique du complexe FT/FVIIa la plus élevée pour pFT (le seul à posséder des acides sialiques)	Comparaison du FT exprimé par E. coli, cellules Sf9 d'insectes et dérivé du placenta humain	Krudysz-Amblo et al ¹³⁶
	1-absence de N-glycannes 2-Mutations des Asn 11, 124, 137, 271	1-Pas d'effet sur l'activité et l'expression antigénique 2-Pas d'effet sur l'expression du FT ni sur l'activité procoagulante	1-PBMC et HUVEC traités par la tunicamycine 2-Transfection CHO et HUVEC	Kothari et al ¹³⁷
	N11/124/137A	Pas d'effet sur l'activité procoagulante ni sur l'expression	Infection adenovirale d'HUVEC	Kothari et al ¹³⁸
Facteurs procoagulants				
<i>Zymogène de sérine protéase</i>				
Prothrombine	PT-N416Q	Augmente la liaison à calnexine et Bip et diminue la sécrétion	Mutagenèse dirigée, modèle HEK293	Wang et al ¹³⁹

FVII	S52A ; S60A ; S52/60A	Diminue l'activité coagulante du FVII par perte d'affinité pour le FT	Mutagenèse dirigée	Lino et al ¹⁶²
	N145/322Q-S52/60A	Diminue la sécrétion et favorise la dégradation intra-cellulaire du FVII	Mutagenèse dirigée, modèles COS et CHO	Bolt et al ¹⁴¹
	Présence de résidus GalNAc	Augmente l'affinité pour le FT	Etude de variants de FVII dont la composition des chaînes N-glycanniques différent	Sutkeviciute et al ¹⁴⁰
	N360Q	Bloque l'interaction avec la calnexine et diminue la sécrétion du FVII	Mutagenèse dirigée	Wang et al ¹⁶³
FIX	Délétion 155-177	La délétion augmente l'activité coagulante et diminue la clairance	Mutagenèse dirigée, demi-vie chez la souris	Begbie et al ¹⁴²
	Absence d'acide sialique	Clairance accélérée	Neuraminidase, clairance hépatocytaire chez le rat	Blasko et al ¹⁴³
FX	Absence d'acide sialique	Diminution de l'activation du FX par les complexes FT/FVIIa et FIXa/FVIIIa	Neuraminidase	Sinha et al ¹⁴⁶
	T17A ; T29A ; N49A ; T17/T29A ; T17/T29/N39/N49	Les mutants augmentent de 2 à 40 fois l'activation du FX par le FVIIa ou FIXa indépendamment des cofacteurs (x40 pour N49A) Tous les variants sauf N49A diminuent l'activation du FX par les complexes FT/FVIIa et FIXa/FVIIIa	Mutagenèse dirigée	Yang et al ¹⁴⁷
FXI	T475I	Diminue la sécrétion de la protéine	Mutagenèse dirigée	Mc Vey et al ¹⁴⁸
FXII	T309K	Augmente la perméabilité micro vasculaire	Souris	Björkqvist et al ¹⁵⁴
Cofacteurs				
FV	N2181Q	Augmente l'activité procoagulante à faible concentration de PLs	Mutagenèse dirigée, modèle COS1	Nicolaes et al ¹⁵⁶ , Kim et al ¹⁵⁷
	Absence d'acide sialique et de N-glycannes	Augmente l'inactivation du FV par la PCA	Neuraminidase + N-glycanase	Fernandez et al ¹⁵⁸
FV et FVIII	Absence de N-glycannes	1)Diminue la sécrétion 2)Augmente leurs activités	1)Tunicamycine	Pittman et al ¹⁵⁵

			2)déoxymannojirimycine (inhibiteur de l' α glucosidase) Modèles CHO, HepG2	
FVIII	Absence de N- glycannes	Favorise l'association avec BiP et diminue la sécrétion	Traitement à la tunicamycine	Dorner et al ¹⁵⁹
	Absence de N- glycannes (FVIII domaine B déléété)	Diminue l'interaction avec la calréticuline et la calnexine et la sécrétion	Mutagenèse dirigée, modèle CHO	Pipe et al ¹⁶⁰
Inhibiteurs de la coagulation				
TFPI	TFPI (E. coli)	Diminue l'effet anticoagulant en TGT (lag time moins raccourci)	Comparaison du TFPI déglycosylé (E. coli) au TFPI glycosylé (cellules BHK) en TGT	Brodin et al ¹⁶⁴
AT	hAT	Défaut de sécrétion de l'AT	Modèle cellulaire CHO	Schröder et al ¹⁶⁵
	Acide sialique	Accélère la clairance de l'AT chez le lapin	Traitement par la sialidase chez le lapin	Zettlmeissl et al ¹⁶⁶
	N192Q ; N155Q ; N135Q ; N96Q	Accélère la clairance de l'AT chez le lapin	Mutagenèse dirigée	Ni et al ¹⁶⁷
	N135A	Diminue l'affinité à l'héparine	Mutagenèse dirigée	Turk et al ¹⁶⁸
PC	N97Q N248Q N313Q Absence des glycosylations de la chaîne lourde	Diminue la sécrétion Diminue la maturation de la PC et le clivage du dipeptide Augmente l'activation par le complexe TM/IIa (x2,5) Augmente l'activité anticoagulante (x2-3)	Mutagenèse dirigée	Grinell et al ¹⁶⁹
PS	Asn456 ; Ser460	Augmente l'activité cofacteur Discrète augmentation de l'affinité pour la C4BP	Cellules HEK	Lu et al ¹⁷⁰

Les cellules humaines HEK (Human Embryonic Kidney) possèdent les enzymes α (2-3) et α (2-6) sialyltransférases, tandis que les cellules animales CHO (Chinese Hamster Ovary) sont dépourvues de la seconde.

TGT : test de génération de thrombine ; BHK : Baby Hamster Kidney ; PLs : phospholipides

Pour finir, le fibrinogène, substrat de la thrombine, est synthétisé par le foie sous forme hexamérique $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ dont seules les chaînes β et γ sont N-glycosylées (en position 394 et 78 respectivement) tandis que les trois chaînes peuvent être porteuses de O-glycosylation^{171,172} (Zauner 2012, Adamczyk 2013). Des anomalies de glycosylation et de sialylation du fibrinogène sont décrites chez les patients atteints de cirrhose hépatique ou de carcinome hépato-cellaire¹⁷³. L'étude des protéines sériques en électrophorèse 2D chez des patients atteints de PMM2-CDG révèle la présence d'isoformes anormales du fibrinogène¹⁷⁴ sans que l'activité de la protéine n'en soit affectée puisque la mesure du fibrinogène par technique de coagulation est normale chez ces patients¹⁷⁵.

b) Le rôle des glycosylations sur les inhibiteurs de la coagulation

D'abord, le TFPI existe sous deux isoformes: l'une est soluble (isoforme α), et l'autre est ancrée à la membrane par son ancre GPI (isoforme β). L'activité anticoagulante du TFPI peut être mesurée à l'aide du test de génération de thrombine. En inhibant le complexe FT/FVIIa, le TFPI ralentit l'initiation de la génération de thrombine à l'origine d'un allongement du temps de latence (lag time). L'allongement du temps de latence est diminué lorsque le TFPI n'est pas glycosylé¹⁶⁴ suggérant ainsi que les N-glycosylations sont impliquées dans l'activité anticoagulante du TFPI.

Le second inhibiteur impacté par les glycosylations est l'AT. En effet, l'absence des modifications post traductionnelles nécessaires à un repliement optimal limite la sécrétion de l'AT¹⁷⁶. De plus, il a été montré qu'un traitement de l'AT par la sialidase ou la suppression des sites de N-glycosylation accélère la clairance de la protéine chez le lapin^{166,167}. Outre l'impact sur les taux circulants de l'AT, le défaut de glycosylation peut aussi modifier les fonctions de la protéine. En particulier l'absence de la N-glycosylation en position 135 à l'origine de la forme beta de l'AT accroît son affinité pour l'héparine^{168,177}. Bien que minoritaire en circulation, la forme beta de l'AT serait donc l'inhibiteur majeur *in vivo*.

Enfin, le système de la PC est lui aussi impacté par l'absence de glycosylations. A l'aide d'une étude basée sur de la mutagenèse dirigée, Grinnel et al¹⁶⁹ ont souligné l'importance des N-glycosylations de la PC dans différentes fonctions. L'absence de glycosylation en position 97 de la chaîne légère réduit la sécrétion de la protéine tandis que la mutation de l'Asn en position 248 limite la maturation de la pré-protéine et le clivage du dipeptide. La vitesse d'activation de la PC par le complexe thrombine-TM est quant à elle légèrement accrue (2,5 fois) en l'absence de glycosylation en position 313 comparé à la PC wild-type. Les fonctions de la protéine peuvent aussi être affectées par la perte de glycosylation. L'absence de glycosylation sur la chaîne lourde de la PC augmente son activité anticoagulante d'un facteur 2 à 3. Les glycosylations de la PS, cofacteur de la PC, ont été relativement peu étudiées. La PS possède 3 sites de N-glycosylations impliqués notamment dans l'activité cofacteur de la protéine¹⁷⁰.

3.3.2 Les anomalies de la coagulation rencontrées dans les CDG

Un profil atypique d'anomalies de la coagulation est rapporté chez les patients dès la première description du CDG en 1980. Ces anomalies de la coagulation combinent à la fois des déficits en facteurs procoagulants comme les FXI et FIX mais aussi en inhibiteurs comme l'AT, la PC et la PS. Une revue de la littérature publiée en 2018 permet de recenser des anomalies de la coagulation chez 344 cas de PMM2-CDG⁵⁷. Le déficit en AT, anticoagulant majeur du système de la coagulation, est le plus fréquent avec 157 cas décrits, suivi de près par le FXI et la PC déficitaires dans 125 et 120 cas respectivement. De plus, 40 PMM2-CDG présentent un déficit en PS et seulement 17 ont une diminution du FIX. Les données de cette revue sont concordantes avec celles de la série récente de Schiff et al⁶¹ qui rapporte une baisse de l'AT et de la PC dans 33% et 32% respectivement, tandis qu'un déficit en PS n'est observé que dans 5% des cas. De façon intéressante, alors que les facteurs les plus riches en N-glycosylations sont les FV, FVIII et vWF, ce sont les déficits en AT et en FXI qui sont les plus fréquemment décrits dans les CDG. Ceci peut être expliqué par le rôle majeur du défaut de glycosylation sur la synthèse, la sécrétion ou encore la stabilité de ces protéines dans la circulation.

Le profil de coagulation observé chez les patients PMM2-CDG est atypique puisqu'il se démarque des autres situations cliniques dans lesquelles nous observons des anomalies

combinées de la coagulation comme les atteintes hépatiques, la coagulation intravasculaire disséminée ou encore l'avitaminose K (**Tableau 3**).

Tableau 3 : **Profil de coagulation atypique rencontré dans le PMM2-CDG**

	Avitaminose K	Insuffisance hépatique/CIVD	PMM2-CDG
TP (%)	↓	↓	N
FII (%)	↓	↓	N
FV (%)	Normal	↓	N
FVII (%)	↓	↓	N
FX (%)	↓	↓	N
Fg (g/L)	Normal	↓	Normal
TCK ratio	↑	↑	↑
FVIII (%)	Normal	Normal (↓ si CIVD)	Normal (sauf exception)
FIX (%)	↓	↓	N ou ↓
FXI (%)	Normal	↓	↓
AT (%)	Normal	↓	↓
PC (%)	↓	↓	N ou ↓
PS (%)	↓	↓	N ou ↓

Ce profil atypique est retrouvé dans d'autres types de CDG de type 1 que le PMM2-CDG. Les patients atteints d'ALG6-CDG^{178,179}, ou de MPI-CDG^{59,180–186} présentent un profil de coagulation similaire. Les anomalies de la coagulation se rencontrent également dans les CDG de type II. Medrano et al¹⁸⁷ décrivent une diminution des facteurs FVIII, FIX, FXI, PC et PS chez un patient atteint de B4GALT1-CDG. Un profil assez similaire est retrouvé chez 3 patients TMEM165-CDG avec une diminution des facteurs FVIII, FIX, FXI, et PC¹⁸⁸. L'activité du FVIII, habituellement peu impactée dans les CDG est de 29%, 44%, et 45% chez ces 3 patients. La faible fréquence du déficit en FVIII est surprenante compte tenu de la richesse en N-glycosylation de cette protéine, d'autant qu'elles sont impliquées dans la sécrétion¹⁵⁹, l'interaction avec les protéines chaperonnes calnexine et calreticuline¹⁶⁰ ou encore dans

l'export du RE¹⁶¹. Ceci est peut-être dû en partie au fait que le dosage de FVIII n'est pas réalisé en systématique.

3.3.3 Conséquences cliniques de la coagulopathie observée dans les CDG

Les déficits combinés en facteurs procoagulants (le FXI principalement) et en inhibiteurs de la coagulation (l'AT principalement) caractéristiques de la coagulopathie décrite chez les patients atteints de CDG augmentent le risque hémorragique et thrombotique des patients porteur de cette coagulopathie. Parmi les patients atteints de PMM2-CDG, la prévalence de thrombose varie selon les séries et l'âge des patients. Les séries de Schiff et al⁶¹ et Linssen et al¹⁸⁹ estiment la prévalence de thrombose à 2% et 7% respectivement, alors que la moyenne d'âge est de 12 et 4,6 ans respectivement. La prévalence de thrombose s'élève à 24% dans la série de patients adultes de Monin⁶⁸ et al dont la moyenne d'âge est de 27,4 ans. La revue de la littérature en 2019 retient 12,5% d'évènements thrombotiques chez les patients PMM2-CDG⁵⁷. Artérielle ou veineuse la thrombose peut être spontanée ou déclenchée par une chirurgie ou un cathétérisme¹⁹⁰. Quatre cas de thrombose cérébrale ont également été rapportés dans la littérature⁶¹. Les complications thrombotiques sont communes à d'autres types de CDG que le PMM2-CDG. Des cas de thromboses veineuses profondes^{183,191–193} ou de thromboses cérébrales^{180,194} sont également décrites chez les patients atteints de MPI-CDG. A l'inverse, le risque thrombotique semble plus modéré dans l'ALG6-CDG avec un seul cas décrit dans une série de 41 patients¹⁹⁵. La thrombose peut aussi être de localisation atypique comme la thrombose du territoire splanchnique décrite chez au moins 7 patients porteur de CDG causé par un défaut d'ancre GPI (PIGM-CDG)¹⁹⁶.

Favorisée par le déficit en AT ou PC, la thrombose est parfois même le symptôme révélateur du diagnostic de CDG chez l'enfant¹⁹³ ou chez l'adulte¹⁹⁷.

Moins fréquentes que les thromboses, les manifestations hémorragiques concernent quant à elles 2 à 14% des patients atteints de PMM2-CDG selon les séries^{61,189} pouvant être graves lorsque la localisation est cérébrale (2 cas rapportés dans la série de Schiff et al⁶¹). Dans le cas des patients porteurs de MPI-CDG les hémorragies sont principalement d'origine digestive, secondaires à l'hypertension portale, et la rupture de varices œsophagiennes peut être fatales^{198,199}.

Nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle si la coagulopathie observée chez les patients est impliquée dans la survenue des complications vasculaires de type SL. Pour tenter d'expliquer le mécanisme physiopathologique des SL, de récents travaux suggèrent l'implication des canaux calciques dans la survenue de ces événements semblables à ceux observés dans les cannelopathies familiales²⁰⁰. Malgré l'absence de thrombus mis en évidence par les techniques d'imagerie lors de ces épisodes, le rôle de la coagulation ne peut cependant être exclue. Une seconde hypothèse à laquelle l'état d'hypercoagulabilité pourrait participer est l'hypothèse de la formation de micro-thrombi (non visibles à l'imagerie) à l'origine d'une ischémie transitoire. Ce mécanisme est décrit dans une autre pathologie, la migraine avec aura²⁰¹. Il a en effet été montré dans un modèle murin que l'injection intra-vasculaire de micro-thrombi induisent les ondes lentes de dépolarisation observées dans l'aura migraineuse²⁰².

4. Étude du profil global de coagulation en test de génération de thrombine

4.1 Exploration usuelle des coagulopathies au laboratoire

La coagulopathie observée chez les patients atteints de CDG est complexe et combine des anomalies des systèmes procoagulant et anticoagulant, dont la résultante *in vitro* est difficile à évaluer avec les tests de coagulation standards. Dans un premier temps, les coagulopathies sont explorées à l'aide de test globaux de la coagulation comme le temps de Quick (TQ) et le temps de céphaline activé (TCA) utilisés en routine au laboratoire. Le principe de ces tests repose sur la mesure du temps de coagulation d'un plasma citraté et déplaqué après recalcification en présence de thromboplastine (TQ) ou céphaline (TCA) (**Figure 17**). Le TCA explore donc tous les facteurs de la coagulation sauf le FVII tandis que le TQ peut dépister les déficits en facteurs II, V, VII, X ou fibrinogène. Lorsqu'un des temps de coagulation est allongé, les dosages de facteurs spécifiques sont réalisés. Cependant, ces tests globaux ont leurs limites. Seulement 5% de thrombine générée suffisent à la formation du caillot, les 95% restant n'étant pas exploré par ces tests usuels²⁰³. De plus, l'activité des inhibiteurs de la coagulation (AT, PC, PS) n'est pas explorée par ces tests.

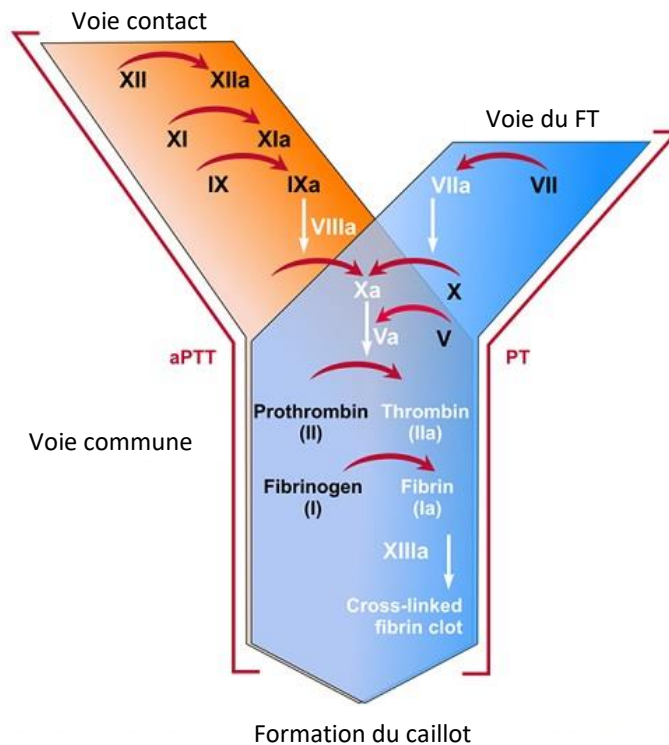


Figure 17 : Exploration de la voie du facteur tissulaire et de la voie contact de la coagulation.

D'après Diapharma®

4.2 Principe de la thrombinographie (ou test de génération de thrombine)

La mesure de la génération de thrombine en temps réel ou thrombinographie s'est imposée comme test de coagulation global intégrant l'ensemble des facteurs de la coagulation et les inhibiteurs physiologiques y compris le système de la PC lorsque de la TM soluble (TMs) est ajoutée au système. Le principe de la thrombinographie repose sur la mesure en continue de la génération de thrombine à l'aide d'un substrat fluorogénique dans un milieu contenant de la fibrine^{204,205} (**Figure 18**). La phase d'initiation correspond au déclenchement de la cascade de la coagulation jusqu'à formation des premières traces de thrombine et de fibrine. La thrombine ainsi formée active les cofacteurs Va et VIIIa qui amplifient la génération de thrombine jusqu'à atteindre un potentiel maximal de thrombine générée. Vient ensuite l'étape d'inhibition lorsque l'AT exerce ses effets inhibiteurs vis-à-vis de la thrombine et du FXa. Le système inhibiteur de la PC, lui, est actif uniquement en présence de TM,

physiologiquement exprimée à la surface de l'endothélium. Lorsque le test de génération de thrombine est réalisé en présence de TM soluble, le système de la PC, alors activé, est capable d'exercer ses effets anticoagulants vis-à-vis des cofacteurs Va et VIIIa limitant ainsi la génération de thrombine²⁰⁶. La durée de la phase d'initiation, le maximum de thrombine générée et le potentiel endogène de thrombine générée sont exprimés à l'aide des paramètres respectifs : lag time ou temps de latence, peak ou pic et ETP (endogenous thrombin potential) ou AUC (aire sous la courbe) (**Figure 18**).

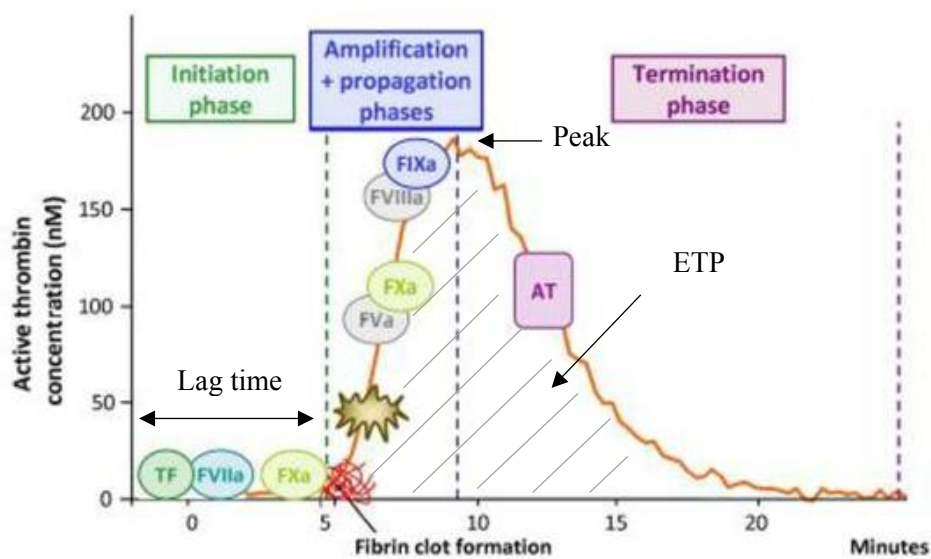


Figure 18 : La génération de thrombine en 3 phases et les principaux paramètres analysés

Adapté de Gerotziafas 2005 ; 11(30), 3855-76

4.3 Les applications du test de génération de thrombine

Le TGT est utilisé dans de nombreuses applications pour dépister à la fois les états hypocoagulables des maladies hémorragiques comme l'hémophilie²⁰⁷⁻²⁰⁹ ou la maladie de Willebrand^{210,211} et les états hypercoagulables des facteurs acquis ou héréditaires prédisposants à la thrombose^{212,213}. Le TGT permet aussi le suivi des traitements anticoagulants²¹⁴⁻²¹⁶ antiagrégants²¹⁷ ou le traitement par des agents hémostatiques²¹⁸⁻²²⁰.

Le TGT a déjà permis d'évaluer la balance hémostatique dans des situations cliniques affectant à la fois les facteurs procoagulants et les inhibiteurs de la coagulation. En effet, en période

néonatale ou en cas de cirrhose, une baisse concomitante des facteurs procoagulants et des inhibiteurs est due à un défaut de synthèse hépatique. Dans ces deux situations le test de génération de thrombine réalisé en l'absence et en présence de TM a permis de montrer que la balance hémostatique n'est pas altérée : la diminution du potentiel de génération de thrombine en l'absence de TM étant contrebalancée par un défaut de mobilisation du système de la PC^{221,222}. Le test de génération de thrombine a également permis de mieux comprendre les coagulopathies rencontrées chez les patients septiques. Dans le sepsis, l'activation très importante de la coagulation, pouvant aboutir à une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD), est due à la présence de pathogènes capables d'entraîner l'exposition du FT²²³. La CIVD est caractérisée par des défaillances viscérales et par un phénomène de consommation des plaquettes et de l'ensemble des protéines de la coagulation incluant les systèmes inhibiteurs AT et PC/PS²²⁴. Malgré un potentiel endogène de thrombine diminué en l'absence de TM^{225,226}, la résistance à une mobilisation du système de la PC observée chez ces patients aboutit à un phénotype hypercoagulant in vitro²²⁶.

Objectif I

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons rappelé que les chaînes glycaniques sont impliquées dans de nombreuses fonctions des protéines et participent au bon développement des mammifères, en particulier du système nerveux central. Le syndrome CDG est un groupe de maladies rares caractérisés par un défaut de glycosylation à l'origine le plus souvent d'un retard du développement psychomoteur et d'une atteinte neurologique. Les patients atteints de ce syndrome peuvent présenter des complications neurologiques aiguës appelées stroke-like (SL), dont le mécanisme physiopathologique n'est pas complètement élucidé, ainsi que des complications vasculaires, le plus souvent thrombotique mais aussi parfois hémorragiques.

De façon intéressante, des anomalies de l'hémostase sont également fréquemment observées chez ces patients. Elles touchent aussi bien des facteurs de la coagulation comme le FXI et le FIX, que des inhibiteurs physiologiques comme l'AT, la PC et la PS, ce qui rend difficile l'évaluation globale de l'équilibre de la coagulation en utilisant des tests conventionnels d'exploration de l'hémostase.

Afin d'évaluer de façon globale l'impact de l'ensemble des anomalies rencontrées chez les patients sur la coagulation nous avons choisi d'utiliser le test de génération de thrombine. L'objectif de cette première partie est donc (i) d'établir le profil de coagulation in vitro des patients atteints de CDG et (ii) de déterminer si parmi les patients qui présentent des antécédents de thrombose ou de SL un profil hypercoagulant se détache.

Article I : Étude du profil de coagulation des patients atteints de CDG par thrombinographie

La file active de patients atteints de CDG connus du centre de référence des maladies métaboliques de l'hôpital Necker-Enfants Malades comprend une trentaine d'enfants. Ces enfants ont un suivi régulier de leurs anomalies de la coagulation, et plus particulièrement lors d'un accident neurologique aigu ou d'une fièvre, ou lorsqu'un geste est programmé. Nous avons pu étudier les anomalies de la coagulation pour 35 patients atteints de CDG, dont 24 sont suivis à l'hôpital Necker, et 11 dans d'autres centres (Caen, Angers en France et Murcia en Espagne).

Nous avons déterminé la fréquence des déficits en facteurs procoagulants et en inhibiteurs dans cette série. Le test de génération de thrombine (TGT) a été centralisé à l'hôpital Necker et réalisé pour les 35 patients. La génération de thrombine a d'abord été mesurée en l'absence de TMs afin d'évaluer l'impact des déficits en facteurs procoagulant et en AT. Puis le TGT a été réalisé en présence de TMs de manière à mobiliser le système inhibiteur de la PC et mesurer aussi l'impact des déficits de ce système.

Nous avons également recueilli rétrospectivement les données relatives aux complications neurologiques et vasculaires de ces 35 patients afin de déterminer le profil de coagulation des patients avec antécédents.

ORIGINAL ARTICLE

Elevated thrombin generation in patients with congenital disorder of glycosylation and combined coagulation factor deficiencies

Tiffany Pascreau^{1,2} | Maria E. de la Morena-Barrio³  | Dominique Lasne^{1,2} | Mercedes Serrano^{4,5} | Elsa Bianchini² | Manoelle Kossorotoff⁶ | Nathalie Boddaert^{7,8} | Arnaud Bruneel⁹ | Nathalie Seta⁹ | Vicente Vicente³ | Pascale de Lonlay¹⁰ | Javier Corral³ | Delphine Borgel^{1,2}

¹Laboratoire d'Hématologie, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants malades, Paris, France

²INSERM UMR-S1176, Le Kremlin-Bicêtre, France

³Servicio de Hematología y Oncología Médica, Centro Regional de Hemodonación, Hospital Universitario Morales Meseguer, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, CIBERER, Murcia, Spain

⁴Department of Pediatric Neurology, Institute of Pediatric Research-Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Center for Biomedical Research on Rare Diseases, Barcelona, Spain

⁵Department of Genetic Medicine, Institute of Pediatric Research-Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Center for Biomedical Research on Rare Diseases, Barcelona, Spain

⁶Paediatric Neurology Department, French Center for Paediatric Stroke, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris, France

⁷Pediatric Radiology Department, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris, France

⁸Institut Imagine, INSERM U1000 and UMR 1163, Paris, France

⁹Biochimie Métabolique, AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

¹⁰Reference Center of Metabolism, Imagine Institute, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Maladies, University Paris-Descartes, Paris, France

Correspondence

Delphine Borgel, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Necker-Enfants malades, 149 rue de Sèvres, F-75743 Paris Cedex 15, France.

Email: delphine.borgel@u-psud.fr

Funding information

This work was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the ERA-NET cofund action, reference: 643578; the Agence Nationale de Recherche (reference: ANR-15RAR3-0004-06 E-RARE-3); the Instituto de Salud Carlos III (reference: PI15/00079, PI18/00598); the European Regional Development Fund (reference: PI14/00512); and Fundación Séneca (reference: 19873/GERM/15). One of the authors of this publication is a member of the European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN; project ID: 739543).

Abstract

Background: Congenital disorders of glycosylation are rare inherited diseases affecting many different proteins. The lack of glycosylation notably affects the hemostatic system and leads to deficiencies of both procoagulant and anticoagulant factors.

Objective: To assess the hemostatic balance in patients with multiple coagulation disorders by using a thrombin generation assay.

Method: We performed conventional coagulation assays and a thrombin generation assay on samples from patients with congenital disorder of glycosylation. The thrombin generation assay was performed before and after activation of the protein C system by the addition of soluble thrombomodulin.

Results: A total of 35 patients were included: 71% and 57% had low antithrombin and factor XI levels, respectively. Protein C and protein S levels were abnormally low in 29% and 26% of the patients, respectively, whereas only 11% displayed low factor IX levels. Under baseline conditions, the thrombin generation assay revealed a significantly higher endogenous thrombin potential and thrombin peak in patients, relative

to controls. After spiking with thrombomodulin, we observed impaired involvement of the protein C system. Hence, 54% of patients displayed a hypercoagulant phenotype in vitro. All the patients with a history of stroke-like episodes or thrombosis displayed this hypercoagulant phenotype.

Conclusion: A thrombin generation assay revealed a hypercoagulant in vitro phenotype under baseline condition; this was accentuated by impaired involvement of the protein C system. This procoagulant phenotype may thus reflect the risk of severe vascular complications. Further research will have to determine whether the thrombin generation assay is predictive of vascular events.

KEYWORDS

coagulation disorder, congenital disorder of glycosylation, thrombin generation assay

1 | INTRODUCTION

Hemostasis is a physiological process that maintains blood flow and prevents blood loss (through clot formation) following vascular injury. Many coagulation proteins are involved in clot formation, and a deficiency in any one of them may lead to bleeding. Extension of the clot is regulated by physiological inhibitors, which may cause thrombosis if they are lacking or altered. The final result is a tightly regulated balance between procoagulant and anticoagulant factors.¹ The impairment of a single coagulation protein—usually resulting from mutation of the coding gene—may disrupt the hemostatic balance and thus lead to bleeding or thrombosis. On one hand, hemophilia is characterized by a lack in procoagulant factors VIII (FVIII) or IX (FIX), and results in severe bleeding.² On the other, a deficiency in antithrombin (AT), a key endogenous coagulation inhibitor, and the first thrombophilic risk factor to be discovered in humans, leads to thrombosis. Since the discovery of AT, procoagulant states resulting from impairment of the protein C (PC) system have been identified.³ Some contexts (such as cirrhosis, the neonatal period, and disseminated intravascular coagulation) produce a combination of protein deficiencies that affect both procoagulant and anticoagulant factors.^{4,5} A lesser known etiology for combined impairments of coagulation proteins is ascribed to congenital disorders of glycosylation (CDG), a large group of rare inherited diseases. To date, around 100 different CDG have been identified. Because of the importance of the glycosylation process for the function of many proteins, impaired glycosylation results in broad multisystem clinical manifestations. The most frequent CDG is phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG).⁶ The clinical symptoms of PMM2-CDG may include failure to thrive, developmental delay, cerebellar ataxia, strabismus, skeletal findings, and cardiac or renal involvement.⁷ Coagulation factors, most of which are glycoproteins, are also frequently affected in CDG. Interestingly, patients with CDG may have a coagulation pattern that does not correspond to hepatocellular failure, factor consumption, or vitamin K deficiency. Indeed, low levels of both clotting factors (FIX and FXI) and coagulation inhibitors (especially AT, PC

Essentials

- Factor XI and antithrombin are mainly affected in congenital disorders of glycosylation.
- We assessed the hemostatic balance using thrombin generation assay.
- We evidenced a hypercoagulant phenotype in vitro in most patients.
- Patients with a history of stroke-like episodes or thrombosis displayed the hypercoagulant state.

and protein S [PS]) are usually reported in the literature.^{7–10} Primary hemostasis might also be affected in patients with CDG; there is evidence of thrombocytopenia related to SLC35A1-CDG (a form affecting a specific sialic acid transporter¹¹) or the enhancement of platelet aggregation in PMM2-CDG¹² even though the platelet N-glycoproteins appear to be normal.¹³ In childhood, PMM2-CDG is marked by acute neurologic impairments mimicking stroke; these are commonly referred to as stroke-like episodes. The episodes occur mainly during periods of fever or after head trauma, and are often revealed by confusional state, focal neurological deficit with mono- or hemiparesis, and sometimes, epileptic seizures.^{7,14} The hemostatic system's role in the pathophysiology of stroke-like episodes has not yet been characterized. During the first 72 hours of a stroke-like episode, magnetic resonance imaging may reveal vasogenic edema that is not restricted to arterial territories^{14–16}; in contrast, ischemic occlusion is rarely observed.¹⁷ Stroke-like episodes may affect up to 50% of patients with PMM2-CDG.⁷ Thrombosis and hemorrhages are also reported in CDG, but are less frequent than stroke-like episodes.^{7,16,18,19} Because of multiple coagulation abnormalities affecting both procoagulant and anticoagulant factors, the hemostatic balance is difficult to assess in vivo. Hemostatic balance is usually investigated by overall coagulation tests, such as the prothrombin time and the activated partial thromboplastin time; however, these tests have limitations. First, they explore only 5% of the total thrombin

potential (i.e., just enough to clot the plasma).²⁰ Furthermore, the overall coagulation tests are not sensitive to coagulation inhibitors in general and the PC system in particular (which cannot be activated in the absence of soluble thrombomodulin [sTM]). The thrombin generation assay (TGA) probes the whole thrombin formation process—from generation to inhibition—and thus takes account of both clotting factors and clotting inhibitors.^{20,21} By combining different analytical conditions, all the anticoagulant systems can be investigated (i.e., the AT system under baseline conditions and the PC system in the presence of sTM).²² Although the TGA has been used to study the coagulation balance in patients with cirrhosis,²³ in neonates,^{24,25} and in patients with sepsis,²⁶ it has not previously been applied (in the presence and absence of sTM) to studies of patients with CDG.

2 | METHOD

2.1 | Study populations

Thirty-five patients with confirmed CDG were enrolled in this retrospective, multicenter study between 2010 and 2017. Patients being treated with anticoagulants were excluded from the study. Samples from 35 control subjects were also collected during consultations before minor surgery. Control subjects with known coagulation abnormalities or taking anticoagulants were excluded. The study was approved by the local investigational review board (Necker Children's Hospital, Paris, France; reference: 2018-TP-4). Patients were provided with study information and gave their consent to participation.

2.2 | Standard coagulation assays

Samples were collected in vacuum tubes containing 0.109 mol/L sodium citrate. Platelet-poor plasma was obtained after two cycles of centrifugation at 20°C for 15 minutes at 2000 × *g* (to achieve a platelet count <10 × 10⁹/L), and then stored at −80°C. Standard coagulation tests were performed using the ACL TOP analyzer (Instrumentation Laboratory). Levels of FIX and FXI activity were measured in a clotting-based assay using lyophilized, deficient plasma from Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics SAS) or Werfen (Instrumentation Laboratory). AT activity was determined using a chromogenic assay (Stachrom® ATIII, Diagnostica Stago SAS). PC and PS anticoagulant activities were determined in specific clotting-based assays (Staclo® PC and Staclo® PS, respectively; Diagnostica Stago SAS). The results were interpreted according to the age-appropriate reference interval for each assay.⁵

2.3 | The thrombin generation assay

To standardize the results as much as possible, the TGA was solely performed in the central laboratory at Necker Children's Hospital, using the calibrated, automated thrombogram method.²⁷ Samples were mixed with PPP reagent® (tissue factor: 5 pmol/L; phospholipids:

4 μmol/L) (Diagnostica Stago) in a 96-well plate (Immulon, 2HB clear U-bottom; Thermo Fisher Scientific). All samples were run in duplicate. Coagulation was triggered with calcium chloride in buffer containing the fluorogenic substrate (FluCa-kit reagent®, Diagnostica Stago). For each individual plasma sample, we used a thrombin calibrator (Diagnostica Stago) to correct for differences in sample color, inner filter fluorescence, and substrate consumption. Fluorescence was recorded for 60 minutes in a Fluoroskan Ascent microplate fluorimeter (Thermolab Systems), and the data were then analyzed using Thrombinoscope™ software (version 5.0.0.742; Diagnostica Stago). The endogenous thrombin potential (ETP), the thrombin peak, the time to the thrombin peak, and the lag time were recorded for each assay. To assess the impact of the PC system on the TGA result, experiments were also conducted in the presence of recombinant sTM (American Diagnostica) at a final concentration of 7.5 nmol/L. As described by Perrin et al,²⁶ an index "R" was calculated for the TGA parameters (i.e., the value in the presence of sTM divided by the value in the absence of sTM); the closer the ratio is to 1, the weaker the response to the PC system.

2.4 | Statistical analysis

All quantitative variables were expressed as the median (interquartile range). Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Software Inc.). Intergroup comparisons were performed using the Mann-Whitney *U* test. Correlations were determined by calculating Spearman's coefficient. The threshold for statistical significance was set to *P* < 0.05.

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the study populations

Thirty-five patients with confirmed CDG (15 males and 20 females; median age: 10 [4; 14] years) were enrolled in the study (Table 1). The control population comprised 35 volunteers (20 males and 15 females; median age: 8 [2; 14] years). The patient and control group did not differ significantly with regard to age (*P* = .3115). During a retrospective review of the participants' medical records, we found that 10 patients with CDG had a history of stroke-like episodes (*n* = 7), a thrombotic event (*n* = 2) or both (*n* = 1). No major bleeding (defined according to the International Society on Thrombosis and Hemostasis criteria) was reported, although bleeding related to esophageal varices occurred in two patients with mannose phosphate isomerase CDG. None of the blood samples were collected during an acute event.

3.2 | Combined coagulation protein deficiencies in patients with CDG

Given that FIX, FXI, AT, PC, and PS are primarily affected in CDG,^{7–10} we chose to assay these coagulation factors. Indeed, we found that CDG syndrome affected the activity of clotting factors and plasma

TABLE 1 Clinical characteristics of patients with CDG, and levels of coagulation proteins

Patient (#)	Age at blood collection (y)	Sex	CDG	PT (%)	aPTT (ratio)	Fibrinogen (g/L)	Factor IX (%)	Factor XI (%)	Antithrombin (%)	Protein C (%)	Protein S (%)	Event
1	10	M	PMM2	98	1.07	2.7	78	95	92	111	89	
2	11	M	PMM2	95	1.02	—	100	98	96	113	123	
3	17	M	PMM2	75	1.31	3.6	97	24	32	27	70	SL/femoral artery thrombosis
4	5	F	PMM2	86	1.26	5.1	91	21	38	68	78	SL
5	10	F	PMM2	92	1.23	2.3	81	31	35	63	38	
6	12	F	PMM2	47	1.11	2.1	71	34	45	24	72	SL
7	13	F	PMM2	98	1.13	2.7	73	48	51	70	86	
8	12	F	PMM2	74	1.14	—	102	94	102	94	101	
9	13	F	PMM2	100	1.04	3.24	92	103	109	85	118	
10	16	F	PMM2	93	1.37	—	68	27	34	41	59	SL
11	8	M	PMM2	108	1.31	3.39	85	32	48	76	42	SL
12	14	M	ALG6	85	1.41	2.6	80	19	43	65	61	
13	12	M	ALG6	87	1.17	—	86	20	43	70	53	
14	18	F	MPI	76	1.25	2.8	73	51	36	56	62	
15	15	F	MPI	103	0.88	2.9	105	140	111	125	101	
16	5	M	PMM2	107	1.09	2.8	74	96	92	116	75	
17	2 m	M	MPI	55	2.19	0.8	19	20	20	28	36	
18	10	M	MPI	72	1.43	1.6	47	48	87	48	60	Jugular vein thrombosis/bleeding from esophageal varices
19	8	F	PMM2	96	1.41	2.02	68	89	75	100	64	
20	1	M	PMM2	103	0.97	4.0	71	27	17	51	—	SL
21	4	F	PMM2	71	1.30	2.7	81	54	53	70	66	
22	6	F	PMM2	110	1.05	2.1	84	90	100	111	62	
23	1	F	PMM2	90	1.06	3.6	25	25	9	16	46	SL
24	3	M	PMM2	67	0.97	3.3	143	140	40	68	46	
25	21	F	ALG12	—	—	2.6	96	59	50	141	69	NA
26	1	F	PMM2	46	—	1.1	46	38	30	29	112	
27	10	M	PMM2	82	1.08	2.2	103	119	113	73	59	
28	10	M	PMM2	92	1.13	2.1	108	71	49	61	76	Cerebral thrombophlebitis

(Continues)

CDG and a documented history of stroke-like episodes ($n = 7$) or thrombotic events ($n = 2$) or both ($n = 1$) displayed a hypercoagulant phenotype in the TGA. The small number of patients prevented us from performing a 2×2 contingency table analysis.

4 | DISCUSSION

In CDG syndrome, the lack of glycosylation affects many plasma glycoproteins, including hemostatic proteins, which generally contain several glycosylation sites.²⁸ As previously described in the literature on patients with CDG,^{7–10} we observed in our series a characteristic coagulation pattern, with a decrease in both procoagulant and anticoagulant factors. AT and FXI were the main coagulation factors affected, with low levels in, respectively, 71% and 57% of the patients with CDG; this was probably because the lack of glycosylation is known to have a strong impact on the folding, secretion, and/or stability of these proteins.^{29,30} Clearance might also be affected by the glycosylation defect; indeed, sialidase treatment of AT is associated with a significantly shorter *in vivo* half-life in rabbits.³¹ The lack of glycosylation might also affect the coagulation proteins' activity as well as their levels. Indeed, the absence of AT's N-glycan chain at Asn 135 results in a greater affinity for heparin.^{32,33} The PC and PS levels were also low in 29% and 26% of the patients, respectively, whereas only 11% of the patients displayed a FIX deficiency. PC also has four glycosylation sites, which are reportedly involved in the protein's secretion, its activation by the thrombin-TM complex or its anticoagulant activity.³⁴

In the present study, we used an approach to assess the impact of combined deficiencies (affecting both procoagulant and anticoagulant factors) on the hemostatic balance in patients with CDG. The TGA enabled us to assess the entire thrombin formation process (from generation to inhibition), and thus to take account of both clotting factors and coagulation inhibitors. In patients with CDG,

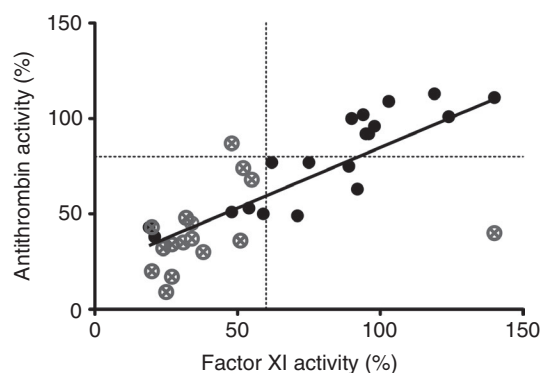


FIGURE 1 Correlation between factor XI (FXI) and antithrombin levels in patients with congenital disorders of glycosylation (CDG). Dashed lines represent the reference interval in children over the age of 6 months (for CDG 17, aged 2 months, the reference interval is $>50\%$ for antithrombin and $>25\%$ for FXI). Patients who also displayed protein C and/or PS deficiencies are represented by gray crossed circles. The correlation between FXI and antithrombin levels was determined using Spearman's rank test

application of the TGA revealed higher levels of thrombin generation (i.e., a significant increase in ETP and the peak) and a shorter lag time and time to peak in patients with CDG, relative to controls. These results attest to a hypercoagulant state *in vitro* under baseline conditions. In order to assess the response to the PC system, we also performed the TGA after spiking with sTM²²; we observed a significant impaired involvement of the PC system. This impairment was probably the result of the protein C deficiency evidenced in 29% of the patients. The lower sensitivity to the PC system in patients accentuated the hypercoagulant phenotype observed at baseline *in vitro*. This approach to characterizing hemostasis (i.e., applying the TGA under baseline conditions and then after activation of the PC system) has already been used to study the coagulation balance in patients with combined coagulation factor deficiencies. Indeed, in clinical settings affecting both procoagulant and anticoagulant factors such as cirrhosis^{23,35} and the neonatal period,²⁵ the results of the TGA suggest that the overall hemostatic balance is not altered: a decrease in thrombin generation is counterbalanced by a decrease in sensitivity to the PC system. This probably explains the low bleeding tendency of patients with cirrhosis other than gastrointestinal bleeding, the pathophysiology of which is mainly related to portal hypertension and therefore leads to esophageal varices, rather than coagulation impairment.³⁶ Similarly, two patients in our series experienced bleeding related to esophageal varices and portal hypertension: a hypercoagulant TGA profile was seen for patient 18, whereas patient 31 had a normal profile. A relatively normal coagulation balance (according to the TGA) has been reported in neonates, despite markedly low levels of vitamin K-dependent coagulation factors.²⁵ In the context of septic shock, and despite a clear impairment of thrombin generation under baseline conditions (probably reflecting consumption coagulopathy), patients are highly resistant to the PC system—leading to an overall procoagulant phenotype *in vitro*.²⁶ Interestingly, the patients with CDG in our series who had experienced stroke-like episodes or thrombosis all displayed a hypercoagulant phenotype *in vitro*. This observation suggests that patients with a disrupted hemostatic balance are more exposed to the occurrence of stroke-like episodes or thrombosis. Furthermore, none of the patients with a normocoagulable phenotype had a history of thrombosis or stroke-like episodes. Despite this hypercoagulant *in vitro* phenotype in patients with CDG, the incidence of thrombosis in our series was low (three cases). We hypothesize that *in vivo* the prothrombotic effect of AT deficiency is counterbalanced by the low level of FXI—as suggested by the strong correlation between AT and FXI levels in our study population. Furthermore, it has been reported that patients with FXI deficiency have a low incidence of thrombotic events.^{37,38} In our series, the patients were more likely to have a history of stroke-like episodes than a history of thrombotic events. In children, the occurrence of stroke-like episodes is not limited to PMM2-CDG syndrome; many disorders (such as migraine, epilepsy, and even tumors) can mimic stroke.³⁹ In patients with PMM2-CDG, the pathophysiology of stroke-like episodes has yet to be characterized. Recently, their similarity with acute events in channelopathy related to familial hemiplegic migraine has offered

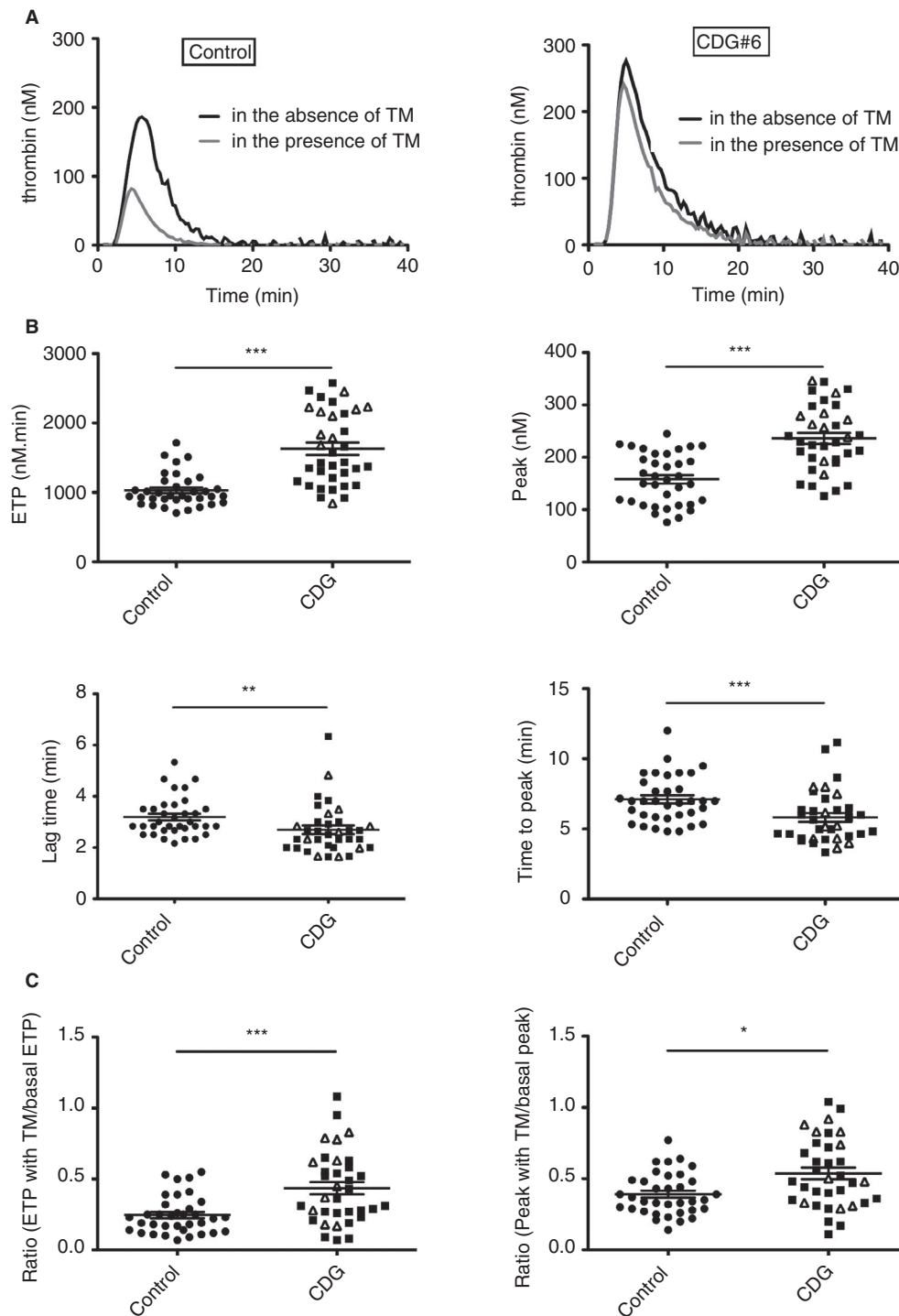


FIGURE 2 Results of the thrombin generation assay. Thrombin generation was performed with PPP reagent® (final concentrations: tissue factor, 5 pmol/L; phospholipids, 4 µmol/L). The endogenous thrombin potential (ETP, nmol/L/min), thrombin peak (peak, nmol/L), lag time (min), and time to peak (min) were recorded. A, Typical thrombograms. Thrombogram obtained in the absence of thrombomodulin (TM; black line) using plasma from controls (left panel). The addition of thrombomodulin (7.5 nmol/L) resulted in a decrease in thrombin generation (gray line) via the activation of protein C. Baseline thrombin generation in patient 6 (right panel) revealed a hypercoagulant profile, relative to controls. After the addition of TM, a hypocoagulant effect was no longer observed (gray line) because of an impairment of protein C. The data are representative of two independent experiments. B, Baseline thrombin generation. Each point corresponds to a study participant, and the mean ± SEM is also shown. Patients with a history of a stroke-like episode or thrombosis are represented by triangles. C, Response to thrombomodulin addition. Results are expressed as the RETP ratio (ETP in the presence of TM/ETP in the absence of TM) and the RPeak ratio (peak in the presence of TM/peak in the absence of TM). Data are presented as the mean ± SEM. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$

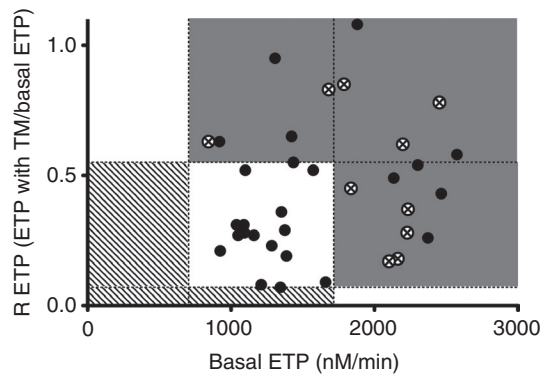


FIGURE 3 Distribution of patients according to their in vitro phenotype in the TGA. The quadrants are defined according to the highest values obtained in controls, delimiting three areas. The white area corresponds to a normal ETP and R index, or both an altered ETP and R index, or a high ETP with low R index (defined as normal coagulation phenotypes). The gray area corresponds to a high R index with a normal or high ETP, or a high ETP with a normal R index (defined as hypercoagulable phenotypes). The hatched area corresponds to an altered ETP with a normal or low R index, or a normal ETP with an altered R index (defined as hypocoagulable phenotypes). Patients with CDG who had a history of stroke-like episodes or thrombosis are illustrated as crossed circles

a research approach.¹⁴ Even though there is no evidence of ischemic occlusion during stroke-like episodes in PMM2-CDG,^{14–16} the hypercoagulability state may still contribute to their development. Indeed, as hypothesized in migraine with aura, the occurrence of a transient ischemic attack cannot be ruled out.^{40,41}

Stroke-like episodes have several reported triggering factors. In particular, hyperthermia may reduce the activity of PMM2 and thus accentuate the glycosylation defects affecting coagulation factors. Indeed, temperature instability of several PMM2 variants has been reported in the literature.⁴² Furthermore, for some AT variants, hyperthermia reportedly induced a conformational change in the protein and transient AT deficiency, leading to an increased risk of thrombosis.^{43,44} Patients with PMM2-CDG and pre-existing coagulation abnormalities appear to be more sensitive to disturbing factors or trauma and thus disseminated intravascular coagulation, as already described during stroke-like episodes or in inflammatory disease.^{17,45} Another case report indicated that surgery is also a critical situation because administration of FXI triggered a serious coagulation imbalance and disseminated intravascular coagulation.⁴⁶ These observations suggest that coagulation protein deficiencies in patients with CDG should be considered as a whole and not in isolation.

Our study had some limitations. In contrast to the purified sTM used in the assay, the patients' abnormally glycosylated TM may be less well secreted or less active. Indeed, the deletion of EGF-like domains 4 and 5 (which contain N-glycan chains) reduces thrombin's binding affinity and its cofactor activity.⁴⁷ Thus, mobilization of the PC system might have been more impaired in vivo in patients with CDG than in vitro. Although the plasma thrombomodulin concentration was higher in patients with CDG than in controls (2.95

[2.24–4.33] vs 2.06 [1.79–2.38] ng/mL, $P = .0009$; Figure S2), it was probably not high enough to counterbalance the procoagulant phenotype observed in the TGA. Indeed, the TM concentration used in the assay is 100 times higher than those measured in plasma. Moreover, antithrombotic effects of human recombinant soluble thrombomodulin was observed at plasma levels ranging from 100 to 1000 ng/mL.^{48,49}

We did not explore the role of the second physiological thrombin inhibitor ($\alpha 2$ -macroglobulin), levels of which are higher in children than in adults. Indeed, levels of $\alpha 2$ -macroglobulin are significantly elevated up to the age of 10 years.⁵⁰ Alpha2-macroglobulin is also highly N-glycosylated, and abnormal isoforms were evidenced in one patient with CDG⁵¹ and thus are possibly involved in the modulation of coagulation in patients with CDG. Furthermore, the TGA was performed on platelet-poor plasma that lacked the other blood cells involved in hemostasis (such as platelets). Last, the TGA is reportedly suitable for detecting an AT deficiency and seems less influenced by FXI. TGA is more sensitive to FXI in the presence of platelets and when the tissue factor concentration is low.^{52–54} In our conditions, when TGA is assessed in platelet-poor plasma with high tissue factor concentration (5 pmol/L), the thrombin generation profile is primarily driven by antithrombin deficiency. However, with low tissue factor concentration (1 pmol/L), an impact of FXI deficiency cannot be ruled out.⁵⁵ In a subset of our patients and age-matched controls, TGA was also performed with low tissue factor concentration (1 pmol/L), and we observed significantly greater in the ETP and the thrombin peak in patients with CDG (Figure S1).

A prospective study will be necessary to determine whether the TGA phenotype predicts the occurrence of vascular events. Even though no stroke-like episodes and/or thrombosis were reported in study participants with no history of coagulation abnormalities, one cannot rule out the occurrence of a coagulation imbalance during a febrile episode or in another situation favoring the accentuation the N-glycosylation defect.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Belén Pérez-Dueñas, Silvia Navarro, Ewa Wypasek, Magalie Barth, Alina Arion, and Eric Bauchart for support with data collection and patient enrollment. Special thanks also go to Caroline Elie and Nelly Briand from the Clinical Research Unit for expert advice on performing the study.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have nothing to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the preparation of the article and met the required conditions for authorship. D. Borgel and J. Corral designed the study. M. Serrano, M. Kossorotoff, and P. De Lonlay

visited patients and collected data. D. Lasne, N. Boddaert, A. Bruneel, N. Seta, and V. Vicente collected data. T. Pascreau performed the assays. T. Pascreau, M. E. de la Morena-Barrio, and E. Bianchini collected, analyzed, and interpreted the data. T. Pascreau and D. Borgel wrote the article. All the authors revised the article for critical content.

ORCID

Maria E. Morena-Barrio  <https://orcid.org/0000-0001-7426-4947>

REFERENCES

- Davidson CJ, Tuddenham EG, McVey JH. 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1487–94.
- Peyvandi F, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood*. 2013;122:3423–31.
- Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:140–56.
- Tripodi A. Liver disease and hemostatic (Dys)function. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41:462–7.
- Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, et al. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost*. 2016;116:9–16.
- Jaeken J, Péanne R. What is new in CDG? *J Inherit Metab Dis*. 2017;40:569–86.
- Schiff M, Roda C, Monin M-L, Arion A, Barth M, Bednarek N, et al. Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *J Med Genet*. 2017;54:843–51.
- Van Geet C, Jaeken J. A unique pattern of coagulation abnormalities in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Pediatr Res*. 1993;33:540–1.
- Stibler H, Holzbach U, Tengborn L, Kristiansson B. Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:118–26.
- Fiumara A, Barone R, Buttitta P, Musso R, Pavone L, Nigro F, et al. Haemostatic studies in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Thromb Haemost*. 1996;76:502–4.
- Kauskot A, Pascreau T, Adam F, Bruneel A, Reperant C, Lourenco-Rodrigues M-D, et al. A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica*. 2018;103:e613–7.
- Geet CV, Jaeken J, Freson K, Lenaerts T, Arnout J, Vermynen J, et al. Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24:477–92.
- de la Morena-Barrio ME, Di Michele M, Lozano ML, Rivera J, Pérez-Dueñas B, Altisent C, et al. Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients. *Thromb Res*. 2014;133:412–7.
- Izquierdo-Serra M, Martínez-Monseny A, López L, Carrillo-García J, Edo A, Ortigoza-Escobar J, et al. Stroke-like episodes and cerebellar syndrome in phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): evidence for hypoglycosylation-driven channelopathy. *Int J Mol Sci*. 2018;19:619.
- Dinopoulos A, Mohamed I, Jones B, Rao S, Franz D, deGrauw T. Radiologic and neurophysiologic aspects of stroke-like episodes in children with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatrics*. 2007;119:e768–72.
- Arnoux JB, Boddaert N, Valayannopoulos V, Romano S, Bahi-Buisson N, Desguerre I, et al. Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol Genet Metab*. 2008;93:444–9.
- Ishikawa N, Tajima G, Ono H, Kobayashi M. Different neuroradiological findings during two stroke-like episodes in a patient with a congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain Dev*. 2009;31:240–3.
- Linssen M, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol Genet Metab*. 2013;109:107–11.
- Tamminga RYJ, Lefeber DJ, Kamps WA, van Spronsen FJ. Recurrent thrombo-embolism in a child with a congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ib and treatment with mannose. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008;25:762–8.
- Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost*. 2003;1:1504–14.
- Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006;96:553–61.
- Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost*. 2006;96:562–7.
- Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, Clerici M, Cazzaniga M, Primignani M, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;41:553–8.
- Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. *Int J Lab Hematol*. 2016;38:66–77.
- Tripodi A, Ramenghi LA, Chantarangkul V, De Carli A, Clerici M, Groppo M, et al. Normal thrombin generation in neonates in spite of prolonged conventional coagulation tests. *Haematologica*. 2008;93:1256–9.
- Perrin J, Charron C, François J-H, Cramer-Bordé E, Lévy B, Borgel D, et al. Coagulation phenotypes in septic shock as evaluated by calibrated automated thrombography. *Shock*. 2015;43:74–9.
- Hemker HC, Giesen P, Dieri RA, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;33:4–15.
- Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2633–48.
- McVey JH, Lal K, Imanaka Y, Kembell-Cook G, Bolton-Maggs PHB, Tuddenham EGD. Characterisation of blood coagulation factor XI T475I. *Thromb Haemost*. 2005;93:1082–8.
- Schröder M, Friedl P. Overexpression of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells results in malformation and decreased secretion of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng*. 1997;53:547–59.
- Zettlmeissl G, Conradt HS, Nimitz M, Karges HE. Characterization of recombinant human antithrombin III synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1989;264:21153–9.
- McCoy AJ, Pei XY, Skinner R, Abrahams JP, Carrell RW. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol*. 2003;326:823–33.
- Türk B, Brieditis I, Bock SC, Olson ST, Björk I. The oligosaccharide side chain on Asn-135 of alpha-antithrombin, absent in beta-antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change. *Biochemistry*. 1997;36:6682–91.
- Grinnell BW, Walls JD, Gerlitz B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J Biol Chem*. 1991;266:9778–85.
- Kremers RMW, Kleinegris M-C, Ninivaggi M, de Laat B, Ten Cate H, Koek GH, et al. Decreased prothrombin conversion and reduced

- thrombin inactivation explain rebalanced thrombin generation in liver cirrhosis. *PLoS One*. 2017;12:e0177020.
36. Sharara AI. Gastroesophageal variceal hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001;345:669–81.
 37. Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood*. 2008;111:4113–7.
 38. Preis M, Hirsch J, Kotler A, Zoabi A, Stein N, Rennert G, et al. Factor XI deficiency is associated with lower risk for cardiovascular and venous thromboembolism events. *Blood*. 2017;129:1210–5.
 39. Shellhaas RA, Smith SE, O'Tool E, Licht DJ, Ichord RN. Mimics of childhood stroke: characteristics of a prospective cohort. *Pediatrics*. 2006;118:704–9.
 40. Tietjen GE, Collins SA. Hypercoagulability and migraine. *Headache*. 2018;58:173–83.
 41. Nozari A, Dilekoz E, Sukhotinsky I, Stein T, Eikermann-Haerter K, Liu C, et al. Microemboli may link spreading depression, migraine aura, and patent foramen ovale. *Ann Neurol*. 2010;67:221–9.
 42. Pirard M, Matthijs G, Heykants L, Schollen E, Grünewald S, Jaeken J, et al. Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett*. 1999;452:319–22.
 43. Corral J, Rivera J, Martínez C, González-Conejero R, Miñano A, Vicente V. Detection of conformational transformation of antithrombin in blood with crossed immunoelectrophoresis: new application for a classical method. *J Lab Clin Med*. 2003;142:298–305.
 44. Corral J, Vicente V, Carrell RW. Thrombosis as a conformational disease. *Haematologica*. 2005;90:238–46.
 45. Iijima K, Murakami F, Nakamura K, Ikawa S, Yuasa I, Motosumi H, et al. Hemostatic studies in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Thromb Res*. 1994;76:193–8.
 46. Meaudre E, Meyrieux V, Suprano I, Camboulives J, Paut O. Anesthesia considerations in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Paediatr Anaesth*. 2005;15:905–6.
 47. Tsiang M, Lentz SR, Sadler JE. Functional domains of membrane-bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/threonine-rich domain are required for cofactor activity. *J Biol Chem*. 1992;267:6164–70.
 48. Moll S, Lindley C, Pescatore S, Morrison D, Tsuruta K, Mohri M, et al. Phase I study of a novel recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1745–51.
 49. Kearon C, Comp P, Douketis J, Royds R, Yamada K, Gent M. Dose-response study of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in the prevention of venous thromboembolism after total hip replacement. *J Thromb Haemost*. 2005;3:962–8.
 50. Kremers R, Wagenvoort R, de Laat H, Monagle P, Hemker H, Ignjatovic V. Low paediatric thrombin generation is caused by an attenuation of prothrombin conversion. *Thromb Haemost*. 2016;115:1090–100.
 51. Richard E, Vega AI, Pérez B, Roche C, Velázquez R, Ugarte M, et al. Congenital disorder of glycosylation Ia: new differentially expressed proteins identified by 2-DE. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379:267–71.
 52. Keularts I, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Béguin S. The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost*. 2001;85:1060–5.
 53. Rugeri L, Quélin F, Chatard B, Mazancourt PD, Negrier C, Dargaud Y. Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk. *Haemophilia*. 2010;16:771–7.
 54. Pike GN, Cumming AM, Hay CRM, Bolton-Maggs PHB, Burthem J. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI deficiency. *Blood*. 2015;126:397–405.
 55. Livnat T, Shenkman B, Martinowitz U, Zivelin A, Dardik R, Tamarin I, et al. The impact of thrombin generation and rotation thromboelastometry on assessment of severity of factor XI deficiency. *Thromb Res*. 2015;136:465–73.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Pascreau T, de la Morena-Barrio ME, Lasne D, et al. Elevated thrombin generation in patients with congenital disorder of glycosylation and combined coagulation factor deficiencies. *J Thromb Haemost*. 2019;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/jth.14559>

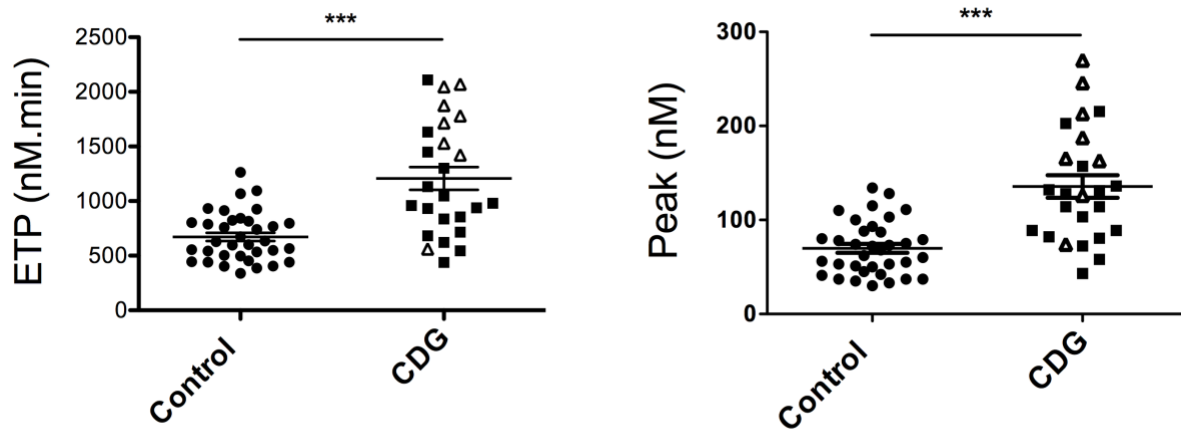


Figure S1: Thrombin generation assay with a low tissue factor concentration

The thrombin generation assay was performed with a low tissue factor concentration (1 pM) and a final phospholipid concentration of 4 μ M. Each point corresponds to a study participant, and the mean $\pm$ SEM is also shown. Patients with a history of a stroke-like episode or thrombosis are represented by triangles.

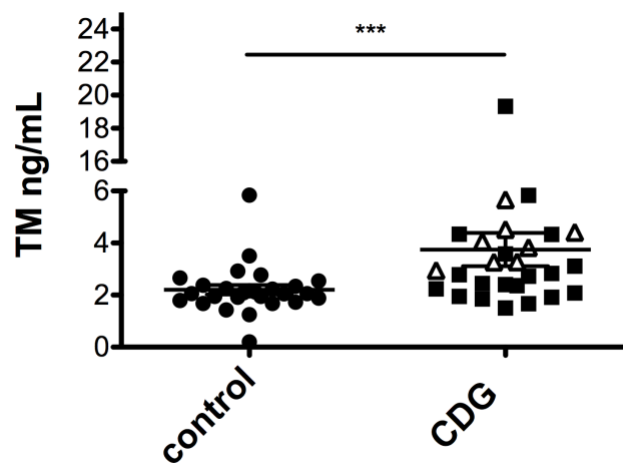


Figure S2: Plasma thrombomodulin concentration in patients

The absolute TM concentration was measured in the patients' plasma using an ELISA (the thrombomodulin/BDCA-3 Duoset kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in ng/mL and compared with controls. Each point corresponds to a study participant, and the mean $\pm$ SEM is also shown. Patients with a history of a stroke-like episode or thrombosis are represented by triangles.

Partie II - Introduction bibliographique

La PC, pouvant être déficitaire chez les patients atteints de CDG, appartient à un système complexe incluant la PC elle-même et plusieurs récepteurs endothéliaux : l'endothelial protein C receptor (EPCR), la thrombomoduline (TM) et les récepteurs PARs (protease activated receptor). L'EPCR et la TM sont nécessaires dans un premier temps à l'activation de la PC, qui, une fois activée exercera ses effets anticoagulants vis-à-vis des cofacteurs de la coagulation. Outre ses effets inhibiteurs sur la génération de thrombine, la PCA est dotée de nombreux effets cellulaires, notamment vasculaires dans lesquels l'EPCR et les récepteurs PARs sont impliqués.

Nous détaillerons le système de la PC, les différents acteurs de ce système et le rôle de leurs glycosylations. Puis nous développerons plus particulièrement les activités anticoagulantes et cellulaires du système de la PC.

1. Le système de la protéine C

1.1 La protéine C

Découverte en 1976 par Johan Stenflo²²⁷, la PC est une glycoprotéine vitamine K dépendante synthétisée par le foie sous la forme d'une pré-pro-protéine, qui, après clivage du peptide signal (Lys-Arg) permet la sécrétion d'une protéine dimérique^{228,229}. La PC circule donc, à faible concentration (70 nM approximativement), principalement sous forme dimérique, 10% de la protéine étant encore sous forme *single chain*. L'hétérodimère mature de la PC est constitué d'une chaîne lourde (d'environ 41 kDa), porteuse du peptide d'activation et du domaine serine protéase, et d'une chaîne légère (d'environ 21 kDa) constituée d'un domaine riche en acide γ -carboxyglutamique (Gla) et de deux domaines EGF-like. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure^{230,231}. Les résidus Gla fixent le calcium et sont nécessaires au bon repliement du domaine permettant ainsi l'interaction avec les phospholipides anioniques membranaires et l'un des récepteurs de la PC, l'EPCR. La PC comporte 4 sites de N-glycosylations, en positions 97 (dans le domaine EGF de la chaîne légère), 248, 313 et 329 (sur la chaîne lourde)¹⁶⁹ (**Figure 19**).

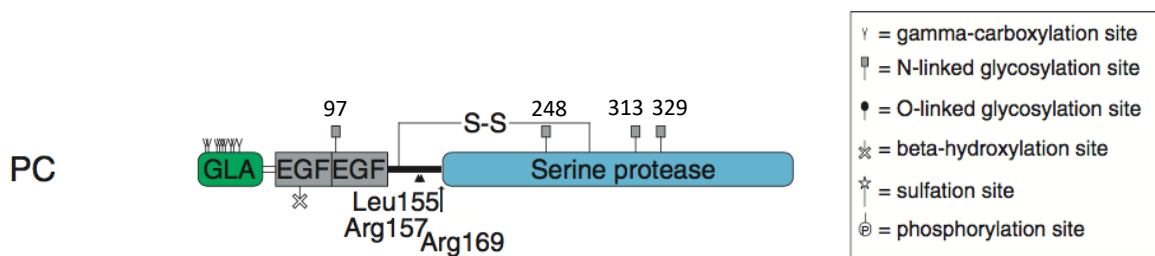


Figure 19 : **Structure de la protéine C**

Leu 155 : site de clivage du dipeptide lors de la maturation de la protéine ; Arg 169 : site du clivage activateur par la thrombine ; Lys156-Arg157 : dipeptide clivé lors de la maturation. D'après Hansson et al²³²

La variabilité du degré de glycosylation de la PC est à l'origine de plusieurs glycoformes en circulation. Les isoformes alpha et beta diffèrent ainsi par leur profil de glycosylation : l'isoforme beta est dépourvue de glycosylation en position 329²³³ (**Figure 20**).

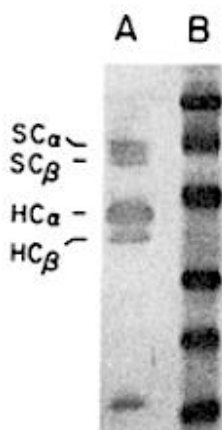


Figure 20 : **Glycoformes de la protéine C humaine en western blot**

Ligne A : PC humaine ; Lignes B: marqueur de poids moléculaire.

SC : single chain ; HC : heavy chain. D'après Miletich²³³

1.2 Les récepteurs du système de la protéine C

La **TM** est une glycoprotéine membranaire sur laquelle se fixe la thrombine qui perd à cette occasion ses propriétés procoagulantes. Le complexe thrombine-TM ainsi formé permet l'activation de la PC en PCA. La TM est exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux

de petits et gros calibres²³⁴ mais circule également sous forme soluble et active dans le plasma²³⁵. La TM est composée d'un domaine lectine-like, de 6 domaines EGF-like et d'un domaine riche en serine/thréonine (**Figure 21**). Le domaine lectine-like est doté d'une activité anti-inflammatoire et anti-angiogénique propre grâce à la reconnaissance de l'épitope Lewis Y exprimé sur le lipopolysaccharide (LPS) bactérien ou le récepteur de l'épidermal growth factor (EGFR)²³⁶. Les domaines EGF-like EGF4, EGF5 et EGF6 sont directement impliqués dans la liaison de la thrombine et l'activité cofacteur de la PC²³⁷. Une fois que le complexe thrombine-TM a permis l'activation de la PCA il est internalisé et la TM est recyclée à la membrane²³⁸.

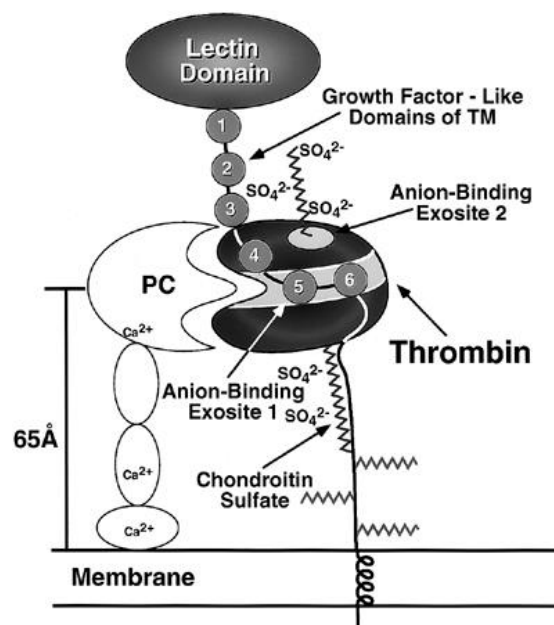


Figure 21 : Structure de la thrombomoduline et domaines d'interaction avec ses ligands

D'après Esmon 1999²³⁹

L'EPCR est un récepteur transmembranaire doté d'un domaine structural homologue avec le complexe d'histocompatibilité de classe 1. La PC se fixe à l'EPCR via son domaine Gla favorisant ainsi son activation par le complexe thrombine-TM. La forte homologie du domaine Gla de la PC avec celui du FVII permet aussi la liaison du FVII/FVIIa à l'EPCR avec une affinité similaire à la PC. La liaison du FVII/VIIa à l'EPCR entraîne une inhibition de l'activité procoagulante du complexe FT/VIIa²⁴⁰. L'EPCR est majoritairement exprimé sur l'endothélium des gros vaisseaux mais il est également faiblement exprimé au niveau de la microvasculature²⁴¹. L'EPCR est aussi

exprimé par de nombreux types cellulaires incluant les monocytes, polynucléaires neutrophiles, cellules musculaires lisses, kératinocytes, cellules trophoblastiques, cardiomyocytes et neurones²⁴². L'EPCR est localisé à la surface des cellules endothéliales principalement au niveau de structures cavéolaires²⁴³. Sous l'action de métalloprotéases, l'EPCR est clivé en une forme soluble qui conserve son affinité vis-à-vis de la PC et de la PCA et inhibe l'activation de la PC par compétition avec l'EPCR membranaire²⁴⁴⁻²⁴⁶. Une faible proportion de récepteurs est aussi localisée dans un compartiment de recyclage intracellulaire. Une fois le ligand fixé sur l'EPCR, celui-ci est internalisé puis recyclé²⁴³.

Le troisième type de récepteur du système de la PC appartient à la famille des récepteurs **PARs** (protease-activated receptor). Les récepteurs PARs sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéine G dont PAR-1 est le chef de file. Les récepteurs PARs sont majoritairement exprimés par les cellules endothéliales, mais aussi par les cellules épithéliales (comme les podocytes), les plaquettes, les cellules immunitaires, les astrocytes et les neurones et sont capables d'induire une signalisation cellulaire en réponse aux protéases de la coagulation, en particulier à la thrombine et à la PCA²⁴⁷. La protéase se fixe sur son récepteur, clive l'extrémité N-terminal, générant ainsi une nouvelle extrémité qui servira de ligand captif capable de se lier au récepteur et d'induire une signalisation intracellulaire. Schématiquement le clivage de PAR-1 par la thrombine induit une signalisation à l'origine d'une augmentation de l'inflammation et de la perméabilité endothéliale, tandis que celle induite par la PCA est protectrice vis-à-vis de la barrière. A la surface des cellules endothéliales 4 récepteurs de la famille des PARs ont été identifiés : PAR-1, PAR-2, PAR-3 et PAR-4²⁴⁸⁻²⁵⁰. La thrombine est capable d'activer tous les PARs excepté PAR-2, qui lui, est spécifiquement activé par les facteurs Xa et VIIa²⁵¹. A l'inverse de PAR-1, PAR-4 requiert des concentrations beaucoup plus élevées de thrombine pour induire une signalisation pro-inflammatoire en raison de l'absence de la séquence *hirudine-like* responsable de l'interaction avec la thrombine²⁵⁰. La PCA, quant à elle est capable d'activer PAR-1, PAR-3 et PAR-4^{250,252,253}.

Dans les cellules endothéliales non stimulées, les récepteurs PAR-1 circulent constitutivement entre la membrane plasmique et le compartiment intracellulaire de manière à constituer un pool de récepteurs cytoplasmique protégé de l'activation par les protéases²⁵⁴. Ainsi lorsque PAR-1 est activé en surface par la thrombine, il sera internalisé puis dégradé dans les lysosomes et de nouveaux récepteurs seront transportés à la membrane, permettant de

sensibiliser à nouveau les cellules à la thrombine par exemple. Ce pool intracellulaire de PAR-1 est absent des plaquettes, qui après activation par la thrombine deviennent insensibles à cet agoniste. Le transport de PAR-2 à la membrane fait lui appel à la mobilisation des récepteurs contenus dans l'appareil de golgi et à la synthèse de novo^{255,256}. Il existe aussi un pool intracellulaire de PAR2. Les mécanismes de régulation du transport cellulaire de PAR-3 et PAR-4 restent à élucider.

1.3 L'activation de la protéine C

La protéine C circule dans le plasma sous forme de zymogène inactif dont l'activation en serine protéase requiert le clivage par la thrombine. La TM présente à la surface de l'endothélium forme un complexe avec la thrombine et accélère considérablement l'activation de la PC par la thrombine (20 000 fois)²⁵⁷. Lorsque la PC est présentée par un second récepteur endothélial, l'EPCR, principalement présent à la surface des vaisseaux de gros calibres²⁵⁸ son activation est encore accélérée d'un facteur 20 fois²⁵⁹ (**Figure 22a**). Une fois activée la PCA est neutralisée par des inhibiteurs de serine protéase comme l'inhibiteur de la PC, l' α 1 antitrypsine ou l' α 2 macroglobuline.

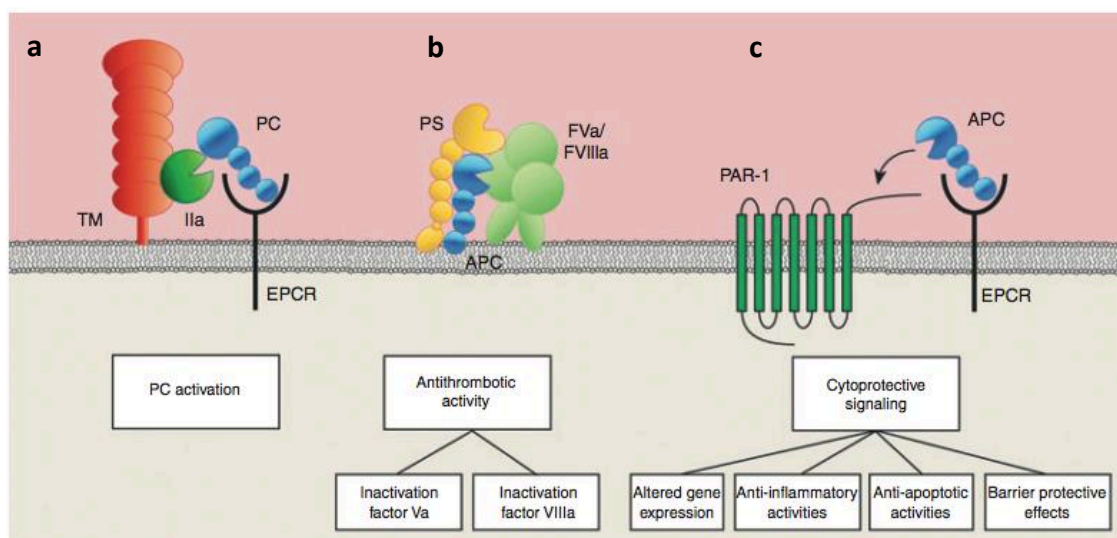


Figure 22 : Les acteurs et les différentes fonctions du système de la protéine C

- (a) La PC est fixée sur son récepteur l'EPCR puis activée par le complexe thrombine-TM préalablement formé.
 (b) Une fois activée et en présence de PS, la PCA exerce ses effets anticoagulants vis-à-vis des cofacteurs de la

coagulation FVa et FVIIIa. **(c)** Toujours fixée sur son récepteur, l'EPCR, la PCA exerce ses effets cellulaires en clivant l'extrémité N-terminale du récepteur PAR-1, induisant une signalisation cellulaire à l'origine des effets anti-apoptotiques, anti-inflammatoire et stabilisateur de barrière. D'après Bouwens et al 2013²⁶⁰

2. Les effets anticoagulant et cellulaires de la protéine C activée

2.1 L'activité anticoagulante de la protéine C activée

La protéine C activée (PCA) exerce ses effets inhibiteurs sur la génération de thrombine par inactivation protéolytique irréversible des cofacteurs Va et VIIIa de la cascade de la coagulation. L'inactivation des FVa et FVIIIa requiert la présence de la protéine S comme cofacteur et du FV (uniquement pour l'inactivation du FVIII) (**Figure 22b**).

A la naissance, comme la plupart des protéines de la coagulation dont la synthèse est hépatique, la PC circule à un taux inférieur à celui des adultes. Le taux des protéines de la coagulation abaissé à la naissance se normalise la première année de vie, excepté la PC qui se normalise parfois tardivement, à l'adolescence²⁶¹. En cas de déficit isolé en PC, la régulation de la génération de thrombine ne se fait plus correctement et les patients sont exposés à des complications thrombotiques. Le déficit génétique en PC est très rare mais les conséquences peuvent être dramatiques. Le déficit homozygote en PC est généralement défini par une activité indétectable et se manifeste dès les premières heures de vie par un *purpura fulminans* et une CIVD²⁶². Les manifestations thrombotiques du déficit hétérozygote en PC sont plus modérées, parfois même absentes.

En dehors des déficits congénitaux, le déficit en PC peut aussi être acquis en contexte infectieux sévère, notamment au cours du sepsis sévère ou du choc septique. En effet une CIVD peut survenir dans ce contexte et entraîner un phénomène de consommation des plaquettes et de l'ensemble des protéines de la coagulation incluant les systèmes inhibiteurs AT et PC/PS²²⁴.

2.2 Les effets cellulaires de la protéine C activée

En plus de ses effets anticoagulants la PCA est dotée d'effets cellulaires qui requièrent la présence des récepteurs PARs dont la signalisation est à l'origine de multiples effets cellulaires protecteurs. La PCA est ainsi capable de moduler l'expression de gènes, d'induire une signalisation anti-inflammatoire, anti-apoptotique ou encore de préserver la barrière endothéliale (**Figure 22c**).

2.2.1 Les effets anti inflammatoires de la protéine C activée

Les effets anti-inflammatoires de la PCA s'exercent d'une part en limitant la libération de cytokines pro-inflammatoires des leucocytes ($\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$) et des cellules endothéliales²⁶³. D'autre part l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (ICAM, VCAM, E-selectine) empêche l'adhésion et la migration des leucocytes. Les effets de la PCA sur l'inhibition des médiateurs pro-inflammatoires à la surface des cellules endothéliales fait intervenir l'EPCR et PAR-1. Bien que le mécanisme d'action de la PCA sur les leucocytes reste à éclaircir, L'EPCR, présent à la surface des monocytes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes natural killer semble jouer un rôle primordial dans cette activité anti-inflammatoire^{264,265}. La PCA a fait ses preuves in vivo dans différents modèles animaux d'inflammation. Chez le rat et l'homme, la PCA limite le recrutement leucocytaire dans un modèle d'inflammation pulmonaire induit par les endotoxines^{266,267}. L'étude du profil transcriptionnel des cellules traitées révèle que la PCA régule l'expression de gènes impliqués dans les voies de l'inflammation. La PCA freine l'expression des gènes pro-inflammatoires en bloquant notamment l'activation des facteurs de transcription c-Fos/FosB et c-Rel des voies pro-inflammatoires activator protein-1 (AP-1) et $\text{NF}\kappa\text{B}$ respectivement²⁶⁵.

2.2.2 Les effets anti-apoptotiques de la protéine C activée

Il existe deux voies principales de signalisation d'apoptose : (i) la voie intrinsèque ou mitochondriale et (ii) la voie extrinsèque initiée par des récepteurs membranaires de mort

cellulaire²⁶⁸. Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases dont le rôle est de digérer les protéines cytoplasmiques et de dégrader l'ADN nucléaire. Les protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x, Bax, Bad...), localisées au niveau des mitochondries, régulent le passage du cytochrome c dans le cytosol. L'hétérodimère Bcl2-Bax est protecteur et prévaut en situation physiologique. En revanche en cas de surexpression de Bax, l'homodimère Bax/Bax davantage formé est à l'origine de la perforation de la membrane mitochondriale et de la libération du cytochrome c, lui-même activateur des caspases.

Pour exercer ses effets anti-apoptotiques la PCA requiert la présence de l'EPCR et PAR-1. Les effets bénéfiques de la PCA sur l'apoptose passent par l'inhibition de la dégradation de l'ADN, de la caspase-3 et de l'exposition de la phosphatidylserine à la surface des cellules. La PCA réduit l'apoptose induite par l'hypoxie sur des cellules endothéliales cérébrales en réprimant l'expression de p53 (inducteur de Bax) et Bax lui-même, tout en maintenant l'expression de Bcl2. Outre son action sur la voie intrinsèque, la PCA est capable de contrebalancer l'action pro-apoptotique du tissu plasminogen activator (t-PA) par la voie extrinsèque sur des cellules endothéliales cérébrales humaines²⁶⁹. L'étude du profil transcriptionnel des cellules traitées révèle que la PCA régule l'expression de gènes impliqués dans les voies de l'apoptose. L'induction de Bcl2 et la suppression de p53 et Bax concourent à l'effet anti-apoptotique de la PCA. La PCA atténue par exemple l'induction de p53 par la thrombine²⁶⁵.

2.2.3 Les effets stabilisateurs de barrière

a) Rappels sur la physiologie des jonctions inter-cellulaires et la signalisation induite par des stimuli stabilisateur ou perturbateur

Les cellules endothéliales tapissent les vaisseaux sanguins et forment une barrière physique entre le compartiment sanguin et les tissus. Les cellules endothéliales contrôlent le passage des solutés, des macromolécules et des cellules du sang vers les tissus. La perméabilité endothéliale est contrôlée par des adhésions cellule-cellule formées par des **jonctions serrées** (*tight junctions*, TJ), des **jonctions adhérentes** (*adherens junctions*, AJ) et d'autres molécules d'adhésion comme PECAM ou les nectines, reliées au cytosquelette par des molécules intermédiaires²⁷⁰. La composition des jonctions varie selon les organes. Les jonctions serrées

incluent les claudines, l'occludine et les molécules d'adhésion jonctionnelle (junctional adhesion molecules, JAMs). Les claudines sont les protéines majoritaires des jonctions serrées. Les claudines et l'occludine sont liées aux zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3 qui permettent l'interaction avec les filaments d'actine. Les claudines régulent le passage des ions et des macromolécules, et les JAMs interviennent plus particulièrement dans la transmigration leucocytaire. La VE-cadherine est la principale protéine des jonctions adhérentes et assure la cohésion des cellules entre elles et maintient la stabilité des jonctions. La VE-cadherine interagit avec le cytosquelette par l'intermédiaire des caténines, de la vinculine et de l' α -actinine. Les jonctions endothéliales peuvent être réorganisées sous l'effet de stimuli extracellulaires.

En contexte inflammatoire, le $\text{TNF}\alpha$, la thrombine ou l'histamine augmentent la perméabilité endothéliale, tandis que des médiateurs anti-inflammatoires comme la sphingosine-1-phosphate (S1P) ou l'angiopoïétine-1 sont capables de réduire la perméabilité²⁷¹. L'augmentation de la perméabilité est liée à une rupture des jonctions adhérentes observée dans différentes situations pathologiques comme le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'hypertension, l'ischémie, l'inflammation²⁷². Dans la malformation caverneuse cérébrale héréditaire ou sporadique, la désorganisation des jonctions endothéliales fragilise les micro vaisseaux et augmente la perméabilité endothéliale pouvant conduire à des accidents hémorragiques²⁷³. Le changement d'état de phosphorylation des protéines de jonctions participe au remodelage du cytosquelette. La thrombine induit par exemple la serine/threonine kinase protein kinase C (PKC) α qui dissocie le complexe de la VE-cadherine en phosphorylant p120. Le $\text{TNF}\alpha$ augmente la perméabilité vasculaire en induisant la phosphorylation de la VE-cadherine. La thrombine et le $\text{TNF}\alpha$ induisent donc une déstabilisation des protéines de jonctions qui conduit à une désorganisation du cytosquelette d'actine auquel elles sont reliées. L'orientation des filaments d'actine normalement parallèle aux protéines de jonctions devient perpendiculaire sous l'effet de ces stimuli. Ces filaments d'actine ainsi positionnés sont appelés fibres de stress car ils exercent une force mécanique conduisant à la rupture des jonctions entre les cellules²⁷⁰. L'activation de la voie de signalisation Ras homolog gene family member A/Receptor for activated C kinase (RhoA/ROCK) est nécessaire à l'augmentation de la perméabilité induite par la thrombine ou le $\text{TNF}\alpha$. A l'inverse les stimuli qui préservent l'intégrité de la barrière endothéliale font

intervenir les GTPases Ras-related protein-1 (Rap1), Ras related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) et Cell division control protein 42 (Cdc42). Ces deux voies de signalisation sont interconnectées puisque la thrombine, par exemple, augmente d'abord la perméabilité induite par RhoA mais aussi la production de S1P permettant d'initier le processus de réparation via Rac1. (**Figure 23**).

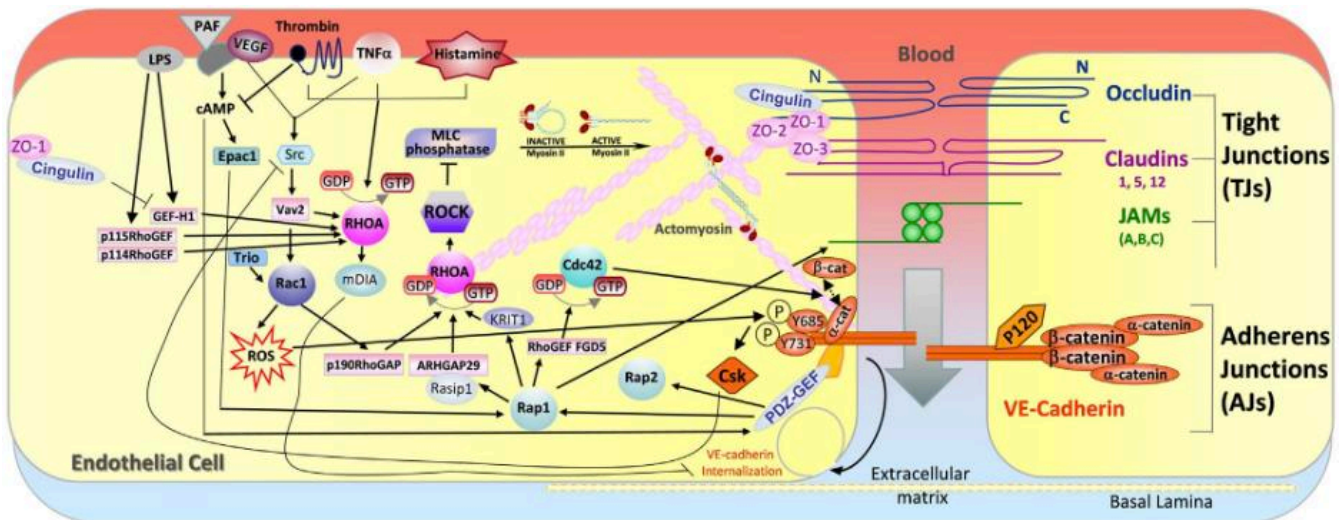


Figure 23 : *Signalisation des molécules pro-inflammatoire à l'origine d'une augmentation de la perméabilité vasculaire*

D'après Cerutti et al 2017²⁷⁰

b) Les effets stabilisateurs de barrière de la protéine C activée

C'est justement la formation de la S1P sous l'action d'une sphingosine kinase (SphK-1) qui est à l'origine des effets protecteurs de barrière de la PCA en présence de l'EPCR (**Figure 24**). L'action de la S1P sur son récepteur S1P₁ entraîne une réduction de la perméabilité endothéliale et stabilise les éléments du cytosquelette qui sont sous la dépendance des protéines GTPase de la famille Rho et des protéines mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Le traitement de cellules endothéliales issues d'artère pulmonaire humaine par la S1P favorise le recrutement de ses propres récepteurs S1P₁ et S1P₃, de p110αPI3K, Rac1,

Tiam1 et de l' α -actinine 1 et 4 qui permettront *in fine* le réarrangement du cytosquelette d'actine F et la stabilisation de barrière²⁷⁴.

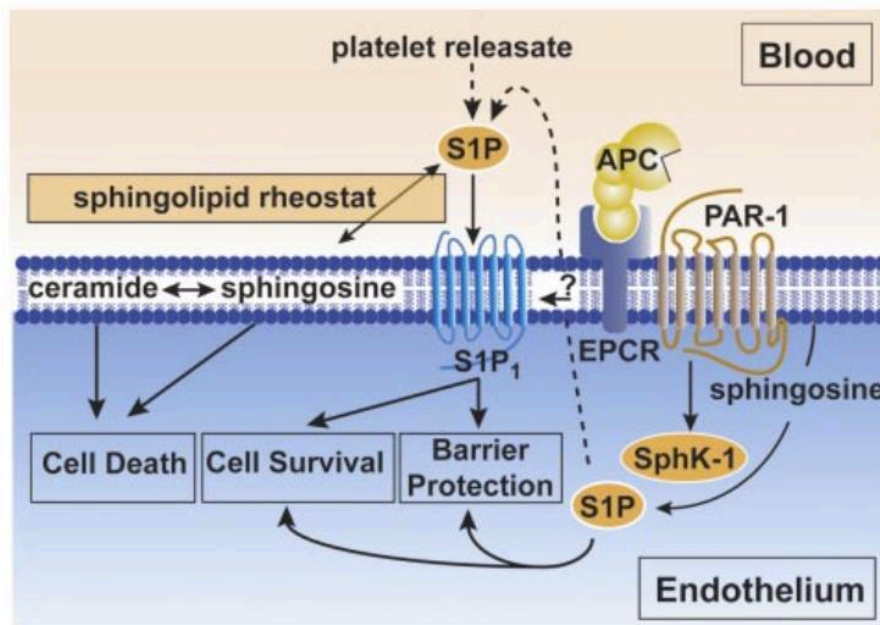


Figure 24 : Effets cytoprotecteurs de la protéine C activée sur la barrière endothéliale

D'après Mosnier et al 2007²⁶⁵

c) Le rôle des PAR's sur la stabilisation de la perméabilité endothéliale

La particularité des récepteurs PARs est de présenter une dualité fonctionnelle se manifestant par une action délétère (dans le cas d'une activation du récepteur par la thrombine) ou par une action protectrice (sous l'action de la PCA) sur un même type cellulaire.

L'action de la thrombine sur PAR-1 déstabilise la barrière endothéliale par déséquilibre de la formation de S1P. L'action pro-inflammatoire et déstabilisatrice de barrière de la thrombine est en effet contrastée par l'effet cytoprotecteur de la PCA. D'une part, la thrombine induit l'activation de RhoA à l'origine des effets délétères sur la barrière, d'autre part la PCA induit l'activation de Rac1, qui elle, induit une stabilisation de la barrière²⁷⁵. Le clivage de l'extrémité N-terminal de PAR-1 par la thrombine après l'arginine en position 41 génère une nouvelle extrémité capable d'induire une signalisation intracellulaire dépendante de RhoA. La découverte du site de clivage non canonique de PAR-1 après l'arginine en position 46 explique

que la PCA induit une signalisation intracellulaire différente de celle induite par la thrombine, cette fois-ci dépendante de Rac1²⁷⁶. Paradoxalement PAR-1 est donc capable d'induire, sur un même type cellulaire, des effets biologiques contraires sous l'action de deux sérine protéases différentes. D'autre part, la localisation conjointe de PAR-1 et de l'EPCR dans les structures cavéolaires de la membrane favorise l'action de la PCA au niveau de ces microdomaines²⁷⁷ (Figure 25).

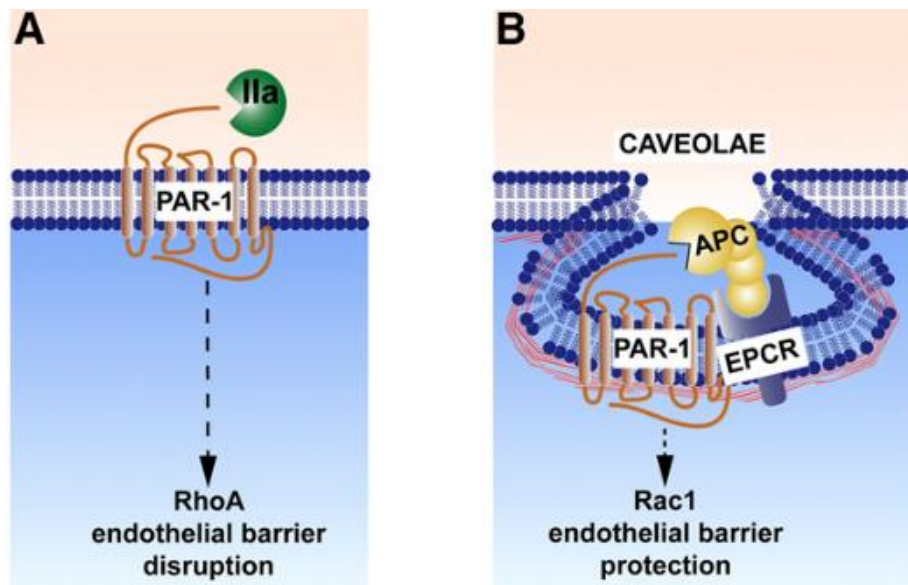


Figure 25 : Localisation de PAR-1 à la membrane

Localisation de PAR-1 en dehors de structure cavéolaire (A) ou au sein des cavéoles (B) favorisant l'action de la PCA fixée sur l'EPCR présent dans ces structures. D'après Griffin et al 2015²⁷⁵

Les cellules endothéliales expriment les 4 récepteurs de la famille des PARs: PAR-1, mais aussi PAR-2, PAR-3 et PAR-4²⁴⁸⁻²⁵⁰. Parmi les autres récepteurs PARs exprimés par les cellules endothéliales, PAR-3 participe également aux effets cytoprotecteurs de la PCA. Ces effets ont également été montrés dans les neurones et les podocytes^{253,278}. Les PARs sont aussi capables d'interagir entre eux afin de moduler la signalisation. Par exemple, l'hétérodimère constitutif PAR-1/PAR-3 potentialise la signalisation de PAR-1 en réponse à la thrombine²⁴⁹. Le fonctionnement des PARs est complexe compte tenu de la possibilité d'activation de plusieurs récepteurs par différentes protéases, de la possibilité d'induire plusieurs signalisations pour un même récepteur et enfin par la possibilité de formation d'homodimères et d'hétérodimères.

3. Le rôle des glycosylations sur le système de la protéine C

3.1 Les rôle des glycosylations sur les récepteurs du système de la protéine C

Les récepteurs du système de la PC sont eux aussi glycosylés. Les O-glycosylations particulièrement nombreuses dans le domaine riche en serine/thréonine de la **TM** sont importantes pour l'affinité à la thrombine et l'activité cofacteur du récepteur. En effet la perte de ce domaine est responsable d'une perte d'affinité à la thrombine et de l'activité cofacteur²³⁷. De plus, les motifs chondroïtine sulfate sont directement impliqués dans l'affinité de la TM pour la thrombine²⁷⁹. En plus des O-glycosylations, la TM possède 5 sites de N-glycosylation, 3 dans le domaine lectin-like et un dans chacun des domaines EGF4 et EGF5^{279,280}. Les domaines EGF4 et EGF5 étant impliqués dans la liaison à la thrombine et l'activité cofacteur de la PC, l'absence de N-glycosylations pourrait avoir un impact sur ces fonctions bien que celles-ci n'aient pas été étudiées spécifiquement.

L'**EPCR** possède 4 sites de N-glycosylations n'apparaissant pas critiques pour la reconnaissance du ligand (PC ou PCA)²⁸¹.

Le récepteur **PAR-1** comporte lui aussi 5 sites de N-glycosylation, 3 d'entre eux sont localisés dans l'extrémité N-terminal, les deux autres sont à la surface de la deuxième boucle extracellulaire. Un travail de Soto et al²⁸² a révélé l'importance des glycosylations en N-terminal pour le transport du récepteur à la membrane, tandis que les glycosylations de la boucle sont impliquées dans l'internalisation du récepteur. De plus, les glycosylations de la boucle extracellulaire régulent la signalisation des protéines G de PAR-1 tel que les mutants réduisent la formation des fibres de stress via RhoA et induisent la prolifération cellulaire²⁸³. En revanche la signalisation induite par la PCa (via la β -arrestine) ne semble pas altérée en absence de glycosylations²⁸³.

3.2 Le rôle des glycosylations sur les effets cellulaires de la protéine C activée

En plus des effets sur l'activité anticoagulante, les glycosylations impactent aussi les effets cellulaires de la PCA. Les effets perturbateurs de la thrombine sur la barrière endothéliale formée par des cellules EAhy.926 sont à l'origine d'une augmentation de la perméabilité et de l'apoptose qui seront atténuées en présence de PCA. En effet, la déglycosylation enzymatique de la PCA entraîne une réduction de la concentration de PCA nécessaire à l'obtention d'un effet protecteur maximal contre les effets délétères de la thrombine. Il s'avère que la glycosylation en position 329 est cruciale pour cette activité puisque le variant N329Q (que l'on peut assimiler à l'isoforme β de la PCA) accroît cette protection de barrière contre les effets de la thrombine d'un facteur 6 et inhibe complètement l'apoptose induite par la staurosporine à une concentration 30 fois moins élevée que la PC wild-type²⁸⁴. De plus les glycosylations de la PCA participent aux effets anti-inflammatoires. En effet, à la surface des macrophages, l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ remplace l'EPCR et sert de corécepteur pour l'activation de PAR-1 par la PCA responsable de l'inhibition de la libération par les macrophages de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL-6 induite par le LPS. La protéolyse de PAR-1 dépendante d' $\alpha_M\beta_2$ est plus efficace en présence du variant N329Q qu'en présence de PC wild-type²⁸⁵.

4. Évaluation thérapeutique de la protéine C activée

Les effets bénéfiques in vivo de la PCA ont été démontrés dans le sepsis chez l'homme et dans de nombreux modèles animaux d'inflammation. En 2001, l'étude phare PROWESS (PROtein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) a montré que l'administration de PCA recombinante humaine (drotrécogine alpha activée ou Xigris®) chez des patients à haut risque réduisait le taux de mortalité du sepsis sévère de 6,1% à 28 jours²⁸⁶. Des études ultérieures n'ont cependant pas confirmé cette réduction de mortalité^{287,288}, ce qui a conduit à l'arrêt de la commercialisation du Xigris® en 2011.

En outre, le rôle de la PC dans l'AVC ischémique a été soulevé depuis les années 90 par l'étude prospective épidémiologique Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) qui révèle que le taux de PC plasmatique est un facteur protecteur²⁸⁹. Les effets anti inflammatoires et neuroprotecteurs de la PCA ont ensuite été mis en évidence dans des modèles animaux

d'ischémie reperfusion cérébrale²⁹⁰⁻²⁹². En particulier, dans des modèles d'AVC chez les rongeurs la PCA contrebalance les effets neurotoxiques directs des agents fibrinolytiques dérivés du t-PA utilisés en thérapeutique²⁶⁹. Enfin, la PCA est capable d'induire la prolifération de cellules endothéliales et l'angiogenèse in vitro et in vivo²⁹³. La PCA participe au processus de réparation cellulaire et facilite la migration et la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de l'induction de cytokines comme l'IL-6, l'IL-8 ou MCP1^{294,295}.

Afin de dissocier l'activité anticoagulante de la PCA qui entraîne des effets délétères par augmentation du risque hémorragique, de ses effets cytoprotecteurs, Mosnier et al ont généré deux variants 3K3A-APC et 229/230-APC dont l'activité anticoagulante est fortement réduite tandis que l'activité anti-apoptotique est accrue 25 fois et 7 fois respectivement par rapport à la PCA wild-type²⁹⁶. L'essai clinique RHAPSODY de phase 2 a récemment montré que l'administration de l'agoniste 3K3A-APC après thrombolyse, thrombectomie ou les deux, réduisait le taux d'hémorragies intracrâniennes de 86,5 à 67,4% dans l'AVC ischémique modéré à sévère²⁹⁷.

Objectifs II

L'endothélium est une interface dynamique entre le sang et les vaisseaux et joue un rôle capital dans le contrôle de l'hémostase et de l'homéostasie des tissus en formant une barrière entre la circulation sanguine et les tissus.

Les patients atteints de CDG présentent des déficits en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (AT, PC et PS) à l'origine d'un déséquilibre de la balance hémostatique vers un profil hypercoagulant. Les protéines C et S appartiennent à un système anticoagulant faisant intervenir des acteurs membranaires localisés à la surface de l'endothélium : la TM et l'EPCR. L'ensemble des composants du système de la PC sont des glycoprotéines dont les fonctions peuvent être impactées par l'absence de chaînes glycaniques. Les méthodes de déglycosylation enzymatique ou de mutagenèse dirigée ont permis d'évaluer le rôle des chaînes glycaniques pour chacun des constituants du système étudié de manière isolée. Afin d'étudier l'impact d'un défaut de glycosylation sur le fonctionnement global du système de la PC nous avons développé un modèle de cellules endothéliales cérébrales inactivées pour l'enzyme la plus fréquemment déficiente dans les CDG, la phosphomannomutase (PMM2).

Article II : Étude de l'endothélium et du système de la protéine C à l'aide d'un modèle de cellules endothéliales cérébrales inactivées pour la phosphomannomutase (PMM2)

A partir d'une lignée de cellules endothéliales issues de la microcirculation cérébrale, hCMEC/D3, nous avons développé un modèle cellulaire inactivé pour l'enzyme PMM2 à l'aide d'une méthode d'interférence par ARN.

A l'aide de ce modèle cellulaire nous avons tout d'abord évalué l'impact d'un défaut de glycosylation sur la capacité d'un endothélium à activer la PC à sa surface. Après quantification de l'expression protéique et des transcrits de PMM2 nous avons quantifié la PCA générée à la surface des cellules inactivées pour l'enzyme. Nous avons ensuite mesuré l'expression des récepteurs impliqués dans l'activation de la PC (TM et EPCR) mais aussi celle de PAR-1, le récepteur impliqué dans les effets cellulaires cytoprotecteurs de la PCA.

De plus, nous avons étudié la capacité de la PCA à stabiliser la barrière endothéliale dans ce modèle cellulaire inactivé pour PMM2. Nous avons ensuite utilisé une méthode de mesure de la résistance trans-endothéliale électrique (TEER) couramment utilisée pour évaluer l'intégrité et la perméabilité des jonctions d'une monocouche de cellules endothéliales. Ainsi nous avons évalué l'intégrité de la barrière formée par les cellules inactivées pour PMM2 à l'état basal. Nous avons également étudié l'effet de la thrombine sur les cellules inactivées préalablement incubées ou non avec de PCA.

Endothelial N-glycosylation deficiency reduced the activation of the protein C system and disrupted the endothelial barrier integrity

Tiffany Pascreau¹, François Saller¹, Elsa Bianchini¹, Dominique Lasne^{1,2}, Arnaud Bruneel³, Christelle Reperant¹, Nathalie Seta³, Pascale De Lonlay⁴, Delphine Borgel^{1,2}

¹INSERM UMR-S1176, Le Kremlin-Bicêtre, France

²Laboratoire d'Hématologie, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants malades, Paris, France

³Biochimie Métabolique, AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

⁴Reference Center of Metabolism, Imagine Institute, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Maladies, University Paris-Descartes

Financial support

This work was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the ERA-NET cofund action, reference: 643578; One of the authors of this publication is a member of the European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN; project ID: 739543).

INTRODUCTION

Glycosylation is the most common post translational modification which occurs in every living cell. A defect in the glycosylation process may be either acquired or congenital. Alcoholic liver disease or infection with neuraminidase-producing microorganisms are well-known etiologies of acquired N-glycosylation defect¹ whereas congenital disorder of glycosylation (CDG) syndrome refers to inherited defect. CDG is a rare syndrome due to genetic defects in the synthesis and attachment of glycoproteins and glycolipids glycans. The most frequent type of CDG is the phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG) representing 62% of diagnosed patients². Phosphomannomutase is a cytosolic enzyme involved in the mannose pathway required for the first steps of the N-glycosylation process³. Due to the importance of the glycosylation process for the function of many proteins, impaired glycosylation results in broad multisystem clinical manifestations. In PMM2-CDG, the neurological impairment is constant and results in developmental delay and cerebellar ataxia. The multivisceral forms also include skeletal findings and cardiac or renal involvement⁴. During periods of fever, patients with PMM2-CDG may develop acute neurologic impairments mimicking stroke; these are commonly referred to as stroke-like episodes. The hemostatic system's role in the pathophysiology of stroke-like episodes has not yet been characterized even though an elevated thrombin generation was observed in patients with a history of stroke-like episode⁵. Thrombosis and hemorrhages are also reported in CDG but are less frequent than stroke-like episodes^{4,6-8}. Coagulation factors, most of which are glycoproteins, are also frequently affected in CDG. Indeed, low levels of both procoagulant factors (FIX and FXI) and inhibitors (especially antithrombin, protein C (PC) and protein S) are usually reported in the literature^{4,9-11}. In patients, PMM2 defect induced PC deficiency whose prevalence varies from 29%⁵ and 32%⁴ to 72%⁷ depending on the series. The circulating PC is also underglycosylated as abnormal isoforms of PC were evidenced in plasma from patients with CDG¹⁰.

The PC belongs to a complex system which regulate both haemostasis and host defence systems in response to vascular and inflammatory injury, respectively¹². PC circulates in plasma as the zymogen form of the activated protein C (APC) and its activation by thrombin occurs on the surface of the endothelial cell which involves two membrane receptors, thrombomodulin (TM) and endothelial protein C receptor (EPCR). APC has an anticoagulant function based on the regulation of the thrombin generation. The physiological importance of

the protein C system is evidenced by the severe thrombotic complications associated with an impairment of the protein C system^{13,14}. APC also provides multiple cytoprotective activities including antiapoptotic, anti-inflammatory and stabilization of endothelial barrier activities¹². Cytoprotective functions of APC involves EPCR and protease-activated receptor-1 (PAR1).

The role of the N-glycans of APC and its receptors was previously studied using site directed mutagenesis system and revealed that N-glycans are involved in the secretion, the activation and the cellular functions of the APC. Indeed, TM has 5 potential glycosylation sites, 4 of them being glycosylated, and none of these chains were shown to modulate TM capacity to activate PC¹⁵. Similarly, the four N-linked carbohydrate attachment sites (Asn30, 47, 119 and 155) of the EPCR are not critical for PC/APC binding and do not influence the protein C activation rate¹⁶, while N-glycosylations of PAR-1 are involved in the transport to the cell surface and the signaling pathway^{17,18}. Finally, PC has four glycosylation sites some of them being involved in the secretion, the activation and the cytoprotective functions of the APC but also the anticoagulant activity of the protein¹⁹.

However, this approach is not a whole system approach, and only gives fragmentary information. Thus, we developed an endothelial cell model knock down for PMM2, to study the impact of glycosylation on the whole PC system. Thus, we knocked-down the expression of PMM2 in the brain endothelial cell line hCMEC/D3. Because the APC and its receptors are highly glycosylated, we hypothesized that N-glycosylation defect might impact the PC system functions in hCMEC/D3. In PMM2 knock-down cell line we first analyzed the capacity of the endothelial cells to generate APC. Then, given the cytoprotective effects of the PC system on the endothelial barrier, we investigated the barrier integrity in basal state and under inflammatory conditions.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies and other reagents

Rabbit polyclonal anti-PMM2 was purchased from Proteintech (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Mouse monoclonal anti β -actine, clone AC-15 was purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). PE mouse anti-human CD141, PE mouse IgG1 κ isotype control and mouse anti-human CD144 antibody were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Mouse monoclonal anti-thrombin receptor (WEDE15) was purchased from Beckman-Coulter (Immunotech, Marseille, France). Rabbit polyclonal anti-LAMP1, normal mouse IgG and goat anti-mouse IgG1 PE were purchased from Santa Cruz (Clinisciences, Nanterre, France). Mouse monoclonal anti-EPCR (JRK 1494) was kindly provided by Charles T. Esmon (Oklahoma, USA). Donkey anti-mouse IgG antibody Alexa fluor 647 and ProLong Gold antifade mountant with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) were purchased from ThermoFisher Scientific (Illkirch, France).

Cell culture

The human brain microvascular endothelial cell line hCMEC/D3, first described by Weksler et al (Weksler 2005), was obtained from Pierre-Olivier Couraud and cultured in endothelial basal medium-2 (EBM-2, Lonza, Levallois-Perret, France) and supplemented with 5% fetal bovine serum (ThermoFisher Scientific), 10 mM Hepes buffer (ThermoFisher Scientific), 1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific), 1% chemically defined lipid concentrate (ThermoFisher Scientific), 1.4 μ M hydrocortisone (Sigma), 5 μ g/mL ascorbic acid (Sigma), and 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France). Cells were maintained at 37°C in 95% air and 5% CO₂ until confluence. hCMEC/D3 cells were used between passages 37 and 43.

shRNA transfection

Cells were cultured in a 6-well plate at 2.5 x10⁵ cells/well until to reach 50% confluency. Sh RNA targeting *PMM2* (OriGene, Clinisciences) at a final concentration of 1 μ g/mL were transfected according to the manufacturer's instructions using GeneCellin, BCC™ reagent (Labomics, Clinisciences). As control a scrambled sh RNA (OriGene, Clinisciences) was used.

Medium was removed after 8-hours incubation. Forty-eight hours later, cells were treated with 2,5 µg/mL puromycin (Clinisciences). Clonal population of cells appeared within 3 weeks.

Immunoblotting Assays

Cells were washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (PANBiotech, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) and then incubated with an appropriate volume of RIPA buffer (TrisHCL 25mM pH 7.6; EDTA 1.5 mM; NaCl 150 mM; NP40 1%; Sodium deoxycholate 1%; SDS 0.1%; NaF 6.25 mM; beta glycerophosphate 12.5 mM; NaVO₃ 1.25 mM) supplemented with a protease cocktail inhibitor (ThermoFisher Scientific) at 4°C for five minutes. Cell were then scraped and centrifuged 14,000 g, 4°C for 15 minutes. Protein concentration in the supernatant was measured using Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (ThermoFisher Scientific). Then, 20 µg of total protein lysates were mixed with Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 25 mM dithiothreitol, and 0.01% bromophenol blue). Non-reducing conditions were used for LAMP1. Lysates were heated at 95°C for 5 minutes before separated on NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (ThermoFischer Scientific) and transferred to a nitrocellulose membrane Hybond ECL (GE Healthcare, Dutscher). Membranes were blocked in blocking buffer (5% milk powder in TBS-T [TBS 1X; 0.1% Tween 20]; pH 7.4) for 1 hour at room temperature. Primary antibodies were then incubated overnight at 4°C at a dilution of 1:500 for PMM2, 1:1000 for actin. After, membranes were washed three times for 5 min in TBS-T and then incubated with peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit or goat anti-mouse (1:20 000) for 1 hour at room temperature and washed 3 times for 5 min. Signal was detected with chemiluminescent substrate ECL (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; ThermoFisher Scientific) and imaged using Syngene G:box iChemixT imager (Syngene, Cambridge, UK). Signal intensities were quantified using ImageJ software (W Rasband, National Institute of Health) and normalized to β-actin signal.

Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RNA was purified with the Nucleospin® RNA Plus kit reagent (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by using the High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit from Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific), from 500 ng of total extracted RNA. Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed with Master mix Gene expression (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) or iTaq universal SybR Green

supermix (Biorad, Marne-la-Coquette, France) on a CFX96 thermocycler (Biorad). The Taqman probes Hs03044607_g1, Hs00264920_s1 and Hs00197387_m1 (Applied Biosystems) were used to quantify the PMM2, THBD and PROCR mRNA levels respectively. Primers used for human thrombin receptor were 5'CTCAGAAGATGCCTCCGGAT3' (forward); 5'GAGCACAGACACAAACAGCA3' (reverse). Primers used for beta-actin were: 5'GGCATCCTCACCTGAAGTA3' (forward); 5'GCACACGCAGCTCATTGTAG3' (reverse) and for GAPDH: 5'CAGCCTCAAGATCATCAGCA3' (forward); 5'TGTGGTCATGAGTCCTTCCA3' (reverse). Reactions were performed in triplicates and H₂O was used as negative control. Data were analyzed using the comparative Ct method and normalized to the housekeeping genes β -actin and GAPDH. Results are expressed as fold changes compared to control.

Protein C activation on hCMEC/D3

Confluent hCMEC/D3 in 48-well plates were washed three times with Hank's balanced salt solution (HBSS) and then incubated with 0.1% bovine serum albumin in HBSS solution containing 3 mM calcium, and 0.6 mM magnesium for 5 min before the addition of 0.1 μ M of protein C (Protexel, LFB) in the medium. The activation of the PC was triggered by addition of 10 nM human thrombin. After 4-hours incubation at 37 °C, the reaction was stopped by adding a mixture of antithrombin (1.66 mg/mL) (Aclofine®, LFB Biotechnologies) and heparin (1.4 UI/mL) (Héparine Choay®, Sanofi). The supernatants were transferred into a 96-well microplate and the amidolytic activity of activated protein C were measured using the peptide substrate (p-Glu-Pro-Arg-pNa) of PCa (Biophen, Neuville sur Oise, France) at a final concentration of 0.2 mM. The rates of substrate cleavage were measured with a Vmax microplate reader (Safas spectrophotometer, Monaco, France). The concentration of enzyme in the reaction mixtures was determined by comparison to a standard curve of amidolytic activity of freshly prepared activated protein C (Xigris®, Lilly). Reactions were performed in triplicate and results were expressed in nM of APC generated/100 000 cells. The same experience was performed with hypoglycosylated protein C instead of native protein C.

Treatment of protein C with peptide N-glycosidase F

Before to perform protein C activation on hCMEC/D3, protein C was treated with peptide N-glycosidase F (PNGase F) (New England Biolabs, Evry, France). PNGase F is an amidase that cleaves between the innermost GlcNAc and asparagine residues of complex oligosaccharides

from N-linked glycoproteins. Four μg of protein C were incubated with PNGase F (12 500 units/mL) under native condition at 37°C for 6 hours before separated on SDS-Page to see different glycoforms. Underglycosylated protein C was then purified by ion exchange chromatography using Resource Q column equilibrated with 25 mM TRIS; 25 mM NaCl; pH 7.4 solution. The elution was performed with gradient solution from 25 to 500 mM NaCl.

Flow cytometry analysis

Cells were washed twice with DPBS and detached with a non-enzymatic cell dissociation solution (Accumax, Sigma) before centrifuged 250g for 5 min. The cellular pellet is resuspended in DPBS at a concentration of $10 \times 10^6/\text{mL}$. Then 2×10^5 cells were incubated for 15 min at room temperature with primary antibodies: anti-TM (1:5), anti-EPCR (1:1000), anti-PAR1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), normal mouse IgG (1:5) or PE mouse IgG1 κ isotype control (1:5). When primary antibodies were non-coupled, cells were incubated with a secondary antibody (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 min at room temperature. Immunostaining was then stopped by addition of DPBS. Fluorescence was measured with BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences). Data acquisition were analysed using BD Accuri C6 software (BD Biosciences).

Fluorescence microscopy

Cells were seeded until confluence onto 0.1% gelatin coated coverslip before being fixed with 4% paraformaldehyde in 1X PBS for 20 min at room temperature, then washed twice with washing solution (1X PBS containing 0.05% Tween-20). Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 1X PBS for 5 minutes at room temperature, then washed twice in washing solution. Blocking solution (1% BSA in 1X PBS) was applied for 30 minutes at room temperature. Primary VE-cadherin (CD144) antibody was diluted (1:100) in the blocking solution and incubated for 1 hour at room temperature. Cells were washed three times (10 minutes each) with washing solution. Secondary antibody anti-mouse antibody Alexa fluor 647 was diluted in 1X PBS (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 1 hour at room temperature. TRITC-conjugated phalloidin (1:4000) (Merck Millipore, Guyancourt, France) was incubated simultaneously. Cells were washed three times (10 minutes each) with washing solution. Coverslips were mounted on a slide using ProLong Gold antifade mountant containing DAPI. Fluorescence images were visualized with a fluorescence microscope Eclipse E600 (Nikon). We

used APO 60x1.40 oil DIC H60 Plan objective for image acquisition. Images were analyzed with ImageJ software (ImageJ, NIH).

Transendothelial permeability assay

hCMEC/D3 were seeded at confluence onto collagen-coated transwell inserts with 3µm pore diameter (Greiner Bio-one, Les Ulis, France) with growth medium. After 48 hours, culture medium was changed, and inserts were placed in new well containing HBSS solution. Then, a 4% BSA, 0.67 mg/mL Evans blue solution is added to the apical chamber. After 15 minutes the media from the lower chamber was sampled to measure the absorbance of Evans blue at 650 nm using Safas spectrophotometer.

Real time impedance measurement by RTCA iCELLigence system

The endothelial barrier function was assessed by RTCA (Real-Time Cellular Analysis) iCELLigence system (ACEA Biosciences, San Diego, USA), an impedance-based system which allows to monitor cells in real time. The iCELLigence system measures in real-time a transendothelial electrical resistance (TEER) across gold microelectrodes integrated into the culture E-plates. Cells were seeded in standard culture medium at density of 1×10^5 cells/well onto E-plates coated with 0.1% gelatin (1 hour, 37°C) up to reach 100% of confluence that we checked under the microscope. Real-time assay was conducted under normal culture conditions. The assay was also conducted in cells incubated with 20 nM of APC 4 hours prior to thrombin stimulation (1nM). Each condition was tested in duplicate and results of TEER measurement were expressed in cell index values normalized to the baseline.

Statistical analysis

Data are presented as the mean values $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using Prism software (GraphPad Software Inc.). Intergroup comparisons were performed using unpaired Student's t test or 1-way ANOVA. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

PMM2 knock-down cell line

To investigate the impact of PMM2 deficiency on the endothelial components of the PC system, we first knocked-down PMM2 expression in hCMEC/D3 cell line using RNA interference. PMM2 knock-down leads to a decrease of both protein expression and mRNA levels. The protein expression was reduced to $64\% \pm 18\%$ of that of the control (**Fig 1A**), whereas mRNA level was reduced to $51\% \pm 5\%$ of that of the control (**Fig 1B**). This moderate decrease in PMM2 expression is sufficient to induce N-glycosylation impairment since under-glycosylated forms of LAMP1, a highly glycosylated ubiquitous lysosomal protein was detected in PMM2 knock-down cells (**Fig 1C**).

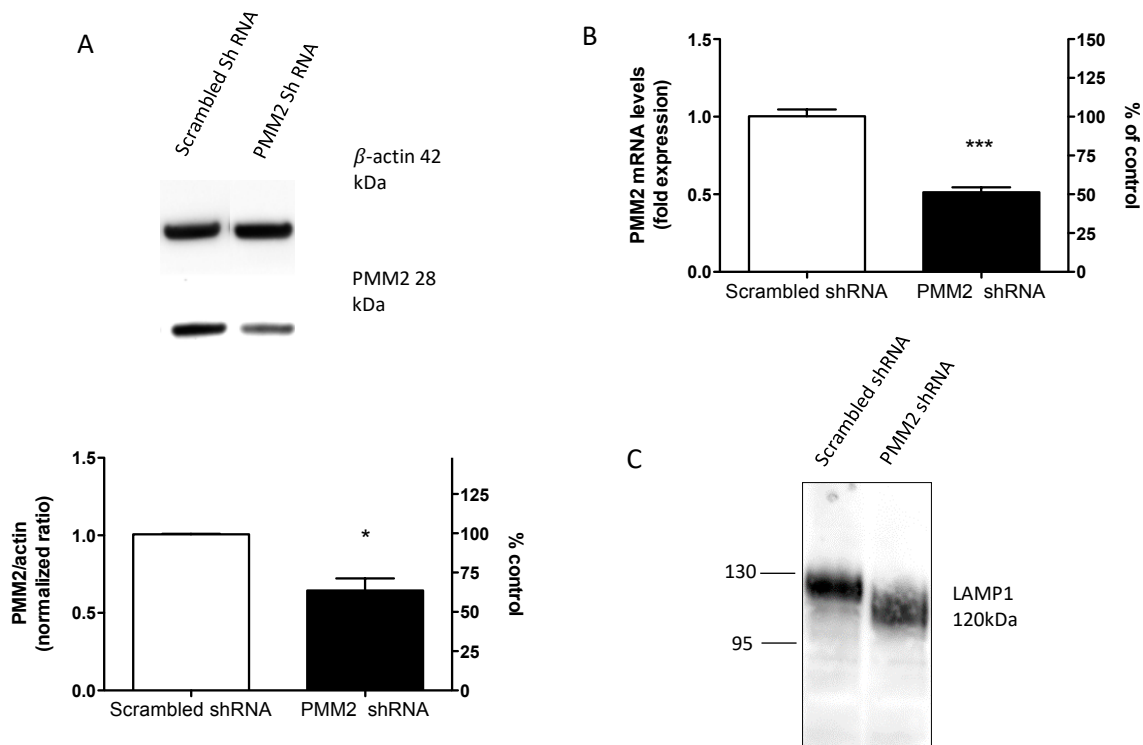


Figure 1: Characterization of PMM2 knock-down cell line

(A, upper panel) Western blot analysis of PMM2 in whole cell lysates of PMM2 knock-down cells and control. (A, lower panel) Protein quantification of PMM2 normalized to β -actin. Plots are representative of 5 independent experiments. B RT qPCR analysis of PMM2 mRNA levels in PMM2 knock-down cells and control. C Western blot analysis of LAMP1 in whole cell lysates of PMM2 knock-down cells and control. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

APC generation is impaired in PMM2 knock-down cell

PMM2 knock-down impaired the ability to generate activated protein C (APC) on the hCMEC/D3 cell line. Activation of PC was significantly reduced in PMM2 knock-down cells relative to control (16.9 ± 8.7 nM in PMM2 knock-down cells vs 54.5 ± 14.8 nM in controls, $p < 0.0001$) (**Fig 2A**). Since the PC is abnormally glycosylated in patients with PMM2-CDG we also conducted the experience in the presence of PC previously treated with PNGase F in order to remove the N-glycans from the protein. The ability to activate the PC is similar whether the PC is fully or partially glycosylated (23.6 ± 4.4 nM vs 24.7 ± 9.9 nM, $p > 0.05$ for the PMM2 knock-down cells and 47.9 ± 5.7 nM vs 49.2 ± 15.9 nM, $p > 0.05$ for the control) (**Fig 2B**).

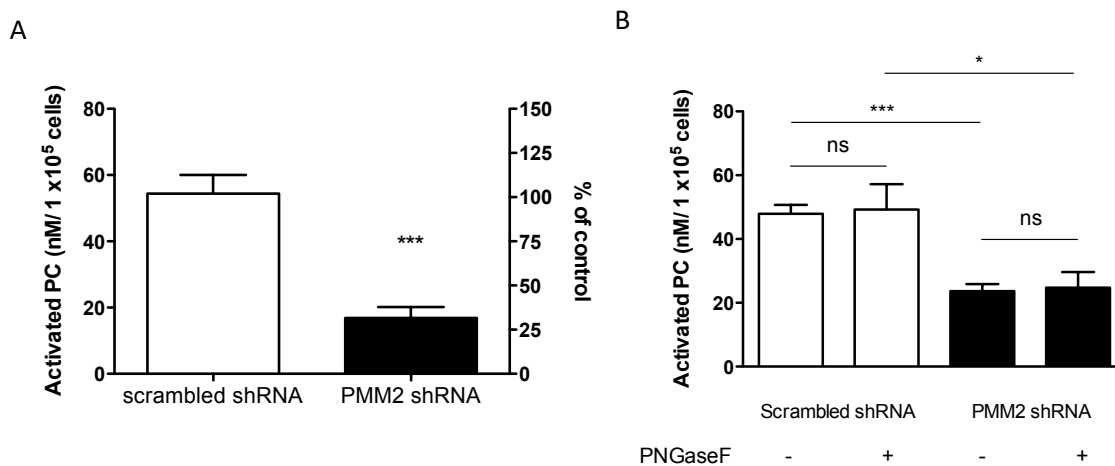


Figure 2: Protein C activation on hCMEC/D3

A After 4-hours incubation with $0.1 \mu\text{M}$ of PC and 10 nM of human thrombin, amidolytic activity of activated protein C generated were measured using a peptide substrate of APC. **B** Protein C activation assay was also conducted with PC previously treated by PNGase F. *Ns*: non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

N-glycosylation defect reduces the surface expression of TM and EPCR

To explain the decrease in PC activation on the surface of PMM2 knock-down cells, we assessed the expression of the membrane receptors involved in these activation (i.e. TM and EPCR) by flow cytometry. In PMM2 knock-down cells, the membrane expression of TM and EPCR was reduced to $18\% \pm 1\%$ ($p < 0.001$) and $71\% \pm 5\%$ ($p < 0.01$) respectively of that of the control (**Fig 3A**). Endoplasmic reticulum retention of misfolded form of TM and EPCR does not

explain the decrease in surface expression of these receptors as no increase in fluorescence signal was evidenced in PMM2 knock-down cells when flow cytometry was performed on permeabilized cells (data not shown). An increase in TM and EPCR cleavage also does not explain the decrease in surface receptors since the concentration of soluble form of TM (sTM) and EPCR (sEPCR) in the growing medium was lower in PMM2 knock-down cell than in control (2.4 ± 1 vs 32.8 ± 4.8 ng/mL, $p < 0.001$ and 3.4 ± 0.3 vs 6.0 ± 0.2 ng/mL, $p < 0.001$ for sTM and sEPCR respectively) (**Fig 3B**). Hypoglycosylation may lead to misfolded proteins which are degraded by the ubiquitine proteasome system (ref), thus, we tested whether the proteasome inhibition with MG132 rescue the expression of TM and EPCR. Treatment with MG132 has no effect on PMM2 knock-down cell on the expression of TM and EPCR (data not shown). Finally, we quantified transcript levels of THBD and PROCr (genes coding for TM and EPCR respectively) by RT qPCR and we revealed that mRNA levels of both THBD and PROCr were reduced in PMM2 knock-down cells to $18\% \pm 5\%$ ($p < 0.001$) and $34\% \pm 2\%$ ($p < 0.001$) respectively of that of the control (**Fig 3C**).

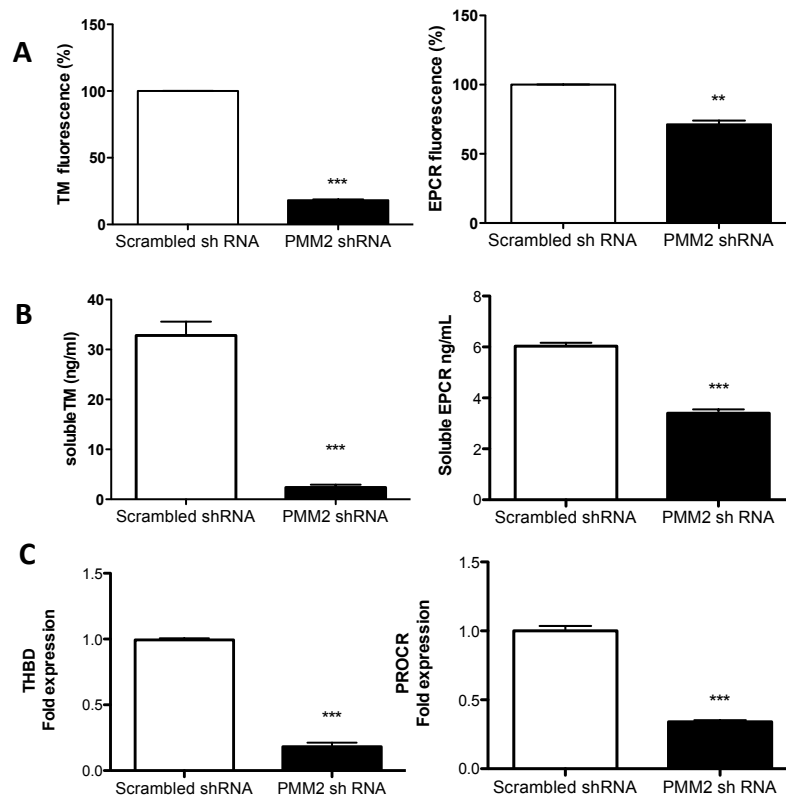


Figure 3: TM and EPCR expression

A Flow cytometry analysis of TM and EPCR membrane expression. Results are expressed in % of mean of fluorescence. **B** Soluble form of TM (sTM) and EPCR (sEPCR) were quantified in the cell culture supernatant. **C** THBD and PROCr transcript levels were quantified by qPCR. Results are expressed in fold expression normalized to β -actin and GAPDH. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Since the transcription factors KLF2 and KLF4 are regulators of THBD gene expression we quantified the KLF2 and KLF4 mRNA levels by qPCR. In PMM2 knock-down cells, KLF2 and KLF4 mRNA levels were reduced to $58\% \pm 17\%$ ($p=0.0064$) and $34\% \pm 18\%$ ($p=0.0003$) of that of the control (Fig 4).

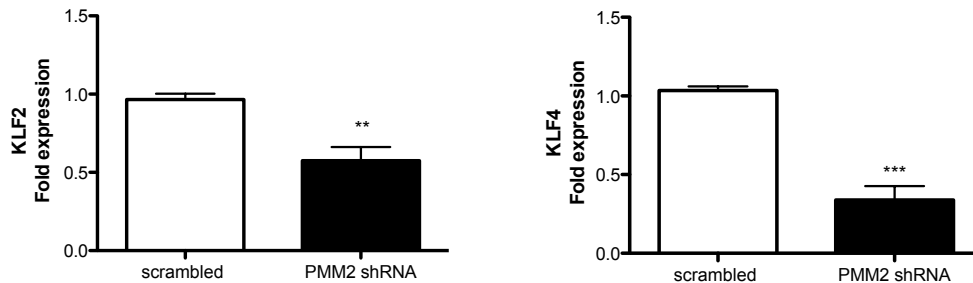


Figure 4: KLF2 and KLF4 expression

KLF2 and KLF4 transcript levels were quantified by qPCR. Results are expressed in fold expression normalized to β -actin and GAPDH. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

APC cytoprotective activity is preserved in PMM2 knock-down cell

As APC was reported to protect the endothelial barrier through the activation of PAR1 receptor, we investigated its ability to restore the endothelial barrier integrity in PMM2 knock-down cell in response to thrombin-induced disruption. We first observed that the transcriptional defect observed in PMM2 knock-down cells does not affect PAR-1. Indeed, PAR-1 has even a slightly higher transcript level in PMM2 knock-down cells than in control (1.6-fold increase $p<0.001$), while the membrane expression of PAR-1, assessed by flow cytometry, is similar to the control cells (Fig 5).

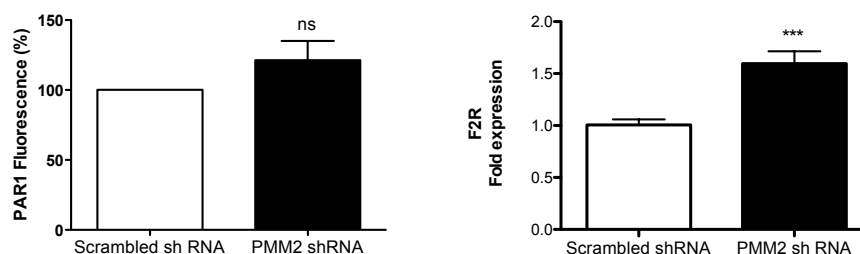
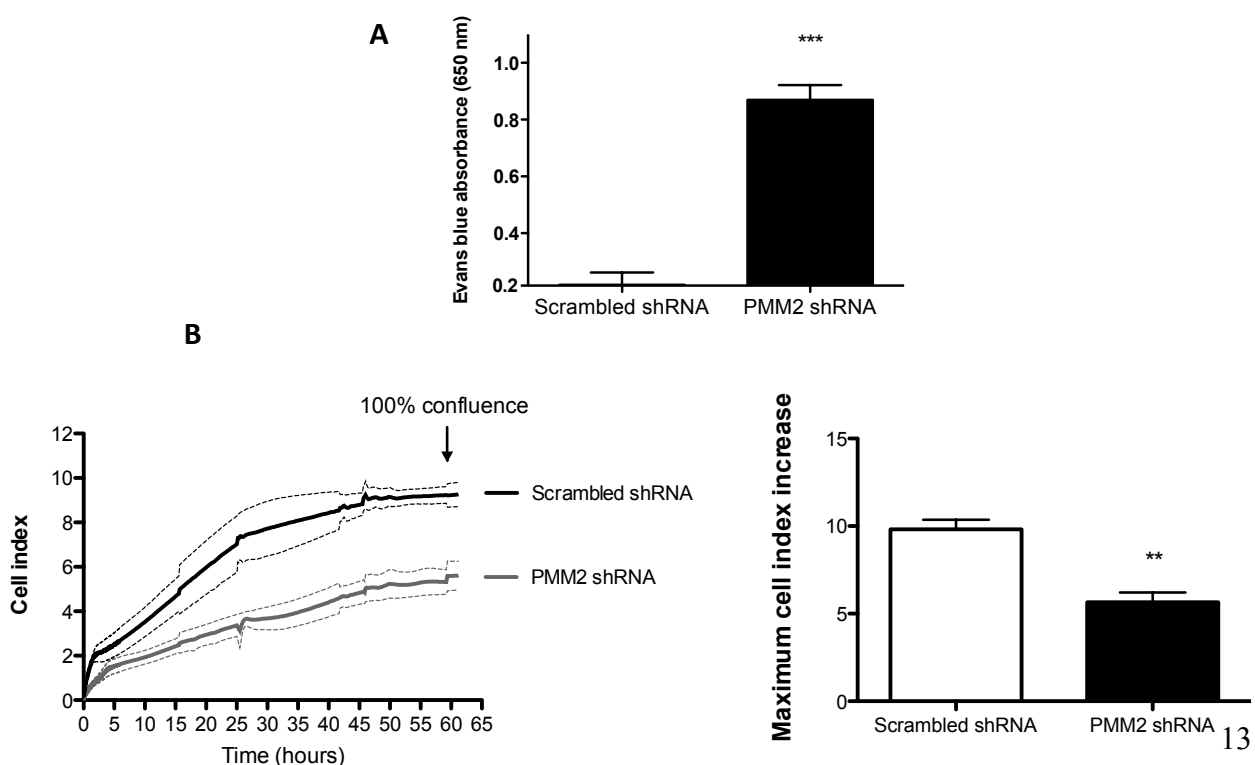


Figure 5 : PAR-1 expression

A Flow cytometry analysis of PAR-1 membrane expression. Results are expressed in % of mean of fluorescence. B F2R transcript levels were quantified by qPCR. Results are expressed in fold expression normalized to β -actin and GAPDH ; *** $p<0.001$

Then, we compared the endothelial cell monolayer obtained with control hCMEC/D3 or hCMEC/D3 inactivated for PMM2 in resting conditions. Interestingly, in basal state, we observed an impaired integrity of endothelial cell monolayer when PMM2 is knock-down. Indeed, the transendothelial flux of Evans blue solution was significantly higher through the PMM2 knock-down cell monolayer than in control (0.87 ± 0.15 absorbance vs 0.22 ± 0.12 absorbance, $p < 0.001$) (**Fig 6A**). Then, we used a TEER method which is commonly used to evaluate the integrity and permeability of tight junctions in endothelial cell culture monolayer^{20,21}. At confluence, the maximum of cell index reached was significantly lower in PMM2 knock-down cells than in control (5.65 ± 1.11 vs 9.83 ± 1.08 , $p < 0.01$) (**Fig 6B**). Through interactions with actin cytoskeleton, VE-cadherin ensures an adherent junction particularly important to maintain the endothelial barrier permeability²². Thus, we compared the cellular organization of VE-cadherin and actin cytoskeleton between the PMM2 knock-down cell and control. The morphology of control hCMEC/D3 is cobblestone and the majority of actin filaments were localized around the periphery of cells, parallel with cell-cell junctions. VE-cadherin formed a continuous line at cell-cell junctions with occasional gaps (**Fig 6C**). PMM2 knock-down induced a change in cellular organization of actin filaments which are scattered in the cells, whereas the distribution of VE-cadherin is fragmentary at the cell-cell junctions. Taken together, these observations evidenced an impairment of the endothelial barrier in basal conditions in PMM2 knock-down hCMEC/D3.



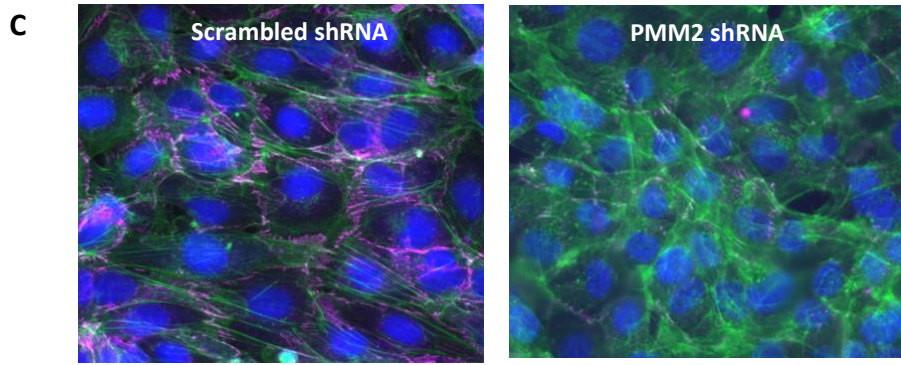


Figure 6: Endothelial barrier integrity in basal state

A. Evans blue permeability assay in PMM2 knock-down cells relative to control. Absorbance was measured at 650 nm 15 minutes after incubation with 4% BSA Evans blue solution. **B (left)** Real time TEER measure in cell during the steps of adhesion and proliferation until to reach 100% of confluence. Curves are representative of 4 independent experiments. Cell index was expressed as mean (solid line) $\pm$ SD (dotted line). **B (right)** Maximum cell index increase measured during the first steps of adhesion and proliferation. **C** Immunofluorescence staining. Distribution of VE-cadherin (purple) and F-actin (green). Blue, DAPI staining of nuclei. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Finally, we investigated the endothelial response to thrombin stimulation using the TEER measurement. In control hCMEC/D3 thrombin-induced hyperpermeability results in a rapid and acute decrease in TEER followed by a recovery to initial values of resistance in less than 2 hours (**Fig 7A**). Thrombin induced a higher maximum decrease in TEER in PMM2 knock-down cells relative to control (0.39 ± 0.12 vs 0.93 ± 0.12 , $p < 0.01$) (**Fig 7B**). The ability of thrombin to disrupt the barrier, quantified by the total area under the curve (AUC), is also greatly increased in PMM2 knock-down cells than in control (0.19 ± 0.08 cell index/hour vs 7.91 ± 0.04 cell index/hour, $p < 0.01$) (**Fig 7C**). As PAR-1 also mediates APC's endothelial barrier protection, we next investigated the endothelial response to thrombin stimulation after a four-hours incubation with APC. Prior incubation with APC does not prevent the decrease in TEER but accelerates the recovery to the baseline. When PMM2 knock-down cells were incubated with APC prior to thrombin stimulation, the 50% recovery of TEER is significantly more quickly achieved (3.74 ± 1.37 hours in the presence of APC vs 6.97 ± 0.86 in the absence of APC, $p < 0.01$) (**Fig 7D**).

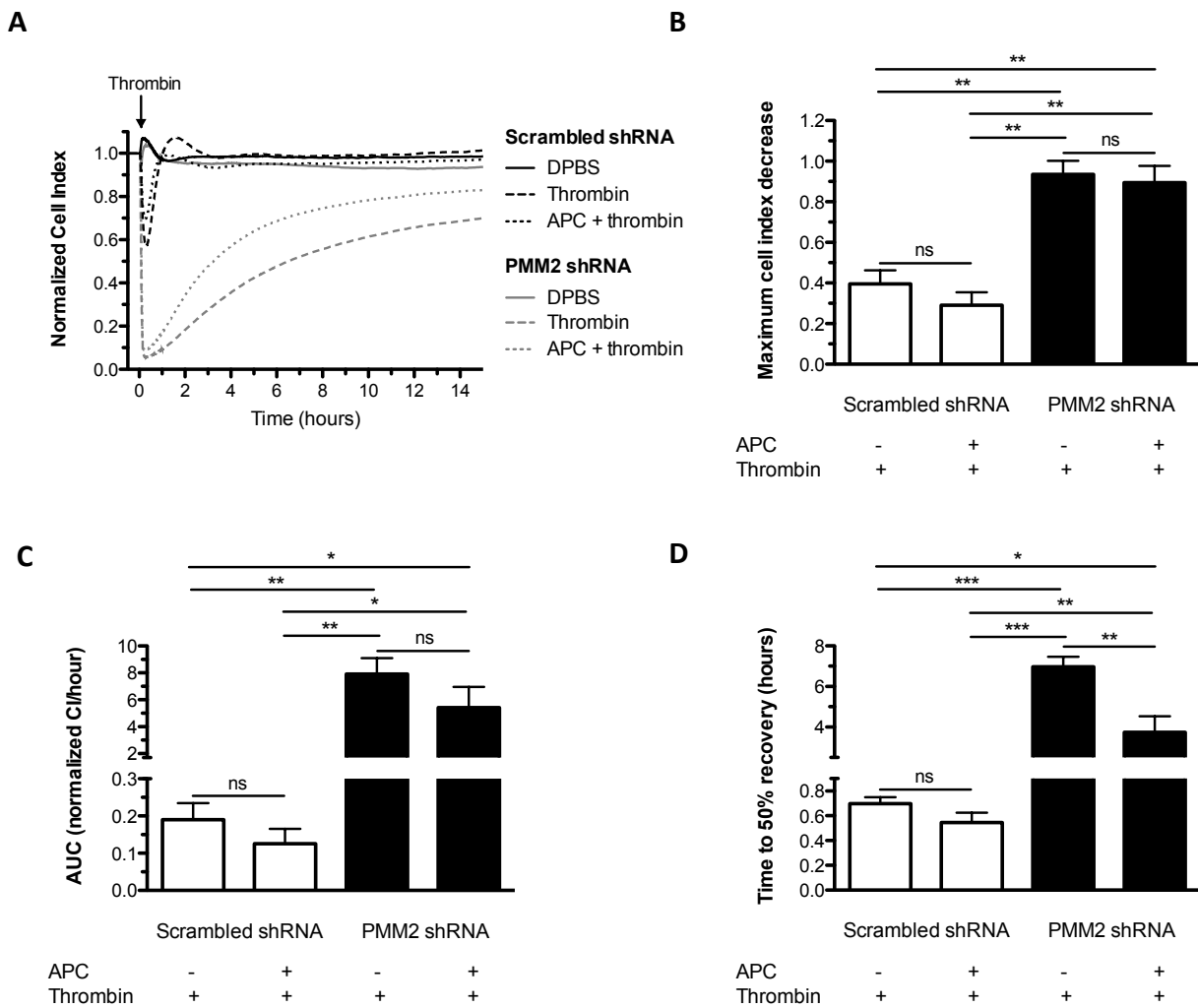


Figure 7: Transendothelial electrical resistance in response to thrombin stimulation

A. Real time TEER measure in cells incubated with 20 nM APC during four hours prior to thrombin stimulation (1 nM). Curves are representative of mean of cell index calculated from one experiment. **B.** Maximum cell index decrease in response to 1 nM thrombin stimulation. TEER decrease was expressed as the difference in resistance detected between untreated cells and stimulated cells at the time of maximum decrease in TEER. Plots are representative of three independent experiments. **C,D.** Recovery to baseline cell index in cells incubated with 20nM APC prior to thrombin stimulation (1nM) expressed by the area under the curve (AUC) (C) and the time to 50% recovery to the baseline (D). AUC was calculated as the difference between the AUC of untreated cells and the stimulated cells. Time to 50% recovery was the time required to recover 50% of the baseline TEER. Plots are representative of three independent experiments.

Ns: non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

DISCUSSION

To investigate the role of N-glycosylation in the multiple functions of the PC system we generated a brain endothelial cell line knock-down for the PMM2, an enzyme involved in the N-glycosylation process. PMM2 knock-down resulted in a moderate decrease in both protein and mRNA transcript levels of PMM2, probably because, in this model, a more significant decrease would be incompatible with cell viability. Indeed, it has been demonstrated that complete loss of PMM2 leads to early embryonic lethality occurring before 5.5 days of development^{23,24} consistent with the fact that no R^{141H} - the most frequent mutation identified in PMM2 CDG - homozygosity were found in patients. Indeed, enzymatic activity of human recombinant PMM2 with the R^{141H} mutation is undetectable²⁵. An endothelial PMM2 knock-down model has already been developed using transient transfection in HUVEC leading to a 70% decrease in the protein level of PMM2²⁶. In the present study, we used the hCMEC/D3 cell line derived from the brain microvessels to generate a stable knock-down of PMM2, and even though only an approximately 2-fold decrease in PMM2 expression was reached in our model, the impact on glycosylation was attested by LAMP1 profile as previously described.

All the components of the PC system contain N-glycans which may be involved in multiple functions of these proteins. Thus, we investigated the anticoagulant and cytoprotective properties of the PC system in PMM2 knock-down endothelial cells. First, we observed that, whatever the glycosylation status of the PC, PMM2 knock-down reduced significantly APC generation in hCMEC/D3, due to a decrease in TM and EPCR expression, the two receptors involved in the activation of the PC. Constitutively expressed by the endothelial cells, TM contributes to the anticoagulant properties of the endothelium and prevent thrombosis formation. Indeed, endothelial knock-out of TM in mice led to excessive activation of the coagulation resulting in fatal massive thrombosis²⁷. This decrease in TM expression induced by PMM2 inactivation may thus result in a prothrombotic phenotype in the cells, particularly when associated with a PC deficiency which is reported in 29% of the PMM2-CDG patients⁵.

Since PC is also underglycosylated in patients with PMM2-CDG²⁸, we treated PC with PNGaseF prior to measure the APC generation on cells, and no significant difference in the rate of activation into APC was observed between underglycosylated and fully glycosylated forms of

PC. In contrast, using mutagenesis experiments, it was shown that the rate of the PC activation was increased in the absence of glycosylation at Asn 313¹⁹. However, we cannot exclude that this discrepancy is related to a direct effect of the mutation than the lack of the glycan chain. Beside its anticoagulant properties, PC system also provides cytoprotective activities to maintain the barrier integrity. Indeed, PAR-1 is the third receptor of the PC system which mediates both thrombin-induced hyperpermeability and APC's endothelial barrier protection. As already reported in hCMEC/D3²⁹, thrombin activates PAR-1 leading to disruptive, hyperpermeability and proinflammatory responses. Thrombin-mediated activation of PAR-1 leads to an acute Rho controlled actomyosin-dependent contraction that disrupts endothelial integrity and causes vascular damage^{30,31}. It has been demonstrated that the APC, in the presence of EPCR, can activates PAR-1 and inhibits the thrombin-mediated activation of NF- κ B and down-regulates the expression of proinflammatory cytokines³²⁻³⁴. Interestingly, unlike to TM and EPCR, PAR-1 expression was not affected by PMM2 silencing, providing evidence that the transcriptional machinery was not fully impacted in this model. This suggests that the down regulation of TM and EPCR may rather be the consequence of a modulation of the regulation in the expression of THBD and PROCR. Indeed, several transcriptional regulation processes involving transcription factors such as KLFs^{35,36}, or NF κ B pathway³⁷ are involved in the regulation of the TM promoter, while no regulatory elements have been reported concerning EPCR. KLF2 and KLF4 are two regulators of THBD gene expression³⁸⁻⁴¹ and we observed a decrease in their expression in PMM2 knock-down cells. These results can account for the decrease in TM expression. Sangwung et al⁴² showed that endothelial specific deletion of KLF2 and KLF4 in mice results in near-complete loss of TM expression. In contrast, KLF2 and KLF4 were not implicated in the regulation of the EPCR expression as demonstrated in cerebral cavernous malformation model³⁶. Deep study of the mechanism involved in the down regulation of PROCR may lead to the identification of new pathway. In this context, transcriptomic analysis may be helpful.

Since PAR-1 was normally expressed in PMM2 knock-down cells, we investigated the activation of these receptor by its two ligands, i.e. thrombin and APC. Using TEER measurement, we showed that thrombin induced a higher hyperpermeability in PMM2 knock-down cells than in controls. As PAR-1 also mediates APC's endothelial barrier protection, we incubated cells with APC prior to thrombin stimulation. APC does not prevent the decrease in TEER but the 50% recovery of TEER is significantly more quickly achieved in PMM2 knock-

down cells. These results suggested that the endothelial barrier of PMM2 knock-down cells, already weakened at basal state, is even more disrupted under proinflammatory stimulus. Moreover, despite the decrease in the EPCR expression in PMM2 knock-down cells, APC can still exert its barrier stabilizing effect. Interestingly, even though the EPCR is required for cytoprotective effects of APC⁴³, the reduced expression of EPCR on PMM2 knock-down cell membrane appears to remain sufficient to exert its cofactor activity. Incubation with APC even resulted in a significantly faster recovery of TEER in PMM2 knock-down cell than in control. This may be related to the fact that the N-glycosylated chains in second extracellular loop regulates PAR-1 bias activity. Indeed, it was reported that removal of the extracellular N-linked moieties of PAR-1 enhance signaling through decreased stress fibers formation and enhanced cellular proliferation^{18,44}

Beside its implication in the PC system the brain endothelial barrier consists in the blood brain barrier which is a physical and biochemical barrier between the circulatory system and the central nervous system. The blood brain barrier endothelium is characterized by the presence of tight junctions and adherens junctions which regulate the barrier permeability⁴⁵. Through interactions with actin cytoskeleton, VE-cadherin ensures an adherent junction particularly important to maintain the endothelial barrier permeability²². As components of junctions are glycoproteins, we assessed the barrier integrity in PMM2 knock-down cells. Transendothelial permeability and TEER assay revealed that PMM2 knock-down altered the integrity of endothelial cell monolayer barrier due in part to the loss of VE-cadherin based adherens junction's integrity. VE-cadherin carries predominantly sialylated glycans which can be removed by sialidase treatment. In Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) treated with sialidase, VE-cadherin changed its continuous junctional distribution "zipper-like" to a largely scattered morphology but was still localized at interendothelial junctions⁴⁶. Endothelial integrity has never been studied previously in PMM2 knock-down model. However, in mice PMM2^{R137H/F118L}, examination of embryos showed extensive degradation of multiple organ accompanied by massive hemorrhaging within the extraembryonic supporting structures leading to embryonic lethality²⁴. Moreover, PMM2-CDG may be associated with edemas as in case of hydrops fetalis^{47,48} and stroke-like^{49,50} and abnormal endothelial integrity may contribute to this phenotype.

Our study has several limitations. Indeed, the use of a global system targeting the glycosylation process as a whole provides interesting information, but its main limitation is that a wide range of system are affected by glycosylation process. Moreover, translation of these results in endothelial cells derived from patients would be of great interest and may improve our knowledge of the pathophysiology of CDG and perhaps of acute vascular events such as stroke-like. Blood outgrowth endothelial cells could be isolated from peripheral blood⁵¹. Human induced pluripotent stem cells (iPSC) were already isolated from patient and PMM2 residual activity measured in these cells was 20%⁵².

In summary, this study showed that PMM2 knock-down induced a decrease in TM and EPCR expression leading to a significant decrease in APC generation which potentially provides a procoagulant phenotype to the endothelium. In addition, thrombin induced a higher hyperpermeability in PMM2 knock-down cells than in controls and APC can still exert its barrier stabilizing effect. The endothelial barrier integrity was also impaired in PMM2 knock-down cell leading to a loss of integrity of the blood brain barrier. Overall this study has led to a better understanding of the N-glycan's role in the PC system and in the endothelial barrier.

Acknowledgments

The hCMEC/D3 cell line was kindly provided by Pierre-Olivier Couraud.

REFERENCES

1. Welte, M. & Hülsmeier, A. J. Ethanol-Induced Impairment in the Biosynthesis of N-Linked Glycosylation: Ethanol Interference with N-Linked Glycosylation. *Journal of Cellular Biochemistry* **115**, 754–762 (2014).
2. Péanne, R. *et al.* Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *European Journal of Medical Genetics* **61**, 643–663 (2018).
3. Jaeken, J. & Péanne, R. What is new in CDG? *Journal of Inherited Metabolic Disease* **40**, 569–586 (2017).
4. Schiff, M. *et al.* Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *Journal of Medical Genetics* **54**, 843–851 (2017).
5. Pascreau, T. *et al.* Elevated thrombin generation in patients with congenital disorder of glycosylation and combined coagulation factor deficiencies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2019) doi:10.1111/jth.14559.
6. Arnoux, J. B. *et al.* Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *MGM* **93**, 444–449 (2008).
7. Linssen, M., Mohamed, M., Wevers, R. A., Lefeber, D. J. & Morava, E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Molecular Genetics and Metabolism* **109**, 107–111 (2013).
8. Tamminga, R. Y. J., Lefeber, D. J., Kamps, W. A. & van Spronsen, F. J. Recurrent thrombo-embolism in a child with a congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ib and treatment with mannose. *Pediatric Hematology and Oncology* **25**, 762–768 (2008).
9. Geet, C. V. & Jaeken, J. A Unique Pattern of Coagulation Abnormalities in Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome. *Pediatric Research* **33**, 540–541 (1993).
10. Stibler, H., Tengborn, L. & Kristiansson, B. Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* **7**, 118–126 (1996).
11. Fiumara, A. *et al.* Haemostatic studies in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Thromb. Haemost.* **76**, 502–504 (1996).
12. Mosnier, L. O., Zlokovic, B. V. & Griffin, J. H. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* **109**, 3161–3172 (2007).
13. Branson, Herman E., Marble, R., Katz, J. & Griffin, John H. Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant. *The Lancet* **322**, 1165–1168 (1983).
14. Griffin, J. H., Evatt, B., Zimmerman, T. S., Kleiss, A. J. & Wideman, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *Journal of Clinical Investigation* **68**, 1370–1373 (1981).
15. Parkinson, J. F., Vlahos, C. J., Yan, S. C. B. & Bang, N. U. Recombinant human thrombomodulin. Regulation of cofactor activity and anticoagulant function by a glycosaminoglycan side chain. *Biochemical Journal* **283**, 151–157 (1992).
16. Liaw, P. C. Y., Mather, T., Oganessian, N., Ferrell, G. L. & Esmon, C. T. Identification of the Protein C/Activated Protein C Binding Sites on the Endothelial Cell Protein C Receptor: implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class 1-type receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 8364–8370 (2001).
17. Soto, A. G. *et al.* N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E3600–E3608 (2015).
18. Soto, A. G. & Trejo, J. N -Linked Glycosylation of Protease-activated Receptor-1 Second Extracellular Loop: a critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 18781–18793 (2010).
19. Grinnell, B. W., Walls, J. D. & Gerlitz, B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J. Biol. Chem.* **266**, 9778–9785 (1991).
20. Crone, C. Electrical resistance of a capillary endothelium. *The Journal of General Physiology* **77**, 349–

- 371 (1981).
21. Srinivasan, B. *et al.* TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **20**, 107–126 (2015).
 22. Giannotta, M., Trani, M. & Dejana, E. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Developmental Cell* **26**, 441–454 (2013).
 23. Thiel, C., Lubke, T., Matthijs, G., von Figura, K. & Korner, C. Targeted Disruption of the Mouse Phosphomannomutase 2 Gene Causes Early Embryonic Lethality. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 5615–5620 (2006).
 24. Schneider, A. *et al.* Successful prenatal mannose treatment for congenital disorder of glycosylation-Ia in mice. *Nature Medicine* **18**, 71–73 (2012).
 25. Kjaergaard, S., Skovby, F. & Schwartz, M. Absence of homozygosity for predominant mutations in PMM2 in Danish patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *European Journal of Human Genetics* **6**, 331–336 (1998).
 26. He, P., Srikrishna, G. & Freeze, H. H. N-glycosylation deficiency reduces ICAM-1 induction and impairs inflammatory response. *Glycobiology* **24**, 392–398 (2014).
 27. Isermann, B. *et al.* Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *The Journal of Clinical Investigation* **108**, 11 (2001).
 28. Stibler, H., Holzbach, U., Tengborn, L. & Kristiansson, B. Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **7**, 118–126 (1996).
 29. Alabanza, L. M. & Bynoe, M. S. Thrombin induces an inflammatory phenotype in a human brain endothelial cell line. *Journal of Neuroimmunology* **245**, 48–55 (2012).
 30. Ludeman, M. J. *et al.* PAR1 Cleavage and Signaling in Response to Activated Protein C and Thrombin. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 13122–13128 (2005).
 31. Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**, 1800–1814 (2005).
 32. Joyce, D. E. & Grinnell, B. W. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor- κ B. *Crit Care Med* **30**, 6 (2002).
 33. Finigan, J. H. *et al.* Activated Protein C Mediates Novel Lung Endothelial Barrier Enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 17286–17293 (2005).
 34. Bae, J.-S., Yang, L., Manithody, C. & Rezaie, A. R. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* **110**, 3909–3916 (2007).
 35. Pathak, R. *et al.* IKK β regulates endothelial thrombomodulin in a Klf2-dependent manner. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **12**, 1533–1544 (2014).
 36. Lopez-Ramirez, M. A. *et al.* Cerebral cavernous malformations form an anticoagulant vascular domain in humans and mice. *Blood* **133**, 193–204 (2019).
 37. Sohn, R. H. Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B. *Blood* **105**, 3910–3917 (2005).
 38. Lin, Z. *et al.* Kruppel-Like Factor 2 (KLF2) Regulates Endothelial Thrombotic Function. *Circulation Research* **96**, (2005).
 39. Villarreal, G. *et al.* Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **391**, 984–989 (2010).
 40. Zhou, G. *et al.* Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 4727–4731 (2012).
 41. Gracia-Sancho, J. *et al.* Endothelial expression of transcription factor Kruppel-like factor 2 and its vasoprotective target genes in the normal and cirrhotic rat liver. *Gut* **60**, 517–524 (2011).
 42. Sangwung, P. *et al.* KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight* **2**,

- (2017).
43. Griffin, J. H., Zlokovic, B. V. & Mosnier, L. O. Activated protein C: biased for translation. *Blood* **125**, 2898–2907 (2015).
 44. Soto, A. G. *et al.* N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E3600–E3608 (2015).
 45. Weksler, B. B. *et al.* Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB Journal* **19**, 1872–1874 (2005).
 46. Geyer, H., Geyer, R., Odenthal-Schnittler, M. & Schnittler, H.-J. Characterization of human vascular endothelial cadherin glycans. *Glycobiology* **9**, 915–925 (1999).
 47. Makhamreh, M. M., Cottingham, N., Ferreira, C. R., Berger, S. & Al-Kouatly, H. B. Non-Immune Hydrops Fetalis and Congenital Disorders of Glycosylation: A Systematic Literature Review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* doi:10.1002/jimd.12162.
 48. Léticée, N. *et al.* Should PMM2-deficiency (CDG Ia) be searched in every case of unexplained hydrops fetalis? *Molecular Genetics and Metabolism* **101**, 253–257 (2010).
 49. Izquierdo-Serra, M. *et al.* Stroke-Like Episodes and Cerebellar Syndrome in Phosphomannomutase Deficiency (PMM2-CDG): Evidence for Hypoglycosylation-Driven Channelopathy. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 619 (2018).
 50. Ishikawa, N., Tajima, G., Ono, H. & Kobayashi, M. Different neuroradiological findings during two stroke-like episodes in a patient with a congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain and Development* **31**, 240–243 (2009).
 51. Mauge, L. *et al.* Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential. *Cytotherapy* **16**, 213–224 (2014).
 52. Thiesler, C. T. *et al.* Glycomic Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from a Patient Suffering from Phosphomannomutase 2 Congenital Disorder of Glycosylation (PMM2-CDG). *Molecular & Cellular Proteomics* **15**, 1435–1452 (2016).

Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer le rôle des glycosylations et plus particulièrement des N-glycosylations sur l'hémostase, à la fois sur les protéines de la coagulation et sur l'endothélium vasculaire. L'hémostase est un processus physiologique complexe qui s'articule en deux phases : (i) l'hémostase primaire qui fait intervenir essentiellement les plaquettes et le facteur Willebrand et (ii) la coagulation qui fait intervenir l'ensemble des protéines de la coagulation, à la fois les facteurs procoagulants et les inhibiteurs physiologiques. L'ensemble des acteurs de ce processus sont des glycoprotéines, dont les chaînes glycaniques peuvent être impliquées dans différentes fonctions de ces protéines comme la sécrétion, l'expression à la membrane, l'activité, les interactions protéine-protéine ou encore l'élimination. Le rôle des chaînes glycaniques des protéines de l'hémostase a été principalement étudié à l'aide des méthodes de déglycosylation enzymatique et de mutagenèse dirigée. Afin d'étudier le rôle des chaînes glycaniques sur l'hémostase dans un système global, nous nous sommes intéressés à une pathologie caractérisée par un défaut de glycosylation, le syndrome CDG. La connexion entre CDG et hémostase est établie depuis bien longtemps puisque les premiers cas rapportés de CDG dans les années 1980 décrivent un profil d'anomalies de la coagulation assez singulier incluant des déficits en facteurs procoagulants et en inhibiteurs de la coagulation. Ce profil atypique n'évoque aucune coagulopathie classique en lien avec une insuffisance hépatique, un syndrome de consommation ou une avitaminose K.

Dans la série de 35 patients que nous avons étudiée, 34 sont atteints de CDG de type 1. Parmi eux, 24 présentent un PMM2-CDG (CDG le plus fréquent), 5 un MPI-CDG, 2 un ALG6-CDG, 1 un ALG12-CDG, 1 un DPM1-CDG et 1 un DPAGT-CDG. Un seul patient est atteint d'un CDG de type 2 (CCDC115-CDG). Parmi les patients PMM2-CDG, le déficit en AT est le déficit le plus fréquent (63% des patients), suivi du déficit en FXI (50%), puis en PC (29%) et en PS (25%). Enfin, une baisse du FIX n'est retrouvée que chez 2 patients (8%). La fréquence des déficits observée est semblable à ce qui est décrit dans la littérature. Nous avons participé à une revue de la littérature visant à recenser les anomalies de la coagulation chez les patients PMM2-CDG. Des anomalies de la coagulation ont été recensés chez 344 patients atteints de PMM2-CDG⁵⁷ (**Annexe II**). Le déficit en AT, anticoagulant majeur du système de la coagulation, est le

plus fréquent avec 157 cas décrits, suivi de près par le FXI et la PC déficitaires dans 125 et 120 cas respectivement. De plus, 40 PMM2-CDG présentent un déficit en PS et seulement 17 ont une diminution du FIX. Parmi les 5 patients atteints de MPI-CDG, 2 sont déficitaires en AT, 3 en FXI, tandis que le déficit en PC, PS et FIX est retrouvé chez un seul et même patient. Le MPI-CDG est un CDG qui a l'avantage de pouvoir être traité par supplémentation en mannose. Cette supplémentation améliore la clinique des patients mais aussi les anomalies de l'hémostase^{180,183,298}. Ainsi, les anomalies de la coagulation rencontrées chez les patients atteints de MPI-CDG sont à interpréter en fonction de la supplémentation en mannose et permettent d'évaluer l'observance des patients. Dans notre série, 2 patients apparentés sont atteints d'ALG6-CDG, tous deux porteurs d'un déficit en AT (activité réduite à 20%) et FXI (activité réduite à 43%) compatible avec ce qui est décrit dans la littérature^{178,179}. Le patient atteint de DPM1-CDG, associant des anomalies de N- et O-glycosylation par défaut de synthèse du dolichol-P-mannose présente un déficit modéré en AT (63%). La littérature rapporte un cas de DPM1-CDG également porteur d'un déficit modéré en AT²⁹⁹. Parmi 24 cas de patients atteints de DPAGT1-CDG décrits dans la littérature, 3 déficits en AT et 1 déficit en PS sont rapportés³⁰⁰. Pour finir, le seul patient de notre série atteint d'un CDG de type 2 perturbant à la fois la N- et la O-glycosylation (CCDC115-CDG) présente une diminution très modérée en AT (74%), FXI (52%) et PS (40%) en accord avec la littérature²⁸. L'AT et le FXI sont donc les deux principales protéines de la coagulation affectées par le défaut de glycosylation pouvant s'expliquer par l'impact de l'absence de glycosylations dans les différentes fonctions de ces protéines. En effet, les glycosylations de l'AT et du FXI ont un impact sur leur sécrétion^{148,165}. La clairance de l'AT est aussi impactée par l'absence de chaînes glycaniques. Ainsi, la digestion des acides sialiques de l'AT ou l'absence de chaîne N-glycanniques entraînent chez le lapin une élimination accélérée de la protéine. Outre leur rôle sur la sécrétion et la clairance de l'AT, les chaînes glycaniques modulent également l'activité de l'AT puisque l'absence de glycosylation en position 135 accroît son affinité pour l'héparine, potentialisant ainsi son activité anticoagulante¹⁷⁷. A l'inverse, les FV et FVIII sont particulièrement riches en glycosylation, néanmoins peu de déficit sont rapportés dans la littérature. Un déficit en FVIII est rapporté dans un cas de STT3-CDG associé à une diminution du facteur vWF¹²⁵, un cas de B4GALT1-CDG¹⁸⁷ et 3 cas de TMEM165-CDG¹⁸⁸. La diminution du FVIII peut être secondaire à un défaut de facteur vWF, ce dernier étant chargé de transporter le FVIII et de le protéger d'une élimination trop rapide. Devant une diminution de FVIII, il

convient donc de mesurer l'activité du facteur vWF, or celle-ci n'est pas toujours rapportée dans les cas de CDG associé à un déficit en FVIII.

La baisse concomitante des facteurs procoagulants et anticoagulants peut entraîner un déséquilibre de la balance hémostatique et favoriser l'apparition de saignement ou au contraire de thrombose. Dans le but d'évaluer l'équilibre hémostatique chez les patients qui présentent des déficits combinés nous avons utilisé un test de coagulation global, le test de génération de thrombine (TGT). A l'inverse des tests de coagulation usuels, la mesure de la génération de thrombine en temps réel intègre l'ensemble des facteurs de la coagulation et les inhibiteurs physiologiques y compris le système de la PC lorsque la TM soluble est ajoutée au système. Ainsi les 35 patients de notre série ont été testés en TGT en présence et en absence de TM soluble. En l'absence de TM soluble, la génération de thrombine est significativement augmentée chez les patients atteints de CDG comparé aux sujets contrôles. Afin de mobiliser le système inhibiteur de la PC, le test est également réalisé en présence de TM soluble et montre un défaut de mobilisation de la PC chez les patients. Le profil hypercoagulant observé en l'absence de TM est donc accentué par ce défaut de mobilisation du système de la PC. Étant donné les déficits combinés en facteurs procoagulants (principalement le FXI) et en inhibiteurs de la coagulation (AT, PC et PS), nous aurions pu nous attendre à ce que l'équilibre hémostatique soit conservé comme ce qui est observé chez les nouveau-nés²²² ou les patients cirrhotiques²²¹ chez qui la diminution de la génération de thrombine en l'absence de TM est contrebalancé par un défaut de mobilisation de la PC. Tandis que les déficits combinés en facteurs procoagulants et anticoagulants des nouveau-nés ou des patients cirrhotiques résultent d'un défaut de synthèse hépatique de l'ensemble des protéines de la coagulation, les déficits observés dans le CDG ne concernent finalement que peu de facteurs procoagulants (ciblant surtout le FXI) et deux systèmes inhibiteurs (l'AT et le système de la PC) concourant probablement au déséquilibre de la balance hémostatique vers un profil hypercoagulant. L'étude en TGT présente cependant quelques limites. D'une part un second inhibiteur de la thrombine, l' α 2-macroglobuline, elle aussi glycosylée, peut être impactée dans le CDG et moduler la régulation de la coagulation¹⁷⁴. Or l' α 2-macroglobuline n'est pas explorée par le TGT. D'autre part, dans nos conditions de réalisation du TGT, la génération de thrombine est principalement impactée par le déficit en AT. C'est à faibles concentrations de FT que le TGT est le plus sensible au déficit en FXI^{301–303}. Cependant, les

résultats obtenus à faible concentrations de FT sont similaires à ceux obtenus à forte concentration.

Le phénotype prothrombotique que nous avons mis en évidence in vitro chez les patients CDG a été retrouvé en particulier chez tous les patients qui avaient un ou plusieurs antécédents de thrombose ou de SL. De plus, parmi les patients qui présentaient un phénotype normocoagulant en TGT, aucun d'entre eux n'avaient eu de thromboses ou de SL auparavant. Ces résultats suggèrent fortement que les patients les plus à risque de développer une thrombose ou un SL sont ceux qui présentent des anomalies de la coagulation, en particulier un profil hypercoagulable en TGT. Dans notre série de 35 patients, la majorité des complications aiguës fut la survenue d'un SL chez 7 patients. Un évènement thrombotique est rapporté chez deux patients tandis qu'un patient a développé les deux.

La physiopathologie du SL n'est à l'heure actuelle pas élucidée. Bien qu'aucune occlusion ischémique n'ait été mise en évidence à l'imagerie au cours des SL, un œdème cytotoxique/vasogénique peut accompagner ces évènements^{179,200,304}. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. L'une d'entre elles s'appuie sur la similitude des évènements observée dans les canalopathies familiales et suggère qu'une hypoglycosylation des canaux calciques voltage dépendant $Ca_v2.1$ entraîne un gain de fonction de ces canaux pouvant être impliqué dans la survenue des SL²⁰⁰. Une seconde hypothèse à laquelle l'état d'hypercoagulabilité pourrait participer est l'hypothèse de la formation de micro-thrombi (non visibles à l'imagerie) à l'origine d'une ischémie transitoire. Ce mécanisme est décrit dans une autre pathologie, la migraine avec aura²⁰¹. Il a en effet été montré dans un modèle murin que l'injection intra-vasculaire de micro-thrombi induit les ondes lentes de dépolarisation observées dans l'aura migraineuse²⁰². La migraine avec aura multiplie par 2 le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC)³⁰⁵ et est associée à une élévation des marqueurs d'activation endothéliale comme l'antigène du facteur vWF, le fibrinogène et l'activateur du plasminogène, le tissu plasminogen activator (t-PA)³⁰⁶. Le facteur vWF est un bon reflet de l'activation endothéliale^{307–309} et nous avons pu le mesurer chez 18 de nos patients seulement. Le taux médian d'antigène s'élève à 115% [IQ : 86-147%] pour des valeurs de références comprises entre 50 et 150%. Les taux de vWF sont dans les valeurs de la normale, néanmoins on remarque une importante hétérogénéité des taux parmi les patients. Afin de déterminer si les patients qui présentent les taux les plus élevés sont plus susceptibles de développer une complication thrombotique ou un SL, une étude prospective sur un plus grand nombre de

patients pourrait permettre de répondre à la question. Un autre biomarqueur de la dysfonction endothéliale est la TM dont l'expression membranaire est diminuée et la sécrétion sous forme soluble augmentée dans de nombreuses pathologies vasculaires associées à une atteinte endothéliale. La concentration plasmatique de TM soluble est modérément mais significativement augmentée (1,4 fois) chez les patients atteints de CDG comparé à la population contrôle. Cette élévation traduit probablement une dysfonction des cellules endothéliales comme cela a déjà été constaté dans l'athérosclérose^{310,311}, l'AVC cardio-embolique³¹² ou la CIVD associé au sepsis³¹³ par exemple. Outre l'existence d'un profil hypercoagulant observé in vitro chez les patients atteints de CDG, la présence en plus de biomarqueurs d'activation endothéliale à l'état basal chez ces patients suggère que leur fonction endothéliale est très certainement altérée.

L'endothélium est une interface dynamique entre le sang et les vaisseaux et joue un rôle capital dans le contrôle de l'hémostase et de l'homéostasie des tissus en formant une barrière entre la circulation sanguine et les tissus. La présence de biomarqueurs suggérant une activation endothéliale chez les patients atteints de CDG nous a amenés à étudier les propriétés de l'endothélium affecté par un défaut de glycosylation. Afin de mieux comprendre l'implication des glycosylations dans la survenue des événements vasculaires et neurologiques rencontrés dans cette population de malades, nous avons choisi de développer un modèle cellulaire à partir d'une lignée de cellules endothéliales issue de la microcirculation cérébrale hCMEC/D3. A l'aide d'une méthode d'interférence d'ARN, nous avons inactivé l'enzyme PMM2 responsable du CDG le plus fréquent, le PMM2-CDG. Nous avons obtenu avec ce modèle une inactivation modérée de PMM2 de telle sorte que l'expression protéique et d'ARNm est réduite d'environ 50% seulement par rapport aux cellules wild-type. Une réduction plus importante de l'expression de PMM2 est probablement non viable dans notre modèle cellulaire. En effet l'absence totale de PMM2 est létale chez la souris^{314,315} de même que l'homozygotie pour la mutation R^{141H}, associée à une expression nulle de PMM2, n'a jamais été retrouvée chez les patients⁵³. L'inactivation de PMM2 est cependant suffisante pour induire un déficit quantitatif de chaînes glycaniques comme l'atteste la présence de forme hypoglycosylées de LAMP1, une protéine lysosomale ubiquitaire qui comporte près de 20 sites de N-glycosylation.

Physiologiquement, l'endothélium est doté de propriétés anticoagulantes qui veillent à limiter la génération permanente de thrombine. Plusieurs acteurs participent à ce phénomène. D'abord les glycosaminoglycannes du glycocalyx (héparane sulfate et dermatane sulfate) potentialisent l'activité de deux anticoagulants naturels, l'AT et le cofacteur II de l'héparine^{316,317}, puis le TFPI, produit par l'endothélium inhibe l'activité du complexe TF/FVIIa³¹⁸. Enfin l'endothélium exprime deux récepteurs membranaires nécessaires à l'activation du système anticoagulant de la PC, la TM et l'EPCR.

L'endothélium n'acquiert des propriétés procoagulantes qu'en présence de divers stimuli inflammatoire et infectieux entre autres. In vitro, l'expression du FT est induite par les cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1), le LPS, ou la C-reactive protein (CRP) par exemple^{319,320}. Nous avons étudié dans un premier temps les capacités de l'endothélium inactivé pour PMM2 à mobiliser le système de la PC. Nous avons mis en évidence un défaut d'activation de la PC à la surface des cellules endothéliales dû à une baisse de transcription des deux récepteurs impliqués dans l'activation de la PC, c'est à dire la TM et l'EPCR. Ce défaut d'activation de la PC à la surface de l'endothélium, associé à un déficit en PC (observé chez 29% des patients) sont des facteurs de risque de thrombose. En effet l'absence d'expression de TM chez l'animal se traduit par la survenue d'évènement thrombotique massif³²¹. Cette diminution des transcrits de THBD et PROCR et donc d'expression de la TM et de l'EPCR ne semblent pas être lié à un défaut global de transcription puisque le récepteur PAR1 est normalement exprimé dans notre modèle. L'hypothèse de dégradation des transcrits de la TM et de l'EPCR a été écartée dans la mesure où la demi-vie de leurs ARNm est similaire entre les cellules inactivées et les cellules contrôle. Nous avons donc fait l'hypothèse d'un impact du défaut de N-glycosylation sur la régulation de la transcription de ces 2 gènes. Ainsi, divers stimuli régulent la transcription de la TM, certains positivement comme, par exemple, le stress thermique^{322,323} ou les forces de cisaillement laminaire anti-oxydantes. Ces dernières ont des effets positifs sur l'activité du facteur de transcription Kruppel-like factor 2 (KLF2) vis-à-vis du promoteur de la TM à l'origine de l'augmentation de l'expression de la TM. Un autre facteur de transcription de la famille des KLF (KLF4) régule aussi positivement la transcription de la TM. En effet la transduction de cellules EA.hy926 ou HUVECs par un lentivirus codant pour KLF2 ou KLF4 induit une augmentation significative de l'expression de la TM^{324,325}. Afin de comprendre la diminution d'expression de la TM par les cellules inactivées pour PMM2 observée, nous avons voulu mesurer l'expression des facteurs de transcription KLF2 et KLF4

dans notre modèle. L'expression protéique de KLF4 est réduite à $53\% \pm 16\%$ des contrôles tandis que l'expression de KLF2 ne peut être mesurée en western blot compte tenu d'un manque de spécificité de l'anticorps utilisé. Les niveaux de transcrits KLF2 et KLF4 ont été quantifiés par qPCR et montrent respectivement une expression réduite à $58\% \pm 17\%$ et $34\% \pm 18\%$ de celle des cellules contrôle.

D'autres stimuli régulent négativement l'expression de la TM comme le stress oxydatif, l'hypoxie, le $\text{TNF}\alpha_{326,327}$, la thrombine³²⁸ ou encore, la CRP. Cette régulation négative concourt à la perte de potentiel anticoagulant observé dans le sepsis, l'inflammation et le cancer. Les épisodes de SL surviennent généralement au décours d'une fièvre ou d'une infection intercurrente qui pourraient ainsi déséquilibrer l'expression de la TM et participer à la survenue de ces accidents. La répression de la TM induite par les cytokines pro-inflammatoires, en particulier le $\text{TNF}\alpha$ s'accompagne de l'activation de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ ^{329,330}. Le promoteur de la TM ne contient cependant pas la séquence consensus nécessaire à la fixation des protéines de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ mais il a été montré qu'il existait une compétition entre la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ et la protéine p300 coactivateur de la transcription de la TM³³⁰. De plus, Pathak et al ont montré que l'inhibition de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ entraînait une surexpression de la TM par les cellules endothéliales en présence ou non de $\text{TNF}\alpha_{324}$ par l'intermédiaire de KLF2. Nous nous sommes donc demandé si une hyper activation de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ à l'état basal pouvait être à l'origine de la diminution de l'expression de la TM. Nous avons donc mesuré l'activation des facteurs de transcription de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ dans notre modèle et n'avons mis en évidence aucune hyper activation de cette voie sur les cellules inactivées pour PMM2 à l'état basal. En revanche l'inhibition de la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ à l'aide d'un dérivé d'imidazoquinoxaline (BMS), inhibiteur pharmacologique d'IKK β permet d'augmenter de manière significative l'expression de la TM en cytométrie de flux sur les cellules inactivées pour PMM2 ($1\,419 \pm 5\,132$ vs $14\,485 \pm 3\,188$, $p < 0.01$ pour les cellules inactivées ; $113\,594 \pm 7\,629$ vs $178\,121 \pm 39\,495$, $p > 0.05$ pour les contrôles). Ces résultats suggèrent que les cellules inactivées pour PMM2 sont probablement capables d'augmenter l'expression de KLF2 et KLF4 lorsque la voie $\text{NF}\kappa\text{B}$ est inhibée.

Dans la mesure où l'expression des transcrits KLF2 et KLF4 est diminuée dans notre modèle il se pourrait que cette observation participe également à la perte d'intégrité vasculaire que nous observons sur nos cellules. En effet KLF2 et KLF4 ont pour rôle de maintenir la quiescence cellulaire et l'intégrité vasculaire en réponse au shear stress. L'importance de KLF2 et KLF4 est

mis en exergue par la mortalité observée (100% à J9 de vie) chez les souris double knock-out dans les cellules endothéliales³³¹. Ces souris développent entre autres une atteinte cardiaque, des lésions hémorragiques cérébrale, pulmonaire, cardiaque et sous cutanée ainsi que des symptômes de type SL. La délétion de KLF2 et KLF4 entraîne une dysfonction vasculaire accompagnée d'une coagulopathie systémique. La perte des jonctions adhérentes et serrées ainsi que l'augmentation de l'angiopoïétine 2 dans la circulation traduisent l'atteinte vasculaire, tandis que la thrombopénie et l'élévation des d-dimères signent la coagulopathie. L'expression de la TM est quasi nulle chez ces souris.

D'autre part, nous avons étudié la capacité des cellules inactivées pour PMM2 à former une barrière perméable. Ainsi, nous avons mis en évidence une hyperperméabilité à l'état basale en partie expliquée par la perte d'intégrité des jonctions adhérentes formées par la VE-cadherine. De plus, nous avons montré que la barrière formée par les cellules inactivées pour PMM2 est plus sensible à un stimulus destabilisateur comme la thrombine. Enfin, les effets cytoprotecteurs de la PCA sont conservés.

La physiopathologie du SL est bien moins connue que celle de l'AVC ischémique, néanmoins il peut s'accompagner comme l'AVC ischémique d'un œdème cytotoxique et vasogénique^{179,200,304}. C'est la dysfonction endothéliale décrite dans l'AVC ischémique qui participe à la formation de l'œdème vasogénique et aux éventuelles complications hémorragiques³³²⁻³³⁴. En particulier, les matrice métalloprotéinases (MMPs), induites par l'hypoxie et l'inflammation, dégradent les protéines constituant les jonctions serrées. Les jonctions adhérentes sont également impactées au cours de l'ischémie puisque l'expression de la VE-cadherine est diminuée chez la souris soumise à une ischémie focale cérébrale^{335,336}. De plus l'activation du promoteur de la VE-cadherine et l'augmentation de son expression après une ischémie cérébrale chez le rat suggère que la reformation des protéines adhérentes participe au mécanisme de réparation de la barrière³³⁷. Les épisodes de SL ne se rencontrent pas uniquement dans le CDG mais dans d'autres pathologies comme le syndrome MELAS (Myopathie mitochondriale, Encéphalopathie, Acidose Lactique et Stroke-like) par exemple. La dysfonction endothéliale est aussi une des hypothèses physiopathologiques avancée pour expliquer le SL dans cette pathologie³⁰⁴. La survenue du SL est très certainement multifactorielle dans le CDG et la coexistence d'un phénotype hypercoagulant avec une altération de la perméabilité endothéliale pourrait favoriser la survenue de ces événements, en particulier en situation de fièvre au cours de laquelle la stabilité de PMM2 est réduite⁵⁴.

Les résultats obtenus à l'aide de lignées cellulaires (hCMEC/D3) sont informatifs mais doivent être complétés par des études sur cellules primaires. Pour cela nous avons mis en place une étude clinique visant à isoler les progéniteurs endothéliaux circulants issus de patients atteints de CDG afin d'en étudier le phénotype. Le protocole de recherche clinique prévoyait d'inclure 8 patients atteints de PMM2-CDG (4 avec antécédent de SL et 4 sans antécédent) suivis à l'hôpital Necker et consistait en un prélèvement de 24 à 32 mL de sang selon l'âge des patients pour isoler les progéniteurs endothéliaux. Après avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP/59-17 ID RCB: 2017-A02141-52), nous avons isolé avec succès les progéniteurs endothéliaux pour 5 d'entre eux d'après Mauge et al³³⁸. Les cellules mononuclées sont d'abord isolées par un gradient de densité puis mises en culture sur une surface recouverte de fibronectine. Dans un délai de 14 à 21 jours des colonies de BOECs (Blood outgrowth endothelial cells) apparaissent³³⁹ et présentent toutes les caractéristiques de cellules endothéliales matures³⁴⁰. Les cellules peuvent ensuite être utilisées jusqu'à passage 7. A l'inverse du modèle cellulaire hCMEC/D3, les BOECs issus des patients ne présentent pas d'altération de la génération de PCA dans la mesure où l'expression des récepteurs membranaires TM et EPCR est comparable à celle de témoins. De plus l'intégrité de barrière semble beaucoup moins impactée dans la mesure où la perturbation induite par la thrombine entraîne une diminution de la TEER plus importante sur les BOECs de patients mais de manière non significative. Chez les patients la diminution de la résistance endothéliale s'élève à $123\% \pm 20\%$ ($p=0.1$) de celle observée chez les témoins. Ce phénotype, plus modéré que celui observé sur le modèle hCMEC/D3, était attendu puisque les patients ne présentent, en dehors des événements aigus, aucun signe d'hyperperméabilité endothéliale. De façon plus surprenante, nous n'avons pas observé de différence significative sur la génération de PCA lorsque les BOECs ont été soumis à différents stimuli tels que la thapsigargine, la déprivation en glucose ou le chlorure de cobalt (résultats non présentés dans le manuscrit). Devant l'absence de différences significative dans les essais réalisés (expression de la TM et de l'EPCR, génération de protéine C activée ou encore perméabilité à l'état basal ou après stimulation), nous avons décidé d'utiliser une approche plus globale consistant en une étude élargie du profil protéique, pour mettre en évidence une différence entre les BOECs issues de contrôles ou de patients atteint de PMM2-CDG. Ainsi nous avons traité les cellules d'un patient (le plus sévère cliniquement de la série) et un témoin avec du $\text{TNF}\alpha$ pendant 24h suivi d'un choc thermique (42°C) pendant 2h. Puis après une période de récupération de 4h à 37°C

nous avons lysé les cellules. Nous avons ainsi étudié les principales voies MAP (Mitogen activated protein) kinase (ERK1/2, JNK1-3, les isoformes de p38 et quelques protéines intra-cellulaires (Akt, GSK-3, p70, TOR, p53 et CREB) sur lesquelles nous n'avons observé aucune différence entre patient et témoin. L'étude des cytokines fut la plus intéressante et a révélé une augmentation chez le patient de l'IL8 intra-cellulaire à l'état basal (environ 3 fois). Après stimulation la quantité d'IL8 intra-cellulaire augmente approximativement 6 fois chez le témoin tandis qu'elle double seulement chez le patient pour à peine atteindre le niveau du contrôle. En revanche la quantité d'IL8 mesuré dans le surnageant est comparable entre patient et témoin. La différence observée la plus marquée concerne le facteur pro-angiogénique angiopoïétine 2, qui, comme l'IL8, est contenu dans les corps de Weibel-Palade et dont la sécrétion est quasi nulle chez le patient comparé au témoin. Ces premiers résultats suggèrent un défaut probable de sécrétion des corps de Weibel-Palade. Les mesures d'angiopoïétine 2 devront être confirmées sur l'ensemble des patients. Si ces données sont confirmées, elles suggéreront de nouvelles hypothèses physiopathologiques impliquant la voie de l'angiogenèse.

L'hétérogénéité inter-individuelle peut expliquer en partie l'absence de différence significative observée entre les BOECs de patient et témoin. De plus, bien que les 5 patients pour lesquels nous avons isolés des BOECs soient atteints de PMM2-CDG, leur profil mutationnel est différent. Enfin, nous pouvons supposer que les progéniteurs des patients avec les atteintes endothéliales les plus sévères n'ont peut-être pas permis l'isolement des BOECs. En effet les prélèvements d'1/5 patients avec antécédent a abouti à l'apparition de clones contre 3/5 sans antécédent.

Pour conclure, nous avons mis en évidence à l'aide du test de génération de thrombine un profil hypercoagulant chez les patients atteints de CDG porteurs d'une coagulopathie, particulièrement chez les patients avec antécédents de thrombose ou de SL.

Nous avons développé un modèle endothélial cérébral déficitaire en PMM2 grâce auquel nous avons mis en évidence un défaut de la perméabilité endothéliale et une dysfonction vasculaire. De plus nous avons montré que l'inactivation de PMM2 entraîne la perte d'une des propriétés anticoagulantes de l'endothélium, pouvant concourir à la survenue de complications vasculaires.

Annexes

Annexe I : Classification des CDG par localisation cellulaire : état des lieux en 2017

Défaut localisé dans le cytosol				
Nom du CDG	Protéine atteinte	Organes et tissus affectés	Profil de la Tf	Mode de transmission
Défaut de N-glycosylation				
<i>Défaut de synthèse de monosaccharides</i>				
GMPPA-CDG	Guanosine diphosphate mannose pyrophosphorylase A	Fibres nerveuses œsophage, glandes lacrymales et neurones		
GMPPB-CDG	Guanosine diphosphate mannose pyrophosphorylase B	Cerveau, muscles squelettiques, yeux, cœur		
MPI-CDG*	Mannose-6-phosphate isomérase	Intestin, foie	Type 1	
PMM2-CDG*	Phosphomannomutase 2	Système nerveux, tissu adipeux, et presque tous les autres organes	Type 1	
Défaut de O-glycosylation				
<i>Défaut de synthèse des O-N-acétylglucosaminylglycannes</i>				
EOGT-CDG	EGF domain-specifi O-GlcNAc transférase	Peau, squelette		
Défaut dans d'autres voies de glycosylation ou défaut multiple				
<i>Défaut de synthèse du dolichol</i>				
DHDDS-CDG	Déhydrodolichyl diphosphate	Rétine	Type 1	
<i>Défaut de synthèse des monosaccharides</i>				
CAD-CDG	Activités carbamoyl-phosphate synthetase 2 (CPS2) et aspartate transcarbamylase (ATCase) de l'enzyme trifonctionnelle CAD	Cerveau, cellules sanguines		
GFPT1-CDG	Glutamine: fructose 6-phosphate amidotransférase 1	Jonctions neuromusculaires, muscles squelettiques		
GNE-CDG	UDP-GlcNAc 2-épimérase/Man-NAC kinase	Muscles squelettiques, rarement muscles cardiaques		

NANS-CDG	Acide N-acétylneuraminique synthase	Cerveau, squelette		
PGM1-CDG	Phosphoglucomutase 1	Uvule, cœur, foie, muscles, glandes endocrines	Type 2	
PGM3-CDG	Phosphoglucomutase 3	Cerveau, système immunitaire, squelette		
<i>Défaut de synthèse des sucres-nucléotides</i>				
CPS2-CDG	Carbamylphosphate synthétase 2	Cerveau, intestin, rein, globules rouges		

Défaut localisé dans le réticulum endoplasmique				
Nom du CDG	Protéine atteinte	Organes et tissus affectés	Profil de la Tf	Mode de transmission
Défaut de N-glycosylation				
ALG1-CDG*	Mannosyltransférase 1	Cerveau +/- yeux, cœur, foie, cellules bêta, reins, gonades	Type 1	
ALG2-CDG	Mannosyltransférase 2	Cerveau, muscles squelettiques, yeux, jonctions neuromusculaires	Type 1	
ALG3-CDG	Mannosyltransférase 6	Cerveau, squelette	Type 1	
ALG6-CDG*	Glucosyltransférase 1	Cerveau +/- yeux, système gastro-intestinal, cœur, foie, squelette	Type 1	
ALG8-CDG*	Glucosyltransférase 2	Cerveau +/- yeux, peau, foie, intestin	Type 1	
ALG9-CDG*	Mannosyltransférase 7/9	Cerveau, foie, reins, +/- tissu adipeux, cœur, squelette, intestin	Type 1	
ALG11-CDG	Mannosyltransférase 4/5	Cerveau, système auditif	Type 1	
ALG12-CDG	Mannosyltransférase 8	Cerveau, squelette, cœur, système immunitaire et génital	Type 1	
ALG13-CDG*	UDP-GlcNAc: Dol-P-GlcNAc-P transférase	Cerveau, yeux, foie	Type 1	Lié à l'X
ALG14-CDG	UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc transférase	Jonctions neuromusculaires (syndrome congénital myasthénique)	Type 1	

DDOST-CDG	Oligosaccharyltransférase sous-unité DDOST	Cerveau, yeux, foie	Type 1	
DPAGT1-CDG	UDP-GlcNAc: Dol-P-GlcNAc-P	Cerveau, jonctions neuromusculaires (syndrome congénital myasthénique)	Type 1	
MOGS-CDG	Mannosyl-oligosaccharide glycosidase (glucosidase 1)	Cerveau, squelette, système immunitaire		
GANAB-CDG*	Glucosidase II sous-unité α	Foie, rein (polykystique)		AD
PRKCSH-CDG*	Glucosidase II sous-unité β	Foie, rein (polykystique)		AD
RFT1-CDG	Flippase of Man5GlcNAc2-PP-Dol	Cerveau, appareil auditif	Type 1	
STT3A-CDG*	Oligosaccharyltransférase sous-unité STT3A	Cerveau, tractus gastro-intestinal	Type 1	
STT3B-CDG	Oligosaccharyltransférase sous-unité STT3B	Cerveau, nerf optique, tractus gastro-intestinal	Type 1 (modéré)	
SSR3-CDG	Séquence signal récepteur 3 du complexe TRAP	Cerveau, poumons, tractus gastro-intestinal	Type 1 (disialo uniquement)	
SSR4-CDG	Séquence signal récepteur 4 du complexe TRAP	Cerveau, système respiratoire, squelette	Type 1 (modéré)	Lié à l'X
TUSC3-CDG	Oligosaccharyltransférase sous-unité TUSC3	Cerveau	Type 1	
Défaut de O-glycosylation				
<i>Défaut de synthèse des O-xylosyl/N-acetylgalactosaminyglycannes</i>				
SLC35D1-CDG	Solute carrier family 35 (transporteur de UDP-acide glucuronique/UDP-N-acetylgalactosamine) membre D1	Squelette (létal à la naissance ou en période néonatale)		
<i>Défaut de synthèse des O-glucosylglycannes</i>				
POGLUT1-CDG*	Protéine O-glucosyltransférase 1	Peau (hypo ou hyperpigmentation)		AD
Défaut de glycosylation des lipides et de synthèse des glycosylphosphatidylinositols				
<i>Défaut de synthèse des glycosylphosphatidylinositols</i>				

PIGA-CDG*	UDP-GlcNAc: phosphatidylinositol N- acetylglucosaminyltransférase	Cerveau, cœur, foie, rein, peau		Lié à l'X
PIGC-CDG	UDP-GlcNAc: phosphatidylinositol N- acetylglucosaminyltransférase	Cerveau		
PIGG-CDG	Glycosylphosphatidylinositol ethanolamine phosphate transférase 2	Cerveau		
PIGL-CDG	GlcNAc-phosphatidylinositol dé- acétylase	Cerveau, yeux, système auditif, cœur, peau		
PIGM-CDG	Dol-P-Man: phosphatidylinositol mannosyltransférase 1	Cerveau, veine hépatique		
PIGN-CDG	Glycosylphosphatidylinositol éthanolamine phosphate transférase 1	Cerveau, squelette, cœur, reins		
PIGO-CDG	Glycosylphosphatidylinositol éthanolaminephosphate transférase 3	Cerveau, lèvres, doigts, orteils, anus/rectum, système auditif, cœur		
PIGQ-CDG	UDP-GlcNAc: phosphatidylinositol N- acetylglucosaminyltransférase	Cerveau		
PIGT-CDG	PIGT transamidase	Cerveau, yeux, cœur, reins, squelette		
PIGV-CDG	Dol-P-Man: phosphatidylinositol mannosyltransférase 2	Cerveau, doigts, orteils, moins fréquent lèvres, palais, anus- rectum, système auditif		
PIGW-CDG	Phosphatidylinositol acylase	Cerveau, squelette		
PIGY-CDG	UDP-GlcNAc: phosphatidylinositol N- acetylglucosaminyltransférase	Cerveau, doigts, orteils		
PGAP1-CDG	Phosphatidylinositol déacylase	Cerveau		
Défaut dans d'autres voies de glycosylation ou défaut multiple				
Défaut de synthèse du dolichol				
DOLK-CDG	Dolichol kinase	Cerveau, cœur, peau	Type 1	

NUS1-CDG	Nogo-B récepteur (sous-unité de la cis-prenyltransférase)	Cerveau, yeux, squelette	Type 1	
SRD5A3-CDG	Stéroïde 5 α -réductase 3	Cerveau, yeux, cœur, peau, articulations	Type 1	
<i>Défaut d'utilisation ou de recyclage du dolichol</i>				
DPM1-CDG	GDP-Man: Dol-P mannosyltransférase 1 (Dol-P-Man synthase 1)	Cerveau, yeux, muscles squelettiques	Type 1	
DPM2-CDG	GDP-Man: Dol-P mannosyltransférase 2 (Dol-P-Man synthase 2)	Cerveau, muscles squelettiques	Type 1	
DPM3-CDG	GDP-Man: Dol-P mannosyltransférase 3 (Dol-P-Man synthase 3)	Squelette, muscle cardiaque	Type 1	
MPDU1-CDG	Man-P-Dol utilisation 1	Cerveau, yeux, peau	Type 1	
<i>Défaut du complexe v-ATPase</i>				
ATP6AP1-CDG*	Protéine accessoire Ac45 du complexe V-ATPase	Cerveau, cellules B, foie (muscles, système auditif)	Type 2	Lié à l'X
<i>Autres défauts</i>				
TRAPPC11-CDG	Trafficking protein particle complex (TRAPPIII), sous-unité 11	Muscles		

Défaut localisé dans le golgi				
Nom du CDG	Protéine atteinte	Organes et tissus affectés	Profil de la Tf	Mode de transmission
Défaut de N-glycosylation				
MAN1B1-CDG*	Golgi α 1-2 mannosidase 1	Cerveau, boîte crânienne, tissu adipeux	Type 1	
MGAT2-CDG*	N-Acetylglucosaminyltransférase 2	Cerveau, squelette, intestin, système immunitaire	Type 2	
Défaut de O-glycosylation				
<i>Défaut de synthèse des O-xylosylglycannes</i>				

B4GALT7-CDG	B-1,4-galactosyltransférase 7	Cerveau, squelette, articulations, peau		
B4GALT6-CDG	B-1,3-galactosyltransférase 6	Squelette, articulations, peau		
B3GAT3-CDG	B-1,3-glucuronyltransférase 3	Cerveau, aorte, coeur, squelette, articulations, peau, dents		
CHSY1-CDG	Chondroïtine β -1,4-N-acetylgalactosaminyltransférase 1 (chondroïtine synthase 1)	Cerveau, dents, squelette, système auditif		
EXT1-CDG*	Exotosine 1	Cartilage		AD
EXT2-CDG*	Exotosine 2	Cartilage		AD
XYLT1-CDG	Xylosyltransférase 1	Cerveau, squelette, articulations, tissu adipeux		
XYLT2-CDG	Xylosyltransférase 2	Cerveau, yeux, cœur, os, système auditif		
<i>Défaut de synthèse des O-N-acetylgalactosaminalglycannes</i>				
GALNT3-CDG	UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransférase 3	Tissu sous-cutané		
<i>Défaut de synthèse des O-fucosylglycannes</i>				
LFNG-CDG	O-fucose-spécifique β -1,3-N-acetylglucosaminyltransférase	Squelette axial et muscles associés		
POFUT1-CDG*	Protéine O-fucosyltransférase 1	Peau		AD
<i>Défaut de glycosylation des lipides et de synthèse des glycosylphosphatidylinositols</i>				
<i>Défaut de glycosylation des lipides</i>				
B4GALNT1-CDG	B-1,4-N-acetylgalactosaminyltransférase 1 (GM2 synthase)	Cerveau, nerfs périphériques, gonades		
ST3GAL5-CDG	Lactosylcéramide α -2,3-sialyltransférase (GM3 synthase)	Cerveau, système auditif, peau		
<i>Défaut de la synthèse des glycosylphosphatidylinositols</i>				
PGAP2-CDG	Phosphatidylinositol glycérol acylase	Cerveau		
PGAP3-CDG	Phosphatidylinositol glycérol déacylase	Cerveau, squelette		
<i>Défaut dans d'autres voies de glycosylation ou défaut multiple</i>				

<i>Défaut de glycosyltransférases</i>				
B4GALT1- CDG*	B-1,4-galactosyltransferase	Face (dysmorphisme), yeux (myopie)	Type 2	
ST3GAL3-CDG	B-galactoside α -2,3- sialyltransférase 3	Cerveau		
<i>Défaut de transporteurs des sucres-nucléotides</i>				
SLC35A1- CDG*	CMP-sialic acid transporteur	Cerveau, cœur, reins, plaquettes	Type 2	
SLC35A2-CDG	CMP-galactose transporteur	Cerveau, yeux, système gastro- intestinal, squelette	Type 2	Lié à l'X
SLC35A3-CDG	CMP-GlcNAc transporteur	Cerveau, squelette		
SLC35C1- CDG*	CMP-fucose transporteur	Cerveau, boîte crânienne, neutrophiles		
<i>Défaut du complexe COG</i>				
COG1-CDG	COG composant 1	Cerveau, squelette	Type 2	
COG2-CDG	COG composant 2	Cerveau, foie	Type 2	
COG4-CDG	COG composant 4	Cerveau, face	Type 2	
COG5-CDG	COG composant 5	Cerveau, système auditif, vision, foie, vessie	Type 2	
COG6-CDG*	COG composant 6	Cerveau, système gastro-intestinal incluant le foie, système immunitaire	Type 2	
COG7-CDG	COG composant 7	Cerveau, squelette, peau, système gastro-intestinal incluant le foie, cœur	Type 2	
COG8-CDG	COG composant 8	Cerveau, yeux, système nerveux périphérique	Type 2	
<i>Défaut du complexe v-ATPase</i>				
ATP6V0A2- CDG*	V0 sous-unité A2 de la V- ATPase	Peau (cutis laxa), cerveau (développement intellectuel presque normal), yeux, système neuromusculaire, squelette	Type 2	
<i>Autres défauts</i>				
TMEM165- CDG*	Protéine transmembranaire (Transmembrane protein 165)	Cerveau, squelette (particulièrement le cartilage), articulations, cœur, foie, reins	Type 2	

VPS13B-CDG (Cohen syndrome)	Protéine vacuolaire (Vacuolar protein sorting-associated protein 13B)	Cerveau, yeux (dystrophie chorio-rétinienne avec myopie), articulations, système immunitaire (neutropénie), tissu adipeux		
--------------------------------	---	---	--	--

Défauts localisés dans le compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-golgi				
Nom du CDG	Protéine atteinte	Organes et tissus affectés	Profil de la Tf	Mode de transmission
Défaut dans d'autres voies de glycosylation ou défaut multiple				
<i>Défaut de COPII</i>				
SEC23B-CDG (anémie congénitale dysérythropoïétique type II)	Composant COPII SEC23B	Globule rouge (atteinte secondaire du cœur, foie, et cellules bêta)		
<i>Autres défauts</i>				
CCDC115-CDG	Coiled-coil domain containing 115	Foie, rate, cerveau	Type 2	
TMEM199 -CDG	Protéine transmembranaire (Transmembrane protein 199)	Foie	Type 2	

Défauts localisés à la membrane plasmique				
Nom du CDG	Protéine atteinte	Organes et tissus affectés	Profil de la Tf	Mode de transmission
Défaut dans d'autres voies de glycosylation ou défaut multiple				
SLC39A8-CDG	Transporteur de manganèse et zinc	Cerveau, squelette, système immunitaire	Type 2	

Défauts localisés à la membrane sarcolemmique				
Défaut de synthèse des O-mannosylglycannes				
B3GALNT2-CDG	B-1,3-N-acetylgalactosaminyltransférase 2	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		

FKTN-CDG	Ribitol-5-phosphate transférase	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		
FKRP-CDG	Ribitol-5-phosphate transférase	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		
ISPD-CDG	Isoprenoid synthase domain-containing protein (CDPribitol synthase)	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		
LARGE-CDG	Acetylglucosaminyltransférase-like protein	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		
POMGNT1-CDG	Protéine O-mannose β -1,2-Nacetylglucosaminyltransférase 1	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		
POMT1-CDG	Protéine O-mannosyltransférase 1	Cerveau, yeux, muscles squelettiques, cœur		
POMT2-CDG	Protéine O-mannosyltransférase 2	Cerveau, yeux, muscles squelettiques		
TMEM5-CDG	O-mannosylation β -1,4-xylosyltransférase	Cerveau, yeux, muscles squelettiques, gonades		

*CDG mentionnés dans le texte.

Tf : transferrine ; AD : autosomique dominant.

D'après Jaeken et Péanne 2017³¹

Annexe II: Revue “International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up”

International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up

Ruqaiah Altassan^{1,2} | Romain Péanne^{3,4} | Jaak Jaeken³ | Rita Barone⁵ | Muad Bidet⁶ | Delphine Borgel⁷ | Sandra Brasil^{8,9} | David Cassiman¹⁰ | Anna Cechova¹¹ | David Coman^{12,13} | Javier Corral¹⁴ | Joana Correia¹⁵ | María Eugenia de la Morena-Barrio¹⁶ | Pascale de Lonlay¹⁷ | Vanessa Dos Reis⁸ | Carlos R Ferreira^{18,19} | Agata Fiumara⁵ | Rita Francisco^{8,9,20} | Hudson Freeze²¹ | Simone Funke²² | Thatjana Gardeitchik²³ | Matthijs Gert^{4,24} | Muriel Girad^{25,26} | Marisa Giros²⁷ | Stephanie Grünewald²⁸ | Trinidad Hernández-Caselles²⁹ | Tomas Honzik¹¹ | Marlen Hutter³⁰ | Donna Krasnewich¹⁸ | Christina Lam^{31,32} | Joy Lee³³ | Dirk Lefeber²³ | Dorinda Marques-da-Silva^{9,20} | Antonio F Martinez³⁴ | Hossein Moravej³⁵ | Katrin Ōunap^{36,37} | Carlota Pascoal^{8,9} | Tiffany Pascreau³⁸ | Marc Patterson^{39,40,41} | Dulce Quelhas^{14,42} | Kimiyo Raymond⁴³ | Peymaneh Sarkhail⁴⁴ | Manuel Schiff⁴⁵ | Małgorzata Seroczyńska²⁹ | Mercedes Serrano⁴⁶ | Nathalie Seta⁴⁷ | Jolanta Sykut-Cegielska⁴⁸ | Christian Thiel³⁰ | Federic Tort²⁷ | Mari-Anne Vals⁴⁹ | Paula Videira²⁰ | Peter Witters^{50,51} | Renate Zeevaert⁵² | Eva Morava^{53,54}

¹Department of Medical Genetic, Montréal Children's Hospital, Montréal, Québec, Canada

²Department of Medical Genetic, King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Saudi Arabia

³Department of Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁴LIA GLYCOLAB4CDG (International Associated Laboratory "Laboratory for the Research on Congenital Disorders of Glycosylation-from Cellular Mechanisms to Cure", France/ Belgium

⁵Child Neurology and Psychiatry Unit, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Catania, Catania, Italy

⁶Department of Paediatric Endocrinology, Gynaecology, and Diabetology, AP-HP, Necker-Enfants Malades Hospital, IMAGINE Institute affiliate, Paris, France

⁷INSERM U1176, Université Paris-Sud, CHU de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France

⁸Portuguese Association for Congenital Disorders of Glycosylation (CDG), Departamento Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

⁹Professionals and Patient Associations International Network (CDG & Allies-PPAIN), Departament o Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

¹⁰Department of Gastroenterology-Hepatology and Metabolic Center, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

¹¹Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

¹²Department of Metabolic Medicine, The Lady Cilento Children's Hospital, Brisbane, Queensland, Australia

¹³Schools of Medicine, University of Queensland Brisbane, Griffith University Gold Coast, Southport, Queensland, Australia

¹⁴Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arixaca, CIBERER, Murcia, Spain

¹⁵Centro de Referência Doenças Hereditárias do Metabolismo - Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

¹⁶Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arixaca, CIBERER, Murcia, Spain

- ¹⁷Reference Center of Inherited Metabolic Diseases, University Paris Descartes, Hospital Necker Enfants Malades, Paris, France
- ¹⁸National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland
- ¹⁹Division of Genetics and Metabolism, Children's National Health System, Washington, District of Columbia
- ²⁰UCIBIO, Departamento Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa Caparica, Caparica, Portugal
- ²¹Sanford Children's Health Research Center, Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, California
- ²²Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Neonatology, University of Pécs, Pécs, Hungary
- ²³Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands
- ²⁴Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium
- ²⁵AP-HP, Necker University Hospital, Hepatology and Gastroenterology Unit, French National Reference Centre for Biliary Atresia and Genetic Cholestasis, Paris, France
- ²⁶Hépatologie pédiatrique department, Paris Descartes University, Paris, France
- ²⁷Secció d'Errors Congènits del Metabolisme -IBC, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERER, Barcelona, Spain
- ²⁸Metabolic Unit, Great Ormond Street Hospital and Institute of Child Health, University College London, NHS Trust, London, UK
- ²⁹Departamento de Bioquímica, Biología Molecular B e Inmunología, Faculty of Medicine, IMIB-University of Murcia, Murcia, Spain
- ³⁰Center for Child and Adolescent Medicine, Department, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany
- ³¹Division of Genetic Medicine, Department of Pediatrics, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington
- ³²Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, Washington
- ³³Department of Metabolic Medicine, The Royal Children's Hospital Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia
- ³⁴Genetics and Molecular Medicine and Rare Disease Paediatric Unit, Sant Joan de Déu Hospital, Barcelona, Spain
- ³⁵Neonatal Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
- ³⁶Department of Pediatrics, University of Tartu, Tartu, Estonia
- ³⁷Department of Genetics, United Laboratories, Tartu University Hospital, Tartu, Estonia
- ³⁸AP-HP, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital R. Debré, Paris, France
- ³⁹Division of Child and Adolescent Neurology, Department of Neurology, Mayo Clinic Children's Center, Rochester, New York
- ⁴⁰Division of Child and Adolescent Neurology, Department of Pediatrics, Mayo Clinic Children's Center, Rochester, New York
- ⁴¹Division of Child and Adolescent Neurology, Department of Medical Genetics, Mayo Clinic Children's Center, Rochester, New York
- ⁴²Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães, Unidade de Bioquímica Genética, Porto, Portugal
- ⁴³Biochemical Genetics Laboratory, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota
- ⁴⁴Metabolic and Genetic department, Sarem Woman's Hospital, Tehran, Iran
- ⁴⁵Neurologie pédiatrique et maladies métaboliques, (C. Farnoux) - Pôle de pédiatrie médicale CHU, Hôpital Robert Debré, Paris, France
- ⁴⁶Neurology Department, Hospital Sant Joan de Déu, U-703 Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain
- ⁴⁷AP-HP, Bichat Hospital, Université Paris Descartes, Paris, France
- ⁴⁸Department of Inborn Errors of Metabolism and Paediatrics, the Institute of Mother and Child, Warsaw, Poland
- ⁴⁹Department of Clinical Genetics, Institute of Clinical Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia
- ⁵⁰Department of Paediatrics and Metabolic Center, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium
- ⁵¹Department of Development and Regeneration, KU Leuven, Leuven, Belgium
- ⁵²Department of Paediatric Endocrinology and Diabetology, Jessa Hospital, Hasselt, Belgium
- ⁵³Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, New York
- ⁵⁴Department of Pediatrics, Tulane University, New Orleans, Louisiana

Correspondence

Eva Morava, Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, 200 First street SW, 55905, Rochester, NY.
Email: morava-kozicz.eva@mayo.edu
[Correction added on 12 March 2019, after first online publication: the full name of the author "Dorinda Marques-de-Silva" has been corrected to "Dorinda Marques-da-Silva"].

Abstract

Phosphomannomutase 2 (PMM2-CDG) is the most common congenital disorder of N-glycosylation and is caused by a deficient PMM2 activity. The clinical presentation and the onset of PMM2-CDG vary among affected individuals ranging from a severe antenatal presentation with multisystem involvement to mild adulthood presentation limited to minor neurological involvement. Management of affected patients requires a multidisciplinary approach. In this article, a systematic review of

the literature on PMM2-CDG was conducted by a group of international experts in different aspects of CDG. Our management guidelines were initiated based on the available evidence-based data and experts' opinions. This guideline mainly addresses the clinical evaluation of each system/organ involved in PMM2-CDG, and the recommended management approach. It is the first systematic review of current practices in PMM2-CDG and the first guidelines aiming at establishing a practical approach to the recognition, diagnosis and management of PMM2-CDG patients.

1 | INTRODUCTION

Phosphomannomutase 2 (PMM2)-congenital disorders of glycosylation (CDG) (previously named CDG-Ia) (OMIM 212065) is a disorder of protein *N*-glycosylation characterized by deficiency/dysfunction of phosphomannomutase 2. It is characterized by a broad spectrum of clinical presentations, ranging from severe neonatal to mild adulthood presentation. Almost all systems/organs can be involved in PMM2-CDG.

2 | PREVALENCE

PMM2-CDG is an autosomal recessive panethnic disorder with more than 900 patients with a diagnosis confirmed either by enzyme assay and/or molecular testing. The estimated incidence is 1:20 000.^{1,2}

3 | HISTORY

In 1980, Jaeken et al described the first two patients with a CDG-Ia phenotype. Serum transferrin isoelectrofocusing was proposed as a screening tool for CDG by Jaeken et al.³ Phosphomannomutase 2 deficiency was linked to the so-called carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome by Van Schaftingen and Jaeken.⁴ *PMM2* (OMIM 601785) was cloned and mutations identified by Matthijs et al.⁵ In 2009, the CDG nomenclature was changed for all CDG into the official gene symbol (not in italics) followed by CDG.⁶

4 | BIOCHEMISTRY

PMM2 catalyzes the second step of the mannose pathway namely the conversion of mannose-6-phosphate to mannose-1-phosphate, which is a precursor of Guanosine diphosphate mannose (GDP-Man) and dolichol-P-mannose (Dol-Man). These two mannose compounds are the donors of mannose used in the endoplasmic reticulum (ER) for the dolichol-pyrophosphate oligosaccharide precursor assembly.

5 | PATHOGENESIS

Deficiency of GDP-Man and Dol-P-Man causes hypoglycosylation of numerous glycoproteins, including serum glycoproteins (lysosomal enzymes, and transport proteins) and membrane glycoproteins. This results in multi-organ involvement with predominant neurological involvement. The pathophysiology and the variability of disease severity and course are not well understood.

6 | METHODOLOGY

The initiative to establish guidelines for the diagnosis and treatment of PMM2-CDG was taken at the *International Scientific CDG Symposium* held in July 2017 in Leuven, Belgium. As for most rare disorders, existing studies and reports are often non-systematic, observational studies, case series or case reports, providing generally low quality evidence. However, combining the available evidence with the experts' opinions helped in establishing these guidelines.

A systematic literature review on PMM2-CDG from the time of the princeps description until December 2017 was carried out mainly using PubMed database searches with the following terms: carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome OR congenital disorder of glycosylation, type Ia OR PMM2 OR PMM2-CDG OR phosphomannomutase 2 deficiency OR Jaeken syndrome. Evidence levels were classified in accordance with the Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) methodology (<http://www.sign.ac.uk>) (Supporting Information, Table S1).

7 | RESULTS

The guidelines were designed by a multidisciplinary panel of international experts in different clinical and research specialties. A literature review of the systems involved in PMM2-CDG was conducted using the PubMed searches and

papers collected in a shared folder in Dropbox which was created by the research team and included more than 150 peer-reviewed papers. The teamwork was divided into a clinical and a diagnostic group. The data were collected and summarized based on the major system/organ involvement and the statements were written based on the frequency of each sign/symptom. The following systems were reviewed: antenatal

presentations, dysmorphology, neurology, ophthalmology, cardiology, gastroenterology, hepatology, nephrology, hematology, endocrinology, immune system, audiology, skeletal features, lipid metabolism and adult presentations.

Summary of the phenotypes and the proposed recommendations: ordered by system involvement (Table 1 and Tables S2, S3).

TABLE 1 Suggested surveillance for PMM2-CDG patients

Systems	At diagnosis, if not previously obtained	At follow up 1-2 years interval and as needed	As needed depends on the symptoms
Neurology			
Developmental and cognitive assessment	✓	✓	✓
Electroencephalogram			✓
Brain MRI	✓		✓
Audiology	✓		✓
Endocrine			
Height	✓	✓	
Calcium, magnesium and phosphate	✓	✓	
Gonadotropins	✓	✓	✓
Glucose	✓		
Insulin and other labs in case of hypoglycemia ^a	✓		✓
Thyroid function	✓	✓	✓
Cardiology			
Echocardiogram	✓		✓
Electrocardiogram	✓		✓
Holter			✓
Cardiac MRI			✓
Gastroenterology			
Growth and anthropometric parameters	✓	✓	
Swallowing evaluation			✓
Transaminases	✓	✓	✓
Hematology			
Complete blood counts and differential	✓	✓	✓
Coagulation factors	✓	✓	✓
Renal			
Creatinine	✓	✓	✓
Protein	✓		✓
Immunology			✓
Ophthalmology			
Exam	✓	✓	✓
Electroretinogram			✓
Skeletal	✓		✓
Psychiatric evaluation			✓

Abbreviations: PMM2-CDG, phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation; MRI, magnetic resonance imaging.

^aSee the full paper for the suggested labs.

8 | SYSTEMS SUMMARIES AND STATEMENTS

8.1 | Antenatal involvement

Non-immune hydrops fetalis (NIHF) is the most common antenatal presentation of PMM2-CDG, reported in 12 patients. Other associated findings, include hydropic placenta and polyhydramnios. Mirror syndrome-fetal hydrops with consecutive oedema and rapid weight gain in the pregnant mother of the affected fetus- was reported in two patients.⁷ Other findings antenatal include hypertrophic cardiomyopathy,^{8–10} cerebral and cerebellar abnormalities particularly ventriculomegaly^{10,11} and cerebellar hypoplasia/atrophy.^{12,13} Skeletal deformities have been detected antenatally in a few patients (limb-shortening, and prominent lumbar lordosis).^{10,11} All patients presenting with the antenatal/neonatal hydrops fetalis died between 29 gestational weeks and 3 months of life.

8.2 | Statements

8.2.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present prenatally as hydrops fetalis, polyhydramnios, hydropic placenta, mirror syndrome, cerebral ventriculomegaly, cerebellar atrophy (CA), and/or skeletal deformities.

8.2.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation C)

A broad metabolic screening is necessary to rule out other causes of non-immune hydrops fetalis.

8.2.3 | Diagnosis and follow-up (Statements #3, 4: grade of recommendation D)

Statement #3:

Detailed imaging studies should include antenatal ultrasound, fetal Doppler and fetal echocardiography, looking for any suggestive presentations of PMM2-CDG including hydrops fetalis, ventriculomegaly, CA, hydropic placenta, polyhydramnios or skeletal deformities mainly limb shortening.

Statement #4:

Autopsy should be recommended in all cases of fetal or neonatal death from NIHF, and amniotic fluid and/or fetal cells should be stored for future testing. PMM enzyme assay and molecular analysis of the PMM2 gene should be considered in the diagnostic panels for NIHF.

8.2.4 | Treatment (Statement #5: grade of recommendation D)

There is no specific treatment strategy for hydrops fetalis in PMM2-CDG, but it is a medical emergency and needs a multi-disciplinary management approach including a maternal-fetal medicine specialist, a neonatologist and a metabolic specialist.

8.3 | Congenital malformations

Congenital malformations in PMM2-CDG are common. Inverted nipples were seen in half of the reported patients (25%-100% depending on the case series). Inverted nipples can disappear over time, and can sometimes be unilateral.^{14,15} Abnormal fat distribution has been reported in about half of the patients (25%-91%). This can also spontaneously regress over time.¹⁶ The reported frequency of dysmorphic features varies from 29% to 65%, and mainly includes a prominent forehead, large ears and ear lobules, thin upper lip, prominent jaw, and long and slender fingers and toes. A prominent jaw develops over time, but there can be retrognathia in infancy.¹⁷ Almond-shaped eyes have also been frequently described.¹⁸ Cryptorchidism which is relatively frequent in normal neonates has often been reported in boys.¹⁶ Other features include peau d'orange, dysplastic ears, low-set ears, long philtrum, high-arched palate, long face, narrow palpebral fissures, epicanthal folds, prominent nose, and anteverted nares. A coarse face was described in older adults in their 60s.^{12,19} Conotruncal heart defects were described in only a few patients and thus might be a coincidental finding (see dedicated section).

8.4 | Statements

8.4.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present with facial dysmorphic features (prominent forehead, long face, epicanthal folds, almond-shaped eyes, short nose, anteverted nares, long philtrum, thin upper lip, high-arched palate, large and protruding ears), microcephaly/macrocephaly, abnormal fat pads, inverted nipples, cryptorchidism in boys, and, rarely, cardiac structural anomalies.

8.4.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Supragluteal fat pads can also be seen in Wiedemann-Rautenstrauch syndrome (neonatal progeria), although the other dysmorphic features are different. Many other inborn errors of metabolism have occasionally been associated with inverted nipples such as Turner syndrome, Smith-Lemli-Opitz syndrome, Weaver syndrome and Robinow syndrome.

Of note, inverted nipples (unilateral and bilateral) are found in approximately 3% of the general population, so their occasional presence in these other disorders could be coincidental. Almond-shaped eyes are seen in Prader-Willi syndrome, which is often accompanied by hypotonia and feeding difficulties during infancy.

8.4.3 | Diagnosis and follow-up (Statement #3: grade of recommendation C)

The following should be done at the time of the diagnosis: assessment by a clinical geneticist, echocardiogram and ophthalmologic evaluation.

Follow-up investigations should be performed depending on the results of the initial evaluation, or on clinical concern.

8.4.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management for congenital malformations in PMM2-CDG patients. Conotruncal heart defects and cryptorchidism are treated standardly. The inverted nipples and abnormal fat distribution do not need any treatment, and in fact, can disappear spontaneously.

8.5 | Neurological involvement

PMM2-CDG can present as an isolated neurological syndrome or a neurologic-multivisceral form; the latter occurs earlier in life and is associated with a more severe presentation. Developmental disability (DD) in PMM2-CDG is an almost constant finding. It has been reported in 96% of 518 clinically described patients and ranged between mild to severe. The severity was not specified in 416 patients. Achievements of specific milestones were not clearly delineated in the literature. In 20 patients, a normal development was reported, and in 5 of these patients, the clinical status was described in detail including the academic achievement.^{20–22}

The level of intellectual disability (ID) (including search term “mental retardation”) was reported in 179 patients. The intelligence level was normal in 10%, borderline in 2%; disability was mild in 27%, moderate in 28%, severe in 30% and profound in 3%.^{12,22–27} Lack of intelligence assessment in many patients was due to the severity of the clinical presentation with multi-organ involvement and early death. The intelligence quotient (IQ) has been reported in only 17% mainly in individuals with normal intelligence, borderline or mild ID. Among 18 individuals with normal IQ the range was 80 to 93 (median 87).^{18,20,28,29}

CA is another constant finding in PMM2-CDG; it has been reported in 95.4%. Presentation of CA is usually in the neonatal period or during the first years. In some instances, CA was detected prenatally^{12,13} or in the first 4 to 14 postnatal days.^{30,31} A few patients had initially a normal cerebellar magnetic resonance imaging (MRI) at first investigation between 2 days and 6 years of age.^{20,28,32–34} Global CA with enlarged hemispheric and vermian fissures, particularly of the anterior lobe of the vermis, are the most common presentations. Olivopontocerebellar atrophy is less frequently reported. CA follows a progressive course with volumetric loss particularly at earlier ages.³⁵ CA has been measured by bi-dimensional measures and volumetric analyses in case-control studies^{18,35,36}. Roving eye movements, tonic upward deviation and convergent eye movements are the earliest signs of cerebellar dysfunction detectable in the neonatal period. Hypotonia, clumsy and ataxic movements become increasingly apparent over the first year. The most common cerebellar symptom in PMM2-CDG patients is ataxia, reported in 96.4%. Independent walking is attained in a minority of patients. Cerebellar ataxia is not progressive in PMM2-CDG. However, motor disability may worsen with time. CA was not reported in some patients with normal intelligence.^{18,20,22}

Hypotonia is another common symptom in PMM2-CDG, reported in 92%. It can develop beyond the neonatal period, or even at later age (6–38 years). In many studies there is a lack of information on whether the hypotonia was central, or peripheral as a presentation of neuropathy.

Peripheral neuropathy is reported in about half of the patients (53%). It is generally observed after the end of the first decade (range 7–42 years; in most cases over 13 years). However, only some cases are documented by nerve conduction velocity (NCV); most patients are described as having no deep tendon reflex and/or muscle wasting and a few with loss of sensation.

Seizures were documented in only 68 patients; 10 showed neonatal seizures. The most reported types were generalized tonic-clonic and partial seizures, and most patients responded well to single anti-epileptic drugs.

Movement disorders, apart from ataxia, have been reported in only few patients, including dystonic dyskinetic hand movements and cervical dystonia.^{37–39}

Stroke-like episodes (SLE) have been described in 36 patients (see dedicated section).

8.6 | Statements

8.6.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present as either a neurological syndrome or as a neurologic-multivisceral phenotype. The main neurological

manifestations are global DD, cerebellar ataxia, hypotonia, dysarthria, peripheral neuropathy, seizures, and SLEs.

8.6.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

The most common differential diagnostic consideration are mitochondrial disorders and disorders of phospholipid synthesis.

8.6.3 | Diagnosis and follow-up (Statement #3: grade of recommendation C)

The following investigations should be done at the time of the diagnosis: neurological and psychological assessment, Electroencephalography (EEG), neuroimaging and nerve conductive study. Cerebellar biometry or volumetric measures should be performed. The ataxia can be evaluated by clinical scales such as International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS).¹⁸

8.6.4 | Treatment: (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no specific treatment for the neurological manifestations of PMM2-CDG and the management is per standard protocols for each manifestation.

8.7 | Stroke-like episodes

SLE are a potential complication of PMM2-CDG, reported in at least 36 patients.^{12,40–50} They can present before the age of 2 years with no episodes in adulthood.²⁶ The age of presentation for 28 patients was detailed: 89.3% were younger than 10 years at the first episode, 68% have suffered one or two SLE episodes. Some underwent more than two episodes. The cause of the SLE has not yet been identified. However, different SLE triggers have been described, in particular febrile illnesses ($n = 12$) and head trauma ($n = 8$). Alcohol ingestion and invasive cerebral studies, that is, angiography have each been reported once. No clear trigger has been identified in 47% of the patients.

The most reported symptoms are: somnolence, stupor and/or irritability ($n = 13$), mono or hemiparesis ($n = 10$), seizures ($n = 8$), and other ($n = 3$; dysphasia, cortical blindness, headache, vomiting). Hyperthermia or fever is reported in all the patients for whom the body temperature is reported (from 37.4°C to 38.9°C) with or without an infectious context.

Full recovery was reported to be achieved from 1 hour to 6 months post SLE, and complete recovery was achieved by all the patients. EEG data were detailed in 13 patients with EEG abnormalities in 69%. The main

reported finding was an abnormal background in all the patients and focal abnormalities in some patients. Neuroimaging studies (cranial MRI), described in 19 patients, showed in the majority CA. In five MRI studies (5/19 patients) a hemispheric edema combined with a focal abnormality was found.^{42,45,48,49}

Acute treatment was reported only in 28%. The most frequently reported drugs used are the antiepileptic drugs, both for the acute phase and the prophylactic phase.

Benzodiazepines were used during the acute phase in at least eight SLE patients, phenytoin in five patients, midazolam and lorazepam in continuous infusion each in four patients, levetiracetam in three patients, and valproic acid, carbamazepine, oxcarbazepine and topiramate in single patients each.

8.8 | Statements

8.8.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

SLE are among the acute neurological complications in PMM2-CDG patients. They could be underdiagnosed as they require a high index of suspicion. Vascular events such as migraine can clinically mimic SLE and are also more prevalent in PMM2-CDG patients due to coagulation abnormalities.

The main SLE symptoms are irritability, stupor, mono- or hemiparesis, epileptic seizures and sometimes vomiting and other focal deficits.

8.8.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Broad metabolic screening is necessary to rule out disorders of small molecules and energy metabolism.

8.8.3 | Diagnosis (Statement #3: grade of recommendation C)

In order to rule out other acute events deserving special management, neurophysiological studies (EEG), neuroimaging (MRI) and hemostatic studies are recommended.

8.8.4 | Acute management (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no specific treatment for the SLE in PMM2-CDG patients. Antiepileptic drugs are the most widely used and reports described an improvement in seizures and focal deficits. Benzodiazepines (midazolam, lorazepam) are recommended. The use of antiaggregants or anticoagulants during the acute phase of SLE should be considered in every single situation.

8.8.5 | Long term therapies (Statement #5: grade of recommendation D)

There is no evidence for the safe continuous use of antiaggregants to prevent SLE except in recurrent SLE (unpublished observations about acetylsalicylic acid). Review of the literature does not support nor refute a vascular origin of SLE. Most common antiepileptic drugs such as levetiracetam, valproic acid, carbamazepine, and oxcarbazepine have been used. However, there is no evidence for efficacy in preventing new SLE.

8.9 | Ophthalmological presentation

The ophthalmological manifestations have been documented in 535 PMM2-CDG patients. Strabismus was the commonest reported ophthalmological finding (84%). The type of strabismus was specified (esotropic) only in half of them. Strabismus is frequently present since birth. Later infantile presentation has been reported.^{20,29} Pigmentary retinopathies were reported in 22% of patients. Although it is usually associated with the adolescence/adulthood form, three individuals with the early infantile presentation have been reported.^{40,51} Other less common retinal anomalies included retinal hypopigmentation ($n = 2$), retinopathy without pigmentary alterations ($n = 1$) tapetoretinal degeneration ($n = 1$). Abnormal electroretinography (ERG) was reported in 10%. In two independent studies,^{52,53} patients were found to have more severely affected rod driven-responses, while cone responses were only slightly reduced.^{52,53} Nystagmus was seen in 9.5%. The frequency of oculomotor apraxia and abnormal eye movements is 4% and 3%, respectively. Myopia was reported in 8.7%. Less frequent refractive errors have been described including astigmatism, hyperopia and amblyopia. Six percent of the patients exhibited either reduced visual acuity or visual impairment. Legal blindness was reported in only one patient. Abnormal visual evoked potentials (VEP) have been reported in 11 patients. Spontaneously corrected visual inattention has been reported.⁵⁴ Cortical blindness has been rarely described and was transient in two patients.⁴⁰ Other less common reported ophthalmological manifestations included night blindness, narrow retinal vessels, macula hypoplasia or aplasia, optic nerve involvement, optic disc pallor, ptosis, enophthalmos, iris coloboma and cataract.⁵⁵

8.10 | Statements

8.10.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

The main ophthalmological manifestations in PMM2-CDG are strabismus, pigmentary retinopathy (due to progressive

photoreceptor degeneration), nystagmus, myopia and reduced visual acuity.

8.10.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation C)

A broad metabolic screening is necessary to rule out disorders of energy metabolism and complex molecules, and attenuated forms of organic acidemias.

8.10.3 | Diagnosis and Follow up: (Statement # 3: grade of recommendation D)

Since ocular anomalies are frequent in PMM2-CDG and can involve the structural components as well as the ocular mobility, initial and annual ophthalmology evaluation for PMM2-CDG patients is recommended, particularly to assess the progression of the retinopathy.

8.10.4 | Treatment: (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management for the ophthalmological manifestations in PMM2-CDG patients. Ophthalmologist's intervention (as strabismus treatment or correction of myopia) in early life is important to preserve vision through glasses, patching or surgery.

8.11 | Cardiological presentation

Cardiac involvement in PMM2-CDG has been reported in 141 PMM2-CDG patients, with a frequency of 21%.³¹ It is always part of the multivisceral presentation of PMM2-CDG. Early presentation of the cardiac manifestations was reported in 45% of the patients.

The most common cardiac manifestations are pericardial effusions/pericarditis, different forms of cardiomyopathy, mostly hypertrophic cardiomyopathy with or without obstruction, cardiac failure and/or cardiac tamponade. Structural heart defects have been reported, particularly conotruncal malformations.^{18,27,56–60}

Less common cardiovascular manifestations include systemic hypertension, pulmonary hypertension, arrhythmia, myocardial ischemia and pericardial fibrosis. Sudden cardiac arrest and collapse including cardiac rupture have been reported.^{61,62} Pericardial effusions and cardiomyopathy can worsen, stabilize and improve.^{16,62–66}

Management of the cardiac manifestations includes medical, surgical, and supportive measures particularly with regard to hydration and nutrition. Improvement of pericardial effusion with steroids and salicylic acid has been reported.⁶⁷ Acute left ventricular outflow tract obstruction

from non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy was reported due to dehydration.⁶⁸

Mortality due to cardiac involvement was estimated to be 34%, but, this could be an underestimate due to insufficient data on outcome.

8.12 | Statements

8.12.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

Cardiac involvement can be part of the multisystem presentation in PMM2-CDG. The age of onset is usually from antenatal to the first year. Most common cardiac features are pericardial effusion/pericarditis, cardiomyopathies particularly hypertrophic cardiomyopathy with or without obstruction, cardiac failure and/or cardiac tamponade. Conotruncal malformations are the most significant structural heart defects.

8.12.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation C)

A broad metabolic screening is necessary to rule out disorders of energy metabolism, complex molecules, and attenuated forms of organic acidemias.

8.12.3 | Diagnosis and follow-up (Statement #3: grade of recommendation D)

A referral to a cardiologist is recommended for cardiac assessment. Baseline investigations should be done at the time of diagnosis and include chest X-ray, echocardiogram and electrocardiogram (ECG).

Regular cardiac follow-up should be done annually or more frequently as deemed necessary by the cardiologist or as indicated clinically. Antenatal cardiac assessment should be considered for the foetus at risk in case of a positive family history. Other cardiac investigations, for example, pericardial biopsy for suspected pericardial fibrosis should be considered in consultation with the cardiologist.

8.12.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

Treatment of the cardiac manifestations should be guided by the cardiologists. Hydration, nutrition and albumin transfusions are important supportive measures, and conotruncal heart defects of course need surgical correction.

8.13 | Gastroenterological presentation

Digestive symptoms have been described in 212 patients. Failure to thrive in the first year of life is the most common feature, reported in 66.5%. It is mostly associated with other extra-neurological symptoms^{16,21,23,31,51,57,62,65,69–78}. Feeding difficulties are frequent in PMM2-CDG (45%). They are probably mainly secondary to oral muscle dysfunction from the hypotonia. Several patients required feeding assistance via nasogastric tube feeding or gastrostomy feeding especially in the first years in association with severe enteropathy and/or cardiac complications. In a series of 96 patients, half of the patients who required enteral nutrition had cardiac involvement.³¹

Diarrhea was reported in only 27% of the patients. Data about the duration and the type of the diarrhea were missing in most reports. Malabsorption and enteropathy were diagnosed in a number of patients. Hypoalbuminemia was reported at least in 58% of patients with severe diarrhea.

Vomiting was reported in 19% of the patients. The causes were not well studied.

The reported electronmicroscopic findings of the intestine mucosa in affected patients with chronic diarrhea were non-specific. Four out of seven children had short villi, increased inflammatory cells in the stroma, dilatation of smooth ER and abnormal inclusions containing lipids that did not respond to elimination of food containing proteins. Moderate inflammation of the chorion (lamina propria) was reported in two patients, intra-enterocyte fat accumulation in two patients, and partial villous atrophy with lymphangiectasia in one patient. The histology of intestinal biopsies in two patients was normal.⁶⁵ Growth and gastrointestinal symptoms improved spontaneously with age.

8.14 | Statements

8.14.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

The main digestive presentations in PMM2-CDG are failure to thrive secondary to feeding difficulties, that is, vomiting; diarrhea secondary to malabsorption or protein losing enteropathy.

8.14.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

A broad metabolic screening is necessary to rule out disorders of energy metabolism, small molecules, and protein/-gluten intolerance disorders.

8.14.3 | Diagnosis and follow up (Statement #3: grade of recommendation D)

The following parameters/investigations should be measured/performed at the time of the diagnosis: anthropometric parameters, body mass index (BMI), blood albumin, pre-albumin, and electrolytes.

Follow-up investigations should include annual surveillance of these parameters.

8.14.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management for digestive dysfunction in PMM2-CDG patients. Nutritional support is required in all the affected patients.

Special instructions include:

- Maximal caloric intake with any type of formula (no special food required for PMM2-CDG patients)
- Feeding assistance by nasogastric tube or gastrostomy tube
- Anti-gastroesophageal reflux measures including thickening of feeds, maintenance of an upright position after eating, and antacids
- Evaluation by a gastroenterologist and nutritionist especially in the first year of life
- Continued speech therapy and oral motor therapy in the patients with feeding difficulties

8.15 | Liver involvement

The description of the liver involvement in PMM2-CDG was mostly vague. In the severe infantile type, liver failure was often present in the setting of multi-organ failure often associated with pericardial effusions. Postmortem histologic examination can show cholestasis with prominent bile canaliculi, periportal fibrosis, portoportal bridging fibrosis or cirrhosis and steatosis.^{7,8,13,30,68,79–82}

In the later presentation of the multivisceral type, hepatomegaly is the most frequent clinical finding. This has been associated with elevated serum transaminases (particularly of ALAT) in 12.5% to 100%^{16,26,40,83} more often than in the neurological form.³¹ Usually, the transaminases become more elevated during viral infections and seem to decrease with age normalizing often in the second decade. Liver biopsies have rarely been performed. They mostly show liver steatosis^{51,57,84} and lysosomal inclusions in the hepatocytes.⁸⁵ This liver presentation does not seem to be progressive. Liver ultrasound often demonstrates steatosis.^{56,69,86}

Coagulopathy asks for special attention in CDG (see dedicated section) but is also considered as a marker of liver function. Cholestasis and liver failure (International

Normalised Ratio (INR) > 2) only occur in the severe infantile type.^{26,31,40,69,76,83,87}

Generally, in the severe infantile type, liver failure contributes to demise, most often in the setting of multi-organ failure. In the less severe multivisceral type, liver disease manifests mainly as liver steatosis with or without hepatomegaly and elevated serum transaminases.

8.16 | Statements

8.16.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

Liver involvement in PMM2-CDG presents as either severe neonatal liver failure associated with multi-organ failure in the setting of the severe neonatal multivisceral type of PMM2-CDG, or (usually mild) hepatomegaly with mildly increased serum transaminases and liver steatosis that often improves with age.

8.16.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation C)

The list of differential diagnoses for neonatal liver failure, cholestasis or increased serum transaminases is long and age-dependent, and outside the scope of these guidelines. Elevated transaminases can be the main presentation of PMM2-CDG. Serum transferrin isoelectric focusing (IEF) in “cryptogenic hepatitis” can lead to the diagnosis of PMM2-CDG. PMM2-CDG should therefore be looked for in unexplained hepatitis.

8.16.3 | Diagnosis and follow-up (Statement #3: grade of recommendation D)

Liver tests (transaminases and coagulation) should be followed yearly until normalization occurs. Liver ultrasound at the time of diagnosis and every 3 to 5 years thereafter seems justified. In patients with chronic increase of transaminases, the development of liver fibrosis or cirrhosis can be monitored with non-invasive elastography techniques. The identification of evolution to cirrhosis is important, given the occurrence of potentially life-threatening complications (variceal bleeding, hepatocellular carcinoma, ascites) associated with cirrhosis.

8.16.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation C)

There is no disorder-specific management for liver disease in PMM2-CDG. Elevated transaminases usually normalize before puberty.

8.17 | Renal involvement

Renal involvement in PMM2-CDG has been reported in 56 patients. In the severe infantile multisystem type there is major renal involvement in about 85%. Presentation in the late-infantile and childhood type has also been also reported. Multicystic kidneys are the most common presentation followed by nephromegaly. Hydronephrosis was less reported. The most reported functional abnormality was tubulopathy, mainly proteinuria, followed by aminoaciduria. Nephrotic range proteinuria has been described in six patients^{11,31,88–90} including the diffuse mesangial sclerotic type in one patient.⁹⁰ Abnormal renal ultrasound, including increased echogenicity, increased or decreased corticomedullary differentiation has also been reported.⁹¹

8.18 | Statements

8.18.1 | Presentations (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present with congenital renal anomalies including bilateral multicystic kidneys, nephromegaly, hydronephrosis and/or tubulopathy. Proteinuria can be an isolated feature in PMM2-CDG. Nephrotic range proteinuria is a rare presentation of PMM2-CDG.

8.18.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Screening for other disorders including metabolic tubulopathy, that is, energy metabolism and complex molecules. Genetic syndromes with multicystic kidneys and nephrotic syndrome should be also considered.

8.18.3 | Diagnosis and Follow up (Statement #3: grade of recommendation C)

The following investigations should be done at the time of diagnosis: blood pressure measurement, urine analysis for proteins and amino acids, serum creatinine and renal ultrasound (looking for microcysts, nephromegaly, hyperechogenicity, abnormal corticomedullary differentiation).

Follow-up investigations should include annual surveillance with blood pressure measurement, urine analysis/ dipstick, and serum creatinine/urea.

8.18.4 | Treatment: (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management for renal dysfunction in PMM2-CDG patients.

8.19 | Hematological involvement

Coagulation abnormalities were described in 344 PMM2-CDG patients. Both procoagulant and anticoagulant factors are affected. Antithrombin deficiency was the most reported abnormality followed closely by factor XI (FXI) and protein C (PC) deficiencies respectively. Protein S (PS) and FIX can also be decreased. Low factor II (FII), factor V (FV), factor VII (FVII) or factor X (FX) were reported in a few patients as well as prolonged prothrombin time and increased D-dimer levels.

PMM2-CDG is largely underdiagnosed and some cases may have a mild phenotype with only coagulation abnormalities such as antithrombin deficiency.⁹² These coagulation abnormalities disturb the hemostatic equilibrium, which may induce hemorrhagic or thrombotic events. A thrombotic event was reported in 12.5% of patients, both venous and arterial. Four cases of cerebral thrombosis were described. Tissue damage such as due to surgery or catheterization was identified as a risk factor for the occurrence of thrombotic events.⁹³ In four PMM2-CDG patients, disseminated intravascular coagulation was described, always occurring during thrombosis or a SLE.

Data on antithrombotic treatment in PMM2-CDG patients are limited. There is one report of inefficient low molecular weight heparin treatment (LMWH) in congenital antithrombin deficiency.⁹⁴ Rivaroxaban (factor Xa inhibitor) has been successfully used as an alternative prophylaxis in PMM2-CDG patients.⁹⁵

Of note, fluctuations of coagulation abnormalities have been noted with age,⁹⁶ and with during fever, probably due to thermolability of PMM2.^{31,97}

Other hematological abnormalities like thrombocytopenia and neutropenia have rarely been reported. Thrombocytopenia has been described in only seven patients.²⁶ Interestingly, three of them presented with severe congenital thrombocytopenia in the context of hydrops fetalis without evidence of bacterial or viral infection.⁷³ In PMM2-CDG patients, platelet reactivity against all agonists was normal but there was a spontaneous hyperreactivity. This causes platelet hyperaggregability explaining the thrombotic tendency in these patients.⁹⁸ Complete bone marrow failure was noted in only two patients (personal communication) (for neutropenia see immunology section).

8.20 | Statements

8.20.1 | Presentations (Statement #1: grade of recommendation C)

The main coagulation disorders observed in PMM2-CDG are antithrombin and FXI deficiencies which can be associated to PC, PS and FIX deficiencies and prolonged prothrombin time. Because of these coagulation abnormalities

affecting both procoagulant and anticoagulant factors, patients exposed to thrombotic or hemorrhagic risk. Because of the platelet hyperaggregability, the risk of thrombosis is higher than the risk of bleeding.

8.20.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation C)

The differential diagnosis includes congenital coagulopathy syndromes and liver failure or disseminated intravascular coagulopathy.

8.20.3 | Diagnosis and follow up (Statement #3: grade of recommendation D)

At diagnosis, a complete blood count and hemostasis study should be performed, including prothrombin time, fibrinogen, FVIII, FIX, FXI, antithrombin, PC and PS. If prothrombin time is prolonged, FII, FV, FVII, and FX should be measured.

Coagulation studies should be conducted once a year and before any surgery, invasive procedure or environmental stress like fever, in combination with liver function tests. In these situations, hemostasis studies should include prothrombin time, fibrinogen, factor IX, factor XI, antithrombin, protein C and protein S.

8.20.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

The following proposals should take into account the coagulation profile and the history of bleeding and/or thrombosis of the patient.

8.21 | Thrombotic event

In the absence of specific guidelines for PMM2-CDG patients, we suggest to follow the guidelines of the American College of Chest Physicians for curative and prophylactic use of antithrombotic therapy.^{99,100} Low molecular weight heparin should be used by individualized dose. Use of antithrombin concentrate in antithrombin deficiency can be discussed if dose adjustment of heparin is difficult. Rivaroxaban can be used as an alternative prophylaxis in LMWH-nonresponsive patients.

8.22 | Management of coagulopathy during surgery

According to the levels of clotting factors and inhibitors and the hemorrhagic risk of the procedure, we propose the prophylactic use of fresh frozen plasma or prothrombin

complex concentrate (PCC). However, the use of PCC containing protein C and protein S should be considered according to PC and PS levels. Factor XI concentrate or recombinant FVIIa (rFVIIa) infusion is not recommended owing to the high risk of unbalancing the hemostasis.¹⁰¹

8.23 | Endocrinological symptoms

The endocrine system is one of the major systems affected in PMM2-CDG. Four major domains are affected: growth, thyroid function, sexual development and blood glucose levels.

Data regarding height were available for 53 patients; 49% presented with short stature. After a normal anthropometry at birth, postnatal growth decline is common in PMM2-CDG children. A prospective study of the prepubertal growth in 25 patients revealed a notable decline in length (standard deviation score (SDS) 0-2.4) during the first 7 months of life. Failure to thrive is a common feature of PMM2-CDG and is associated with growth failure (in 96% of the patients with short stature).⁷¹ PMM2-CDG patients have lower serum levels of IGF-1, IGFBP3 and acid-labile subunit (ALS) despite normal or increased levels of growth hormone.^{51,102} IGF-1 itself is not glycosylated. However, in serum, over 90% of IGF-1 forms a protein complex formed by glycoproteins IGFBP3 and ALS.¹⁰³ Only one report regarding the use of recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) therapy in a PMM2-CDG patient with an excellent growth response.⁷⁵

Thyroid function tests are frequently ordered in PMM2-CDG, reported in 255 patients. TSH was the most requested biochemical test. In 16%, TSH was above the normal range, in which 29% of those were detected in the newborn screening test while in the remaining, elevated TSH was noticed after the neonatal period.^{9,10,15,18,21,29,43,56,69,77,84,88,102,104-106}

Partial deficiency of thyroxine-binding globulin (TBG) is present in approximately 75% of CDG patients probably due to increased TBG hypoglycosylation which reduces its half-life by 15%. In general, TBG deficiency does not appear to affect thyroid function.¹⁰⁷

FT4 is the most reliable marker for thyroid function and indicator for treatment to avoid over-treatment based only on a high TSH.¹⁰⁵ Among 255 PMM2-CDG patients, 13% were labeled as hypothyroidism. Levothyroxine therapy was begun in all but was discontinued after few months in some patients presenting with transient hypothyroidism. Hypothyroidism related symptoms including low body temperature, low energy, constipation, and lymphedema have rarely been reported.⁷⁷

Hypoglycemia has been reported in 24 patients.^{7-11,18,21,37,40,56,62,74,76,84,108,109} Patients presented mostly with poor feeding, lethargy or seizures. It was the main presentation in three patients.^{21,108} All of the hypoglycemia attacks occurred during the infantile period. There

was no documented difference in the timing of the presentation between hyperinsulinemic vs normoinsulinemic hypoglycemia. Hyperinsulinemia was determined to be the cause in 40% of the affected patients. The cause was not precisely reported for the rest of patients, that is, no insulin, cortisol, growth hormone or ketone levels were available.^{10,11,21,40,56,74,84,108} Pancreatic biopsy (available for one patient) revealed normal histology.¹⁰⁸ The hyperinsulinemic hypoglycemia successfully responded to oral diazoxide.^{10,20,54,70,78,99} Subtotal pancreatectomy was required in only one patient with hyperinsulinemia who responded well to diazoxide but developed severe hyponatremia as a side effect.⁹⁹ The outcome of the hypoglycemia in the other 14 patients was not available. Literature review did not reveal hyperglycemia in PMM2-CDG.

Gonadal function has been described in 29 adult females. They presented either with delayed, incomplete or absent puberty, amenorrhea and hypergonadotropic hypogonadism^{26,65,102,107,110} regardless of neurological or visceral symptoms. Three females have been described with normal puberty and normal menstruation^{31,111,112}. Additionally, one female patient has been described with normal puberty and irregular, scarce menstruations⁴¹ and one patient with lack of secondary sexual development and two episodes of vaginal spotting within 4 years post menarche.⁴⁷ The pathogenesis of premature ovarian failure in PMM2-CDG is not fully understood. Hypoglycosylation of gonadotropins, gonadotropin receptors or sex hormones may result in hypergonadotropic hypogonadism.¹⁰² At least 27 females were treated with estrogens to induce puberty^{30,31,56,107,113} and although there is theoretically a risk for thrombosis, no reports were found in the literature. Pubertal abnormalities in males are less reported. Puberty and testosterone levels are mostly reported normal. Small testicular volumes with or without hypogonadism have been described.^{47,79,102} Other abnormalities include increased Follicle-stimulating hormone (FSH)^{29,56,102}, and cryptorchidism.^{30,84,105,109,110,114}

8.24 | Statements

8.24.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present with short stature but have usually an appropriate length at birth,

High TSH and low TBG levels with euthyroidism are common findings in PMM2-CDG while hypothyroidism is rare.

PMM2-CDG can show hypoglycemia, that can be a presenting sign.

The main pubertal abnormalities in PMM2-CDG are premature ovarian failure with hypergonadotropic hypogonadism in females, and hypogonadism with or without small testicular volume and cryptorchidism in males.

8.24.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Disorders such as glycogen storage disease, galactosemia, mitochondrial disorders and autoimmune endocrinopathy should be considered.

8.24.3 | Diagnosis and follow up (Statement #3: grade of recommendation D)

The length/height of PMM2-CDG patients should be regularly monitored. At the time of diagnosis IGF-1, IGFBP3 should be measured. If growth failure installs later, these investigations should be repeated. PMM2-CDG patients have mostly normal serum growth hormone levels and show growth hormone resistance on IGF-1 stimulation.

Serum FT4, TBG and TSH should be measured at the time of diagnosis and at follow-up.

The following investigations should be done in any PMM2-CDG patient presenting with hypoglycemia: plasma insulin, cortisol, growth hormone, lactic acid, ammonia, beta-hydroxybutyrate, free fatty acids and urinary ketones. Transferrin IEF as a screening test should be considered in any neonate/infant with persistent hypoglycemia of undetermined cause.

Gonadal function should be assessed in males and females at the age of puberty, and the following parameters should be measured: Tanner stage, growth curve, bone age, FSH, luteinizing hormone (LH), estradiol in females and testosterone/Sex hormone binding globulin (SHBG) in males.

8.24.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management for the endocrine abnormalities in PMM2-CDG patients.

The diagnosis of hypothyroidism and L-thyroxine supplementation should be reserved for those patients with concomitant elevated TSH and low free thyroxine especially in the presence of clinical symptoms.

The management of hypoglycemia should include continuous tube feeding, iv glucose infusion at a rate 8 to 10 mg/kg/min and inclusion of complex carbohydrates in the diet standard treatments for hyperinsulinemic hypoglycemia. Management with oral diazoxide as a first choice of therapy is recommended in case of hyperinsulinemic hypoglycemia.

Hormone replacement therapy should be started at a normal age of pubertal induction, and to reduce the risk of venous thrombosis, treatment is preferentially natural estrogen by the dermal route.¹¹⁵

8.25 | Infections and immunological abnormalities

Infections and or immunological abnormalities were reported in 88 PMM2-CDG patients. Recurrent infections are a common manifestation in early life and childhood and become less frequent and less severe in adolescence and adulthood. Forty percent were reported with recurrent and/or organ-specific infections (respiratory and gastrointestinal tracts). In most of the reported patients, there was at least single episode of severe infection, which was lethal in few patients. Fifty-three percent of the patients who suffered from infections were below 7 years of age. Antibiotic and immunoglobulin infusions were the most frequently suggested treatment with, in general, a good response.

Nine patients showed different types of leukopenia: progressive lymphopenia,¹¹⁶ persistent lymphopenia⁷³ and neutropenia.²⁶ Low T cell levels have been rarely reported.¹¹⁷ Leukocytosis was reported in a few patients including increased Natural killer (NK) cell levels,¹¹⁷ increased lymphocyte counts,^{118,119} and increased monocyte levels.⁷³ Reduced neutrophil chemotaxis was reported in one paper.¹¹⁸

Furthermore, a set of 12 PMM2-CDG patients with varying ages and disease severity, showed a decrease in the CD16 marker in neutrophils of children as well as a generalized decrease in CD14 epitope in monocytes of both children and adults.¹²⁰

Hypogammaglobulinemia has been described with decreased IgA and IgG levels being the most common finding followed by low IgM levels.^{57,69,118}

Cytokine levels were reported in only one patient, who showed very high levels (Interleukins (IL-2), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, gamma interferons (IFN γ), Tumor necrosis factor (TNF α), IL-1 β and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)) in pericardial and ascites fluids while presenting normal serum levels except for elevated IL-6, IL-8 and IL-10.⁷⁶

Episodes of fever without apparent cause were reported in 22% of the patients^{12,42,44,69,118,121}. In two patients, fever was also associated with pericarditis and vasculitis.^{40,75} Half of the patients reported responded normally to vaccination.¹¹⁷ Age-appropriate vaccination is recommended.⁷⁶

8.26 | Statements

8.26.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG may present with infections, immunodeficiency, lack of response to vaccination, and hypogammaglobulinemia. Infection sometimes can progress to septic shock and more frequent in younger children. Infections have also

been reported as a cause of death in a few young PMM2-CDG patients.

8.26.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Other disorders including immunodeficiency syndromes, Glycogen storage disease (GSD) type Ib, lysinuric protein intolerance, purine and pyrimidine disorders should be evaluated.

8.26.3 | Diagnosis and follow-up (Statement #3: grade of recommendation D)

The following investigations should be done at the time of the diagnosis of PMM2-CDG, and in case of recurrent infections: leukocyte count (including neutrophil, lymphocyte and NK cell count), and immunoglobulin count (including IgA, IgG, and IgM counts). These investigations should be repeated periodically, especially during infancy, and/or in case of suspected or confirmed infection. Antibody titers should always be tested after vaccination. Monitoring of PMM2-CDG patients after infection is necessary to prevent complications and eventual sepsis, especially in early life and childhood.

8.26.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

Infections in PMM2-CDG patients must be managed according to good standards of care, with appropriate antibiotic administration, and patients should be followed closely until infection remission. Intravenous administration of immunoglobulins may be considered if infection is not responsive to antibiotic therapy. Patients should be vaccinated, unless medical history advises against it with the understanding that adverse reactions and non-response are possible.

8.27 | Skeletal involvement

Skeletal involvement in PMM2-CDG is common but often overshadowed by other organ involvement. The skeletal manifestations of PMM2-CDG have only been reported as part of a multisystem phenotype. Kyphoscoliosis was reported in 53% (in series of over 10 patients ranging from 32%¹² to 71%²⁶). This finding is more common in adult patients but can start during childhood.¹² Low bone mineral density (BMD), in the range of osteopenia or even osteoporosis, was seen in 60%. In one series, it was seen in all seven patients older than 15 years of age.²⁶ This finding can also start as early as in childhood but becomes more frequent after adolescence and has been associated with significant

fractures.¹¹³ One large series reported fractures under minimal trauma in 26%.¹⁶ Thoracic deformities in the form of pectus carinatum or excavatum were seen in 84%. Various types of foot deformities have been reported, including talipes equinovarus, talipes equinus, pes varus, pes valgus/everted feet, and pes planus. Atlantoaxial subluxation leading to symptomatic spinal cord compression and laminectomy was described.^{34,122} Changes reminiscent of dysostosis multiplex in the axial skeleton have been reported, including a dorsolumbar kyphosis with a slight hook-like dysplasia of L1, wide ribs, broad clavicles, thickened ischia and pubis,¹⁰³ and anterior beaking of the vertebral bodies.^{10,11} Changes reminiscent of a type II collagenopathy have been reported,¹¹ including hypomineralization of the pubic rami, metaphyseal expansion of the long bones, and delayed epiphyseal ossification. Other skeletal changes reported in more than one patient include shortening of long bones,^{10,11,15} 13 pairs of ribs,^{10,11} and flared iliac wings.^{10,63}

8.28 | Statements

8.28.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present with skeletal involvement, most notably osteoporosis, scoliosis-kyphosis, dysostosis multiplex-like changes, and a type II collagenopathy phenotype.

8.28.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Screening for lysosomal storage disease, type II collagenopathy skeletal phenotype should be considered.

8.28.3 | Diagnosis and follow up (Statement #3: grade of recommendation C)

The following investigations should be done at the time of the diagnosis: cervical spine X-rays first in neutral position, followed by flexion/extension to assess for atlantoaxial instability.

Follow-up investigations should include annual clinical assessment of scoliosis (X-rays obtained when needed) and BMD by age-appropriate dual-energy X-ray absorption (DXA) scan every 3 to 5 years starting in adolescence. In patients with severe spinal and thoracic deformities, pulmonary function should be tested (concern for restrictive lung disease).

8.28.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

- There is no disorder-specific management for skeletal abnormalities in PMM2-CDG patients.

- Atlantoaxial instability/cord compression is treated with standard measures, including cervical spine stabilization or surgical stabilization in patients with symptoms of spinal cord compression.
- Scoliosis is also treated by standard care, with regular monitoring, braces or surgery depending on severity.
- Standard treatment of pectus is recommended, which can include external bracing for pectus carinatum or surgery for severe pectus excavatum leading to cardiopulmonary morbidity.
- Low BMD (Z-score ≤ -2.0): encourage mobility in a safe environment especially with the ataxic patient. Recognize and treat micronutrient deficiencies, such as vitamin D deficiency. Recognize and treat hypogonadotropic hypogonadism to maximize BMD. Standardized WHO Fracture risk assessment tool (FRAX) guidelines for the use of bisphosphonates for PMM2-CDG patients with recurrent fractures.

8.29 | Lipid abnormalities

Hypocholesterolemia is a classic feature of PMM2-CDG^{24,37,69,89,123}. More specifically, affected patients can have decreased concentrations of total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL-cholesterol), and apolipoprotein B.¹²⁴ Hypotriglyceridemia has also been described.⁸⁹

8.30 | Statements

8.30.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

PMM2-CDG can present with low concentrations of total cholesterol, LDL-cholesterol, apolipoprotein B, and triglycerides.

8.30.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Screening for other disorders including abetalipoproteinemia, familial hypobetalipoproteinemias type 1 and 2, chylomicron retention disease, and Smith-Lemli-Opitz syndrome should be considered.

8.30.3 | Diagnosis and follow up (Statement #3: grade of recommendation C)

A fasting lipid panel is recommended at the time of the diagnosis (caution with hypoglycemic infants).

No recommended follow-up recommendation can be established, as although it might be an important diagnostic clue, it's unlikely that the particular lipid pattern would lead to an increased cardiovascular risk.

8.30.4 | Treatment (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management required for lipid abnormalities in PMM2-CDG patients, as it is unlikely to be associated with an increased cardiovascular risk.

8.31 | Hearing loss

The exact frequency of sensorineural hearing loss in PMM2-CDG is still unknown. A recent paper reported that its frequency might not be increased over that of the general population, the latter varying from 3.2% to 13%.¹²⁵ A literature review of papers that reported sensorineural hearing loss revealed this finding in 21% of patients. In particular, there are four cohorts of nine or more patients reporting sensorineural hearing loss as a finding, and the reported frequency in those series ranged from 8%¹² to 33%.¹⁶ Whether or not patients with PMM2-CDG are at an increased risk of sensorineural hearing loss, hearing assessment should be offered to children with speech-language delay, or based on parental concerns.¹²⁶

8.31.1 | Presentation (Statement #1: grade of recommendation C)

Patients can present with sensorineural hearing loss, although it is still controversial if this finding is associated with the disease or is incidental.

8.31.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation D)

Although sensorineural hearing loss is not a classic feature of PMM2-CDG, its finding should not dissuade the clinician from considering this diagnosis.

8.31.3 | Diagnosis and follow up: (Statement #3: grade of recommendation C)

The following investigations should be done at the time of the diagnosis: audiology evaluation.

Follow-up investigations should be performed depending on the results of the initial evaluation, or on clinical concern.

8.31.4 | Treatment: (Statement #4: grade of recommendation D)

There is no disorder-specific management for sensorineural hearing loss in PMM2-CDG patients. Standard of care should be provided, including therapeutic options such as hearing aids.

8.32 | Adult presentations

Total number of reported adult PMM2-CDG patients is 93 (the oldest is 66 years old). The most common reported neurological presentations in adults were the following: stable ataxia (95%), cognitive delay (87%) ranging between mild to severe cognitive delay, peripheral neuropathy (50%), seizures (27%), dysarthria (20%), and SLE (18%).

The seizure disorder, if present, was stable and responsive to regular antiepileptic management in all of the reported adult patients. None of the patients had SLEs beyond adolescence.

The most common endocrinological abnormalities were short stature, and delayed secondary sexual development including ovarian failure and hypogonadism in both males and females. No major thyroid abnormalities were reported except for three patients reported with hypothyroidism, low thyroid binding globulin, and thyroid nodules respectively.

The most common hematological abnormalities were decreased coagulation factors; F IX, F XI and F XII, anti-thrombin, PC, and PS. Deep vein thrombosis (DVT) was reported in a few patients and bleeding in only two patients. No clinical description of bleeding is reported. However, bleeding associated with surgery and trauma has been reported in affected children.

Bone abnormalities were common in adult patients (74%) including osteoporosis (24%), osteopenia (13%) and kyphoscoliosis (62%).

The main ophthalmological abnormalities in adults were strabismus, non-specified retinopathy, retinitis pigmentosa, myopia and nystagmus.

Psychological abnormalities have rarely been reported in adult patients, aggressiveness was reported in six patients, apathy in two patients and depression in one patient.^{12,26}

The functionality of adult PMM2-CDG patients was not well documented, but it has been reported that affected adults require variable levels of support in functional life skills due to the progression of the neuropathy and the orthopedic issues. Three patients were reported to live independently, two have mild neurological involvement¹¹³ and one asymptomatic homozygous individual with normal cognition was diagnosed incidentally after carrier testing of affected offspring.²²

8.33 | Statements

8.33.1 | Presentations (Statement #1: grade of recommendation C)

Adult patients with PMM2-CDG present mainly with stable neurological manifestations including cerebellar ataxia, peripheral neuropathy, strabismus, retinopathy and retinitis pigmentosa associated with endocrinopathies and/or kyphoscoliosis.

8.33.2 | Differential diagnosis (Statement #2: grade of recommendation C)

Other disorders with multisystems involvement including energy disorders, cerebrotendineous xanthomatosis and complex molecule disorders should be evaluated.

8.33.3 | Diagnosis and follow-up (Statements #3, 4: grade of recommendation D, D)

Statement #3 Diagnosis

Enzyme assay and/or molecular testing should be considered in any adult with suspected PMM2-CDG diagnosis. (Caveat: serum transferrin glycosylation analysis can be mildly abnormal or near normal in adult patients¹²⁷).

Statement #4 Follow up

The following surveillance labs should be considered in adults diagnosed with PMM2-CDG: yearly thyroid function, liver function, coagulation factors including FIX, FXI, PC, PS, and antithrombin quantification. Serum concentration of gonadotropins in adolescent and adult women should be monitored to identify hypogonadotropic hypogonadism. Yearly ophthalmology follow-up for the retinitis pigmentosa and myopia, and bone density testing should be done to assess for osteopenia/osteoporosis every 3-5 years.

8.33.4 | Treatment (Statement #5: grade of recommendation D)

Treatment of adults with PMM2-CDG requires care from a multidisciplinary team including a metabolic specialist, ophthalmologist, endocrinologist, orthopedist, hematologist, physical therapist and occupational therapist.

Specific considerations in treatment and follow up of adults with PMM2-CDG:

- Management of increased coagulopathy risk for adults with PMM2-CDG undergoing surgery: Adults with PMM2-CDG are prone to develop DVT; hematology consultation prior to surgery with close monitoring of the coagulation factors, pre-surgical anticoagulant prophylaxis and early treatment of DVT is warranted. DVT prevention with low molecular weight heparins should be considered, especially in case of prolonged immobilization or orthopedic surgery.
- Treatment of the osteopenia and osteoporosis sequelae, that is, fractures: calcium and vitamin D supplementation and consideration of treatment with bisphosphonate in case of vertebral compression fractures or recurrent low-impact fractures.
- Orthopedic management for the scoliosis: supportive management or surgical corrective intervention for severe scoliosis

- Physical therapy: therapy program directed to improve strength, range of motion, and function.
- Clinical hypothyroidism with biochemical hypothyroidism: correction of the thyroid hormone deficiency.
- Support of independent living: education and training throughout the school years in functional life skills and self-care to prepare the young adults for independence.
- Hypogonadism and delayed sexual development in women: hormonal replacement therapy (HRT) can be initiated cautiously to decrease risk of osteoporosis, keeping in consideration the thromboembolic risk with some of HRT.

8.34 | Diagnostic tools, treatment and follow up

8.34.1 | Biochemical diagnosis

IEF of serum transferrin was first introduced in 1984³ and remains the frontline test for the identification of a patient presenting a deficiency in N-glycosylation. The main advantage of using transferrin as a biomarker for CDG is its high abundance in blood, allowing fast, detailed and sensitive detection of N-glycosylation in small sample volumes. Similarly, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) or by capillary electrophoresis (CE) are also techniques that allow separation of transferrin isoforms on the basis of the charge state determined by the number of terminal sialic acid residues. Transferrin carries two identical complex N-glycans harbouring each two terminal sialic acid residues. Because those are negatively charged, the isoelectric point of transferrin is determined by its glycosylation status. In addition, although tetrasialotransferrin represents the major glycoform in healthy controls, other glycoforms can be distinguished due to variable branching of the sugar trees. Hypoglycosylation or altered processing of the glycan chains will both result in a loss of negative charges of the transferrin. PMM2-CDG is characterized by a type 1 transferrin IEF pattern, with a decrease of tetrasialotransferrin and an increase of di- and mostly also of asialotransferrin.

Surprisingly, only scarce detailed information is available for transferrin analysis in literature, and results were only reported in 155 patients. A type 1 transferrin pattern was reported in 46% of the patients ($n = 72$), and a global increase in both a- and disialotransferrin, together with a decrease in tetrasialotransferrin was reported in 34% ($n = 55$). In 29 patients, the different transferrin glycoforms were quantified by HPLC. Analysis of serum transferrin by CE has been reported.²⁰ In most patients (70%, $n = 108$) was IEF performed, and in the remaining 16 patients no information is provided regarding the method used.

Besides IEF, N-glycan profiles of serum transferrin and total serum proteins can also be analyzed by mass

spectrometry (MS) in body fluids and cell lysates. The growing contribution of MS in the diagnosis of CDG is outlined in a recent review by Sturiale et al.¹²⁸ and Lefeber et al.¹²⁹ Furthermore, the analysis of intact glycoprotein analysis of purified transferrin by MS has now been added to routine diagnosis,¹³⁰ and very recently to therapy monitoring of CDG.¹³¹ Hypoglycosylation of serum transferrin has been reported in 28 PMM2-CDG patients, by using either Electrospray ionization (ESI-MS),^{132,133} Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) (Zhang et al 2016),¹⁵⁵ or matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-Mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).^{12,86} Also purified transferrin or isolated transferrin glycans can be used for the analysis.¹³²

Statement #1 (grade of recommendation: C)

Serum transferrin is a sensitive but non-specific biomarker for PMM2-CDG. The typical Tf IEF pattern in PMM2-CDG is type 1 (decrease of tetrasialotransferrin and increase of di- and asialotransferrin).¹³⁴

8.34.2 | The sensitivity of the biochemical tests

The presence of transferrin polymorphisms can however complicate the diagnostic interpretation of abnormal profiles, by impacting its isoelectric point and generating isoforms that can co-migrate with abnormally glycosylated transferrin isoforms.¹³⁵ In case of an abnormal CDG pattern it is suggestive to incubate the serum samples with neuraminidase prior to the analysis. Removal of sialic acid residues will unmask rare transferrin variants. Analysis of parental transferrin can also rule out the presence of hereditary variants.¹³⁶ Noteworthy, PMM2-CDG newborns and infants might present a normal profile that later on becomes abnormal. Conversely, the transferrin pattern sometimes normalizes with age, without improvement of the symptoms, as reported in one patient.⁴³

Statement #1 (grade of recommendation: D)

In case of an abnormal serum sialotransferrin pattern the presence of a transferrin polymorphism has to be excluded, either by pre-incubation of the sample with neuraminidase or by analysis of parental samples.

8.34.3 | Pre-analytical requirements for the biochemical testing

The recommended blood sample handling for isolation and purification of serum transferrin is as follows. Serum or heparin plasma should be stored at -20°C . Extra care should be taken when isolating the serum fraction to avoid contamination by neuraminidase producing-bacteria.¹³⁷ Preferably, the serum sample should not be taken in an acutely ill patient, a patient presenting fever or infections, or a malnourished patient. If an

abnormal profile is obtained, we recommend repeating the test on an independent sample and in an experienced lab.

Statement #1 (grade of recommendation: D)

Serum or heparin plasma should be stored at -20°C and contamination by neuraminidase producing-microorganisms avoided. An abnormal profile should be retested on an independent sample in an experienced lab.

8.34.4 | False positive results of the biochemical tests (other causes of a positive Carbohydrate deficient transferrin (CDT%) test)

Secondary glycosylation defects can also lead to abnormal Tf IEF results. In patients with untreated galactosemia or fructosemia, accumulating intermediates inhibit N-glycosylation, thereby causing an abnormal Tf IEF pattern. Chronic alcoholism (>70 g per day), liver disease, severe infections, and chronic inflammatory diseases can also lead to an abnormal pattern.

8.34.5 | Confirmatory enzymatic and molecular testing

Conventionally, the follow-up after obtaining a type 1 pattern consists of enzymatic analysis in fibroblasts or leukocytes to look for PMM2-CDG and Phosphomannose isomerase (PMI-CDG). Preferably the measurements should be performed on freshly isolated leukocytes rather than on fibroblasts, since the latter might present a high residual PMM activity.⁸³ The cells should be lysed by sonication right before analysis, and both enzymes spectrophotometrically assayed at 37°C by the reduction of Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) to NADPH, according to the procedure described by Van Schaftingen and Jaeken.⁴ Abnormal PMM enzymatic activity is reported in 198 PMM2-CDG patients. In 53% of the reported cases ($n = 55$), enzymatic activity was performed on skin fibroblasts, and on white blood cells (lymphocytes or leukocytes) in 33 patients (32%). Enzymatic analysis was performed in both cell types in 12 patients. In addition, decreased PMM activity in amniocytes was also reported in three patients, in the context of prenatal diagnosis¹³ (Kjaergaard et al 1998).

When intermediate PMM activities are found, mutations should next be performed. Sanger sequencing of the eight exons and flanking intronic sequences of the *PMM2* gene (NCBI reference sequence NM_000303.2) allows to identify mutations in $>99\%$ of patients with an enzymatically confirmed PMM deficiency. Deep intronic mutations and deletions would however be missed using this approach.¹²³ The standard reference sequence indicating reported variants (ENSG00000140650) and a reference for exon numbering (ENST00000268261) can be found at www.ensembl.org.

Mutation analysis of *PMM2* has been reported in 475 patients, with mutations mostly identified by direct Sanger sequencing. In addition, three patients have been molecularly diagnosed by whole exome sequencing,^{39,138} one by autozygosity mapping,¹³⁹ and four by gene panel targeted sequencing.^{29,140}

Statement #1 (grade of recommendation: B-C).

PMM2-CDG should be confirmed by measurement of phosphomannomutase activity in fibroblasts or leukocytes and/or by mutation analysis of the *PMM2* gene.

8.34.6 | Genotype-phenotype correlations

PMM2 is the 246 amino acids product of the *PMM2* gene, localized to chromosome 16p13. Mutations have been described throughout the gene. Some 117 mutations have been reported to date, including 91 missense mutations, 5 nonsense mutations, 8 frameshift mutations, 11 splicing defects, and 1 complete loss of exon 8 due to a *Alu* retrotransposition-mediated deletion of 28 kb.¹²³ The p.R141H mutation (50 alleles) was the most frequent mutation, reported in 60% of the patients. No patient homozygous for this mutation has been reported, because this severe mutation is lethal in the homozygous state.^{141,142} A higher frequency than average (approximately 1/72) of the R141H allele is however observed in the Dutch and Danish populations² and has been attributed to a survival advantage in heterozygotes in whom the mutation may confer resistance to hepatitis B and C viruses.¹⁴³ (Tables S4 and S5).

Four patients^{144–146} were reported homozygous for the p.F119L mutation (genotype prevalence 0.8%), three patients^{120,147,148} for the p.P113L mutation (genotype prevalence 0.6%), and one patient (genotype prevalence 0.2%) for either the p.C241S,¹ the p.T237M¹⁴⁸ or the p.T237R³⁶ mutation. Despite being the second most frequent mutation for *PMM2* with a prevalence of 10.3%, the variant p.V231M has only been reported so far as compound heterozygote.

Based on the crystal structure of the isozyme of *PMM2*, for example, *PMM1*, it is possible to extrapolate on how specific frequent mutations could impact *PMM2* protein function and stability. For instance, the arginine residues at positions p.R141 and p.R123 are hence assumed to be involved in binding either the phosphate or the C2 hydroxyl group of the substrate.¹⁴⁹ On the other hand, the p.F119L mutation might disrupt the hydrophobic core of *PMM2* enzymes, which is assumed to mediate its homodimeric interaction.¹⁴⁹ No direct genotype/phenotype correlation can strictly be established for *PMM2* deficiency, although it is strongly speculated that milder phenotypes are associated to mutations affecting the folding and/or stability of the *PMM2* homodimer. Moreover, no specific mutation appears to be associated with a more severe clinical phenotype. Surprisingly, the prevalence of the frequent variant p.F119L is

extremely low in phenotypes with predominant neurological symptoms (2.6%), whilst its general prevalence for *PMM2*-CDG is higher than 20%. Finally, it is very likely that the highly variable phenotype of *PMM2*-CDG, as in other monogenic diseases, is probably determined not only by the *PMM2* mutant alleles but also by the other genes modulating the effect on the final functional enzyme activity.¹⁵⁰

Statement #1 (grade of recommendation: C)

Over 117 disease causing genetic variants in *PMM2* gene are known with no clear genotype/phenotype correlations. R141H mutation is the most frequent mutation reported only in compound heterozygous states.

8.34.7 | Common laboratory findings

The plasma concentrations of glycoproteins are often decreased in *PMM2*-CDG patients, such as haptoglobin, ceruloplasmin, TBG,^{34,63,69,79,81,113,121} haptoglobulin,¹²¹ alpha-1 anti-trypsin^{151,152} (Sara et al 2009) several clotting and anticlotting factors, including factor XI (decreased in 193/197 investigated patients), antithrombin (decreased in 207/210 investigated patients), protein C (decreased in 191/194 investigated patients) and protein S (decreased in 158/162 investigated patients). Other coagulation factors can be decreased as well, such as factor IX (decreased in 18/32 patients), factor II (decreased in 10/13 investigated patients), factor X,²⁴ and factor XII.^{50,153} In addition, *PMM2*-CDG patients often present increased and discordant levels of ALT (elevated in 63/108 investigated patients) and AST (elevated in 70/86 investigated patients), as well as low cholesterol as reported in 10 patients^{69,79,89,121,123} (Kjaergaard et al 1999; Vabres et al 1998).

Statement #1 (grade of recommendation: D)

Plasma concentrations of cholesterol, haptoglobin, alpha-1-antitrypsin, factors II, V, IX, X, and XI, antithrombin, protein C, and protein S are usually decreased in *PMM2*-CDG patients. Levels of these compounds may fluctuate during follow-up.

8.35 | Prenatal testing

Prenatal diagnosis is possible by enzymatic analysis of amniocytes¹³; this should be combined with mutation analysis of the *PMM2* gene. Foetal transferrin IEF however leads to false results.¹⁴² Prenatal diagnosis using short-tandem-repeat-polymorphisms (STRP) of the *PMM2* gene has been reported.¹⁴⁴ Using a combination of linkage and mutation analyses, they have been able to provide prenatal diagnostic information for 15 *PMM2*-CDG families. Five of the analyses indicated an affected foetus, seven were carriers and three tested as non-carriers.¹⁴⁴ Besides, decreased *PMM*

activity in amniocytes was also reported in three patients in the context of prenatal diagnosis.^{13,154}

Statement #1 (grade of recommendation: D)

Molecular analysis is the preferred technique for the first-trimester prenatal diagnosis if the mutations in both parents are known. Alternatively, enzyme analysis can be performed in cultured amniocytes but not in chorionic villi. Pre-implantation genetic testing is feasible.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank the Metabolic ERN (MetabERN) for their support to our study.

CONFLICTS OF INTEREST

Honzik Tomas and Cechova Anna were supported by General University Hospital in Prague, Czech Republic (RVO-VFN 64165), and the Ministry of Health of the Czech Republic (MZ CR AZV 16-31932A). All other authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Matthijs G, Schollen E, Bjursell C, et al. Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Hum Mutat.* 2000;16(5):386-394.
2. Schollen E, Kjaergaard S, Legius E, Schwartz M, Matthijs G. Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur J Hum Genet.* 2000;8(5):367-371.
3. 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(2-3):245-247.
4. Van Schaftingen E, Jaeken J. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS Lett.* 1995;377(3):318-320.
5. Matthijs G, Schollen E, Pardon E, et al. Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nat Genet.* 1997;16(1):88-92. Erratum in: *Nat Genet* 1997 Jul;16(3):316.
6. Jaeken J, Hennot T, Matthijs G, Freeze HH. CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(9):825-826.
7. Wurm D, Hänsen A, Kim YJ, Lindinger A, Baghai A, Gortner L. Early fatal course in siblings with CDG-Ia (caused by two novel mutations in the PMM2 gene): clinical, molecular and autopsy findings. *Eur J Pediatr.* 2007;166(4):377-378.
8. Aronica E, van Kempen AA, van der Heide M, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia: a clinicopathological report of a newborn infant with cerebellar pathology. *Acta Neuropathol.* 2005;109(4):433-442.
9. Gehrmann J, Sohlbach K, Linnebank M, et al. Cardiomyopathy in congenital disorders of glycosylation. *Cardiol Young.* 2003;13(4):345-351.
10. Malhotra A, Pateman A, Chalmers R, Coman D, Menahem S. Prenatal cardiac ultrasound finding in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Fetal Diagn Ther.* 2009;25(1):54-57.
11. Coman D, Irving M, Kannu P, Jaeken J, Savarirayan R. The skeletal manifestations of the congenital disorders of glycosylation. *Clin Genet.* 2008;73(6):507-515.
12. Barone R, Carrozzi M, Parini R, et al. A nationwide survey of PMM2-CDG in Italy: high frequency of a mild neurological variant associated with the L32R mutation. *J Neurol.* 2015;262(1):154-164.
13. Edwards M, McKenzie F, O'callaghan S, et al. Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) by cordocentesis and transferrin isoelectric focusing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops. *Prenat Diagn.* 2006;26(10):985-988.
14. Léticée N, Bessières-Grattagliano B, Dupré T, et al. Should PMM2-deficiency (CDG Ia) be searched in every case of unexplained hydrops fetalis? *Mol Genet Metab.* 2010;101(2-3):253-257.
15. van de Kamp JM, Lefeber DJ, Ruijter GJ, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia presenting with hydrops fetalis. *J Med Genet.* 2007;44(4):277-280.
16. Kjaergaard S, Schwartz M, Skovby F. Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype. *Arch Dis Child.* 2001;85(3):236-239.
17. Al-Maawali AA, Miller E, Schulze A, Yoon G, Blaser SI. Subcutaneous fat pads on body MRI—an early sign of congenital disorder of glycosylation PMM2-CDG (CDG1a). *Pediatr Radiol.* 2014;44(2):222-225.
18. Serrano M, de Diego V, Muchart J, et al. Phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): ataxia and cerebellar assessment. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:138.
19. Bortot B, Cosentini D, Faletra F, et al. PMM2-CDG: phenotype and genotype in four affected family members. *Gene.* 2013;531(2):506-509.
20. Giurgea I, Michel A, Le Merrer M, Seta N, de Lonlay P. Underdiagnosis of mild congenital disorders of glycosylation type Ia. *Pediatr Neurol.* 2005;32(2):121-123.
21. Shanti B, Silink M, Bhattacharya K, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia: heterogeneity in the clinical presentation from multivisceral failure to hyperinsulinaemic hypoglycaemia as leading symptoms in three infants with phosphomannomutase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2009;32(suppl 1):S241-S251.
22. Vuillaumier-Barrot S, Isidor B, Dupré T, Le Bizet C, David A, Seta N. Expanding the Spectrum of PMM2-CDG Phenotype. *JIMD Rep.* 2012;5:123-125.
23. Barone R, Sturiale L, Fiumara A, Uziel G, Garozzo D, Jaeken J. Borderline mental development in a congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ia patient with multisystemic involvement (intermediate phenotype). *J Inher Metab Dis.* 2007;30(1):107.
24. Briones P, Vilaseca MA, Schollen E, et al. Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inher Metab Dis.* 2002;25(8):635-646.
25. Casado M, O'Callaghan MM, Montero R, et al. Mild clinical and biochemical phenotype in two patients with PMM2-CDG (congenital disorder of glycosylation Ia). *Cerebellum.* 2012;11(2):557-563.

26. Monin ML, Mignot C, De Lonlay P, et al. 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:207.
27. Vermeer S, Kremer HP, Leijten QH, et al. Cerebellar ataxia and congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia) with normal routine CDG screening. *J Neurol*. 2007;254(10):1356-1358.
28. Pancho C, García-Cazorla A, Varea V, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia revealed by hypertransaminasemia and failure to thrive in a young boy with normal neurodevelopment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(2):230-232.
29. Vals MA, Morava E, Teeäär K, et al. Three families with mild PMM2-CDG and normal cognitive development. *Am J Med Genet A*. 2017;173(6):1620-1624.
30. García Silva MT, de Castro J, Stibler H, et al. Prenatal hypertrophic cardiomyopathy and pericardial effusion in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 1996;19(2):257-259.
31. Schiff M, Roda C, Monin ML, et al. Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *J Med Genet*. 2017;54(12):843-851.
32. Coman D, Klingberg S, Morris D, McGill J, Mercer H. Congenital disorder of glycosylation type Ia in a 6-year-old girl with a mild intellectual phenotype: two novel PMM2 mutations. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(6):1189-1190.
33. Drouin-Garraud V, Belgrand M, Grünwald S, et al. Neurological presentation of a congenital disorder of glycosylation CDG-Ia: implications for diagnosis and genetic counseling. *Am J Med Genet*. 2001;101(1):46-49.
34. Schade van Westrum SM, Nederkoorn PJ, Schuurman PR, Vulsma T, Duran M, Poll-The BT. Skeletal dysplasia and myelopathy in congenital disorder of glycosylation type IA. *J Pediatr*. 2006;148(1):115-117.
35. de Diego V, Martínez-Monseny AF, Muchart J, et al. Longitudinal volumetric and 2D assessment of cerebellar atrophy in a large cohort of children with phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG). *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(5):709-713.
36. Serrano NL, De Diego V, Cuadras D, et al. A quantitative assessment of the evolution of cerebellar syndrome in children with phosphomannomutase-deficiency (PMM2-CDG). *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):155.
37. Antoun H, Villeneuve N, Gelot A, Panisset S, Adamsbaum C. Cerebellar atrophy: an important feature of carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I. *Pediatr Radiol*. 1999;29(3):194-198.
38. Neumann LM, von Moers A, Kunze J, Blankenstein O, Marquardt T. Congenital disorder of glycosylation type Ia in a macrosomic 16-month-old boy with an atypical phenotype and homozygosity of the N216I mutation. *Eur J Pediatr*. 2003;162(10):710-713.
39. Rossi M, Medina Escobar A, Ameghino L, Merello M. Expanding the phenotype of phosphomannomutase-2 gene congenital disorder of glycosylation: Cervical dystonia. *J Neurol Sci*. 2017;378:52-54.
40. Arnoux JB, Boddaert N, Valayannopoulos V, et al. Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol Genet Metab*. 2008;93(4):444-449.
41. Artigas J, Cardo E, Pineda M, Nosas R, Jaeken J. Phosphomannomutase deficiency and normal pubertal development. *J Inherit Metab Dis*. 1998;21(1):78-79.
42. Dinopoulos A, Mohamed I, Jones B, Rao S, Franz D, de Grauw T. Radiologic and neurophysiologic aspects of stroke-like episodes in children with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatrics*. 2007;119(3):e768-e772.
43. Hahn SH, Minnich SJ, O'Brien JF. Stabilization of hypoglycosylation in a patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(1):235-237.
44. Ishikawa N, Tajima G, Ono H, Kobayashi M. Different neurological findings during two stroke-like episodes in a patient with a congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain and Development*. 2009;31(3):240-243.
45. Izquierdo-Serra M, Martínez-Monseny AF, López L, et al. Stroke-like episodes and cerebellar syndrome in phosphomannomutase deficiency (PMM2-CDG): evidence for hypoglycosylation-driven channelopathy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):619.
46. Kondo I, Mizugishi K, Yoneda Y, et al. Missense mutations in phosphomannomutase 2 gene in two Japanese families with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Clin Genet*. 1999;55(1):50-54.
47. Krasnewich D, O'Brien K, Sparks S. Clinical features in adults with congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia). *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(3):302-306.
48. Pearl PL, Krasnewich D. Neurologic course of congenital disorders of glycosylation. *J Child Neurol*. 2001;16(6):409-413.
49. van Baalen A, Stephani U, Rohr A. Increased brain lactate during stroke-like episode in a patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain and Development*. 2009;31(2):183.
50. van Ommen CH, Peters M, Barth PG, Vreken P, Wanders RJ, Jaeken J. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1a: a variant phenotype with borderline cognitive dysfunction, cerebellar hypoplasia, and coagulation disturbances. *J Pediatr*. 2000;136(3):400-403.
51. Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pineda M, et al. Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2009;13(5):444-451.
52. Jensen H, Kjaergaard S, Klie F, Moller HU. Ophthalmic manifestations of congenital disorder of glycosylation type Ia. *Ophthalmic Genet*. 2003;24(2):81-88.
53. Messenger WB, Yang P, Pennesi ME. Ophthalmic findings in an infant with phosphomannomutase deficiency. *Doc Ophthalmol*. 2014;128(2):149-153.
54. Wang BZ, Siriwardana P, Taranath D. Macular hypoplasia in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Case Rep Ophthalmol*. 2012;3(1):142-144.
55. Morava E, Wosik HN, Sykut-Cegielska J, et al. Ophthalmological abnormalities in children with congenital disorders of glycosylation type I. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(3):350-354.
56. Al Teneiji A, Bruun TU, Sidky S, et al. Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. *Mol Genet Metab*. 2017;120(3):235-242.
57. Damen G, de Klerk H, Huijman J, den Hollander J, Sinaasappel M. Gastrointestinal and other clinical manifestations in 17 children with congenital disorders of glycosylation type Ia, Ib, and Ic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38(3):282-287.

58. Romano S, Bajolle F, Valayannopoulos V, et al. Conotruncal heart defects in three patients with congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG Ia). *J Med Genet*. 2009;46(4):287-288.
59. Coman D, Bostock D, Hunter M, et al. Prenatal cardiac ultrasound finding in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Fetal Diagn Ther*. 2009;25(1):54-57.
60. Footitt EJ, Karimova A, Burch M, et al. Cardiomyopathy in the congenital disorders of glycosylation (CDG): a case of late presentation and literature review. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32(suppl 1):S313-S319.
61. Kusa J, Pyrkosz A, Skiba A, Szkutnik M. Cardiac manifestations of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2003;24(5):493-494.
62. Rudaks LI, Andersen C, Khong TY, Kelly A, Fietz M, Barnett CP. Hypertrophic cardiomyopathy with cardiac rupture and tamponade caused by congenital disorder of glycosylation type Ia. *Pediatr Cardiol*. 2012;33(5):827-830.
63. Clayton PT, Winchester BG, Keir G. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy in a neonate with the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 1992;15(6):857-856.
64. Işıkay S, Başpınar O, Yılmaz K. A case of congenital disorder of glycosylation Ia presented with recurrent pericardial effusion. *Iran J Pediatr*. 2014;24(5):652-654.
65. Kristiansson B, Borulf S, Conradi N, Erlanson-Albertsson C, Ryd W, Stibler H. Intestinal, pancreatic and hepatic involvement in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998;27(1):23-29.
66. Resende C, Carvalho C, Alegria A, et al. Congenital disorders of glycosylation with neonatal presentation. *BMJ Case Rep*. 2014;2014.
67. Feldman BJ, Rosenthal D. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome-associated pericardial effusion treated with corticosteroids and salicylic acid. *Pediatr Cardiol*. 2002;23(4):469-471.
68. Marquardt T, Hülskamp G, Gehrmann J, Debus V, Harms E, Kehl HG. Severe transient myocardial ischaemia caused by hypertrophic cardiomyopathy in a patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Eur J Pediatr*. 2002;161(10):524-527.
69. de Lonlay P, Seta N, Barrot S, et al. A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet*. 2001;38(1):14-19.
70. Eyskens F, Ceuterick C, Martin JJ, Janssens G, Jaeken J. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with previously unreported features. *Acta Paediatr*. 1994;83(8):892-896.
71. Kjaergaard S, Müller J, Skovby F. Prepubertal growth in congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia). *Arch Dis Child*. 2002;87(4):324-327.
72. McKenzie FA, Fietz M, Fletcher J, Smith RL, Wright IM, Jaeken J. A previously undescribed form of congenital disorder of glycosylation with variable presentation in siblings: early fetal loss with hydrops fetalis, and infant death with hypoproteinemia. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(17):2029-2034.
73. Noelle V, Knuepfer M, Pulzer F, et al. Unusual presentation of congenital disorder of glycosylation type Ia: congenital persistent thrombocytopenia, hypertrophic cardiomyopathy and hydrops-like aspect due to marked peripheral oedema. *Eur J Pediatr*. 2005;164(4):223-226.
74. Westphal V, Peterson S, Patterson M, et al. Functional significance of PMM2 mutations in mildly affected patients with congenital disorders of glycosylation Ia. *Genet Med*. 2001;3(6):393-398.
75. Miller BS, Duffy MM, Addo OY, Sarafoglou K. rhIGF-1 therapy for growth failure and IGF-1 deficiency in congenital disorder of glycosylation Ia (PMM2 deficiency). *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2013;1(3):2324709613503316.
76. Truin G, Guillard M, Lefeber DJ, et al. Pericardial and abdominal fluid accumulation in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol Genet Metab*. 2008;94(4):481-484.
77. Verstegen RH, Theodore M, van de Klerk H, Morava E. Lymphatic edema in congenital disorders of glycosylation. *JIMD Rep*. 2012;4:113-116.
78. Ren C, Fang F, Huang Y, Cheng H, Dai L. Clinical and genetic analysis for two children with congenital disturbance of glycosylation with PMM2 gene mutations. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2015;53(12):938-942.
79. Schoffer KL, O'Sullivan JD, McGill J. Congenital disorder of glycosylation type Ia presenting as early-onset cerebellar ataxia in an adult. *Mov Disord*. 2006;21(6):869-872.
80. Grünwald S. The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(9):827-834.
81. Ong BB, Gole GA, Robertson T, McGill J, de Lore D, Crawford M. Retinal hemorrhages associated with meningitis in a child with a congenital disorder of glycosylation. *Forensic Sci Med Pathol*. 2009;5(4):307-312.
82. Marques-da-Silva D, Dos Reis Ferreira V, Monticelli M, et al. Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(2):195-207.
83. Grünwald S, Schollen E, Van Schaftingen E, Jaeken J, Matthijs G. High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *Am J Hum Genet*. 2001;68(2):347-354.
84. Enns GM, Steiner RD, Buist N, et al. Clinical and molecular features of congenital disorder of glycosylation in patients with type I sialotransferrin pattern and diverse ethnic origins. *J Pediatr*. 2002;141(5):695-700.
85. Grünwald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res*. 2002;52(5):618-624.
86. Barone R, Sturiale L, Sofia V, et al. Clinical phenotype correlates to glycoprotein phenotype in a sib pair with CDG-Ia. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(16):2103-2108.
87. Veneselli E, Biancheri R, Di Rocco M, Tortorelli S. Neurophysiological findings in a case of carbohydrate-deficient glycoprotein (CDG) syndrome type I with phosphomannomutase deficiency. *Eur J Paediatr Neurol*. 1998;2(5):239-244.
88. Hutcheson AC, Gray RG, Spencer DA, Keir G. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome; multiple abnormalities and diagnostic delay. *Arch Dis Child*. 1995;72(5):445-446.
89. Jamroz E, Adamek D, Paprocka J, Adamowicz M, Marszał E, Wevers RA. CDG type Ia and congenital cytomegalovirus infection: two coexisting conditions. *J Child Neurol*. 2009;24(1):13-18. <https://doi.org/10.1177/0883073808321041>.
90. van der Knaap MS, Wevers RA, Monnens L, Jakobs C, Jaeken J, van Wijk JA. Congenital nephrotic syndrome: a novel phenotype of type I carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 1996;19(6):787-791.

91. Altassan R, Witters P, Saifudeen Z, et al. Renal involvement in PMM2-CDG, a mini-review. *Mol Genet Metab*. 2018;123(3):292-296.
92. de la Morena-Barrio ME, Sevivas TS, Martinez-Martinez I, et al. Congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG) in a patient with antithrombin deficiency and severe thrombophilia. *J Thromb Haemost*. 2012;10(12):2625-2627.
93. Linssen M, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol Genet Metab*. 2013;109(1):107-111. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.02.006>.
94. Tomkowski WZ, Dybowska M, Kuca P, Gralec R, Burakowski J. The inefficacy of enoxaparin prophylaxis in a patient with congenital antithrombin deficiency. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2009;15(2):241. <https://doi.org/10.1177/1076029607308861>.
95. Lefrère B, Stepanian A, Itzhar-Baikian N, et al. Deep venous thrombosis treated by rivaroxaban in a young patient with type Ia carbohydrate-deficient glycoprotein (CDG) syndrome. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2018;76(2):217-223.
96. Ono H, Sakura N, Yamashita K, Yuasa I, Ohno K. Novel non-sense mutation (R194X) in the PMM2 gene in a Japanese patient with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain Dev*. 2003;25(7):525-528. Erratum in: *Brain Dev*. 2004 Aug;26(5):347.
97. Le Bizet C, Vuillaumier-Barrot S, Barnier A, Dupré T, Durand G, Seta N. A new insight into PMM2 mutations in the French population. *Hum Mutat*. 2005;25(5):504-505.
98. Van Geet C, Jaeken J, Freson K, et al. Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24(4):477-492.
99. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: CHEST guideline and expert panel report. *Chest*. 2016;149(2):315-352.
100. Monagle P. Diagnosis and management of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in neonates and children. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(7):683-690.
101. Meaudre E, Meyrieux V, Suprano I, Camboulives J, Paut O. Anesthesia considerations in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Paediatr Anaesth*. 2005;15(10):905-906.
102. de Zegher F, Jaeken J. Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I from birth through adolescence. *Pediatr Res*. 1995;37(4 pt 1):395-401.
103. Miller BS, Khosravi MJ, Patterson MC, Conover CA. IGF system in children with congenital disorders of glycosylation. *Clin Endocrinol*. 2009;70(6):892-897.
104. Funke S, Gardeitchik T, Kouwenberg D, et al. Perinatal and early infantile symptoms in congenital disorders of glycosylation. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(3):578-584.
105. Mohamed M, Theodore M, Claahsen-van der Grinten H, et al. Thyroid function in PMM2-CDG: diagnostic approach and proposed management. *Mol Genet Metab*. 2012;105(4):681-683.
106. Schade van Westrum SM, Nederkoorn PJ, Schuurman PR, Vulsma T, Duran M, Poll-The BT. Skeletal dysplasia and myelopathy in congenital disorder of glycosylation type IA. *J Pediatr*. 2006;148(1):115-117.
107. Jaeken J, Stibler H, Hagberg B. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1991;375:1-71.
108. Böhles H, Sewell AA, Gebhardt B, Reinecke-Lüthge A, Klöppel G, Marquardt T. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia—leading symptom in a patient with congenital disorder of glycosylation Ia (phosphomannomutase deficiency). *J Inherit Metab Dis*. 2001;24(8):858-862.
109. Fiumara A, Barone R, Del Campo G, Striano P, Jaeken J. Electroclinical features of early-onset epileptic encephalopathies in congenital disorders of glycosylation (CDGs). *JIMD Rep*. 2016;27:93-99.
110. Barone R, Fiumara A, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation with emphasis on cerebellar involvement. *Semin Neurol*. 2014;34(3):357-366. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1387197>.
111. Pineda M, Pavia C, Vilaseca MA, et al. Normal pubertal development in a female with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *Arch Dis Child*. 1996;74(3):242-243.
112. Pérez-Dueñas B, García-Cazorla A, Pineda M, et al. Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2009;13(5):444-451.
113. Coman D, McGill J, MacDonald R, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia: three siblings with a mild neurological phenotype. *J Clin Neurosci*. 2007;14(7):668-672.
114. Garel C, Baumann C, Besnard M, Ogier H, Jaeken J, Hassan M. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I: a new cause of dysostosis multiplex. *Skelet Radiol*. 1998;27(1):43-45.
115. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016;31(5):926-937.
116. Brum JM, Rizzo IM, Mello WD, Speck-Martins CE. Congenital disorder of glycosylation type Ia: a non-progressive encephalopathy associated with multisystemic involvement. *Arq Neuropsiquiatr*. 2008;66(3A):545-548.
117. García-López R, de la Morena-Barrio ME, Alsina L, et al. Natural killer cell receptors and cytotoxic activity in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG). *PLoS One*. 2016;11(7):e0158863.
118. Blank C, Smith LA, Hammer DA, et al. Recurrent infections and immunological dysfunction in congenital disorder of glycosylation Ia (CDG Ia). *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(4):592.
119. Dyer JA, Winters CJ, Chamlin SL. Cutaneous findings in congenital disorders of glycosylation: the hanging fat sign. *Pediatr Dermatol*. 2005;22(5):457-460.
120. de la Morena-Barrio ME, Di Michele M, Lozano ML, et al. Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients. *Thromb Res*. 2014;133(3):412-417.
121. Pavone L, Fiumara A, Barone R, et al. Olivopontocerebellar atrophy leading to recognition of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *J Neurol*. 1996;243(10):700-705.
122. Mehlman CT, Nematbakhsh AR, Crawford AH, Berlin RE. Spinal deformity associated with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome (Jaeken's syndrome): a report of three cases. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(7):E132-E135.
123. Schollen E, Keldermans L, Foulquier F, et al. Characterization of two unusual truncating PMM2 mutations in two CDG-Ia patients. *Mol Genet Metab*. 2007;90(4):408-413.
124. van den Boogert MAW, Rader DJ, Holleboom AG. New insights into the role of glycosylation in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(6):502-506.
125. Kasapçak ÇS, Barış Z, Kılıç M, et al. PMM2-CDG and sensorineural hearing loss. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(5):629-630.
126. Harlor AD Jr, Bower C, Committee on Practice and Ambulatory Medicine; Section on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Hearing assessment in infants and children: recommendations beyond neonatal screening. *Pediatrics*. 2009;124(4):1252-1263.

127. Wolthuis DF, Janssen MC, Cassiman D, Lefeber DJ, Morava E. Defining the phenotype and diagnostic considerations in adults with congenital disorders of N-linked glycosylation. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(2):217-224.
128. Sturiale L, Barone R, Garozzo D. The impact of mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(4):891-899.
129. Lefeber DJ, Morava E, Jaeken J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(4):849-852.
130. Lacey JM, Bergen HR, Magera MJ, Naylor S, O'Brien JF. Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Clin Chem.* 2001;47(3):513-518.
131. Tegtmeyer LC, Rust S, van Scherpenzeel M, et al. Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med.* 2014;370(6):533.
132. Chu KL, Chien YH, Tsai CE, Freeze HH, Eklund E, Hwu WL. Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type Ia. *J Formos Med Assoc.* 2004;103(9):721-723.
133. Coorg R, Lotze TE. Child neurology: a case of PMM2-CDG (CDG 1a) presenting with unusual eye movements. *Neurology.* 2012;79(15):e131-e133.
134. Jaeken J, Artigas J, Barone R, et al. Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with type I isoelectrofocusing pattern of serum sialo-transferrins. *J Inherit Metab Dis.* 1997;20(3):447-449.
135. Zühlendorf A, Park JH, Wada Y, et al. Transferrin variants: pitfalls in the diagnostics of congenital disorders of glycosylation. *Clin Biochem.* 2015 Jan;48(1-2):11-13. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.022>.
136. Denecke J. Biomarkers and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Expert Opin Med Diagn.* 2009;3(4):395-409.
137. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers.* 2008;25(4-5):267-278.
138. Choi R, Woo HI, Choe BH, et al. Application of whole exome sequencing to a rare inherited metabolic disease with neurological and gastrointestinal manifestations: a congenital disorder of glycosylation mimicking glycogen storage disease. *Clin Chim Acta.* 2015;444:50-53.
139. Cabezas OR, Flanagan SE, Stanescu H, et al. Polycystic kidney disease with hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a promoter mutation in phosphomannomutase 2. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(8):2529-2539.
140. Bastaki F, Bizzari S, Hamici S, et al. Single-center experience of N-linked congenital disorders of glycosylation with a summary of molecularly characterized cases in Arabs. *Ann Hum Genet.* 2018;82(1):35-47.
141. Vals MA, Pajusalu S, Kals M, Mägi R, Õunap K. The prevalence of PMM2-CDG in Estonia based on population carrier frequencies and diagnosed patients. *JIMD Rep.* 2018;39:13-17.
142. Matthijs G, Schollen E, Cassiman J-J, Cormier-Daire V, Jaeken J, van Schaftingen E. Prenatal diagnosis in CDG1 families: beware of heterogeneity. *Eur J Hum Genet.* 1998;6(2):99-104.
143. Freeze HH, Westphal V. Balancing N-linked glycosylation to avoid disease. *Biochimie.* 2001 Aug;83(8):791-799.
144. Bjursell C, Wahlström J, Berg K, et al. Detailed mapping of the phosphomannomutase 2 (PMM2) gene and mutation detection enable improved analysis for Scandinavian CDG type I families. *Eur J Hum Genet.* 1998;6(6):603-611.
145. Bjursell C, Erlandson A, Nordling M, et al. PMM2 mutation spectrum, including 10 novel mutations, in a large CDG type 1A family material with a focus on Scandinavian families. *Hum Mutat.* 2000;16(5):395-400.
146. Erlandson A, Bjursell C, Stübler H, Kristiansson B, Wahlström J, Martinsson T. Scandinavian CDG-Ia patients: genotype/phenotype correlation and geographic origin of founder mutations. *Hum Genet.* 2001;108(5):359-367.
147. Matthijs G, Schollen E, Heykants L, Grünwald S. Phosphomannomutase deficiency: the molecular basis of the classical Jaeken syndrome (CDGS type Ia). *Mol Genet Metab.* 1999;68(2):220-226.
148. Vega AI, Pérez-Cerdá C, Abia D, et al. Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(4):929-939.
149. Silvaggi NR, Zhang C, Lu Z, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN. The X-ray crystal structures of human alpha-phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Biol Chem.* 2006;281(21):14918-14926.
150. Dipple KM, McCabe ER. Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):43-50.
151. Dupré T, Barnier A, de Lonlay P, et al. Defect in N-glycosylation of proteins is tissue-dependent in congenital disorders of glycosylation Ia. *Glycobiology.* 2000;10(12):1277-1281.
152. Hertz-Pannier L, Déchaux M, Sinico M, et al. Congenital disorders of glycosylation type I: a rare but new cause of hyperechoic kidneys in infants and children due to early microcystic changes. *Pediatr Radiol.* 2006;36(2):108-114.
153. Stefanits H, Konstantopoulou V, Kuess M, Milenkovic I, Matula C. Initial diagnosis of the congenital disorder of glycosylation PMM2-CDG (CDG1a) in a 4-year-old girl after neurosurgical intervention for cerebral hemorrhage. *J Neurosurg Pediatr.* 2014;14(5):546-549.
154. Nogueira C, Quelhas D, Vilarinho L. Prenatal diagnosis for CDG Ia based on post-mortem molecular study of Guthrie card. *Mol Genet Metab.* 2006;87(4):379.
155. Zhang W, James PM, Ng BG, 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(1):208-217.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Altassan R, Péanne R, Jaeken J, et al. International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42:5-28. <https://doi.org/10.1002/jimd.12024>

Annexe III: Article “A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation”

A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation

Sialylation is known to regulate platelet clearance.¹ Sialic acids are terminal sugar components of the oligosaccharide chains of glycoproteins and glycolipids. During platelet ageing, surface modifications such as the loss of sialic acid (i.e., desialylation) expose β -galactose residues. These senescence antigens facilitate platelet clearance, influence the platelet life span, and stimulate thrombopoietin (TPO) production.² Greater exposure of non-sialylated glycan chains may be associated with accelerated platelet clearance. Sialyltransferases constitute a family of glycosyltransferases that transfer sialic acid from the donor substrate (cytidine-5'-monophosphate (CMP)-sialic acid) to acceptor oligosaccharide substrates.³ Mice in which the *St3gal4* sialyltransferase gene has been knocked out are thrombocytopenic; the absence of sialic acid increases β -galactose exposure and thus results in the rapid clearance of platelets from the circulation.⁴ In sialic acid metabolism, a specific transporter [solute carrier family 35 member A1 (SLC35A1)] transfer CMP-sialic acid to the medial- and trans-Golgi apparatus, where it is used as a substrate for the sialylation of proteins by various sialyltransferases (Figure 1).

Herein, we report on a congenital deficiency in SLC35A1 in two siblings born to consanguineous parents

and who displayed moderate macrothrombocytopenia. The sister (II:1, born in 2001) and brother (II:2, born in 2005) shared similar clinical presentations from birth, including delayed psychomotor development, epilepsy, ataxia, microcephaly, choreiform movements, and macrothrombocytopenia. This presentation was highly suggestive of an inherited disease. The hemorrhagic symptoms consisted of easy bruising for both siblings, and menorrhagia (leading to iron deficiency) for II:1. Persistent thrombocytopenia was observed in both siblings, with a mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) platelet count of 95 ± 10 G/L ($n=31$ analyses between 2002 and 2017) for II:1 and 60 ± 6 G/L ($n=21$ analysis between 2010 and 2015) for II:2. Comparative with normal values (6.5 to 12 fL), the platelet volume was high (mean $\pm$ SEM: 15.7 ± 3.9 fL ($n=31$) for II:1, and 19.1 and 20.4 fL for II:2). A peripheral blood smear review revealed the presence of giant platelets and macroplatelets (Figure 2A). Fluorescence analysis of the immature platelet fraction (on a Sysmex XE 5000 hematology analyzer) indicated high levels of reticulated platelets: 54% and 66% ($n=2$) for II:1, and 46% and 60% ($n=2$) for II:2; the normal range is $<5\%$). Bone marrow aspirate smears of II:1 revealed an elevated megakaryocyte count (>2 megakaryocytes per low-power field), with a predominance of immature forms (characterized by small size, hypolobulation, and a basophilic cytoplasm, as observed in peripheral thrombocytopenia; Figure 2B). The elevated proportion of immature platelets

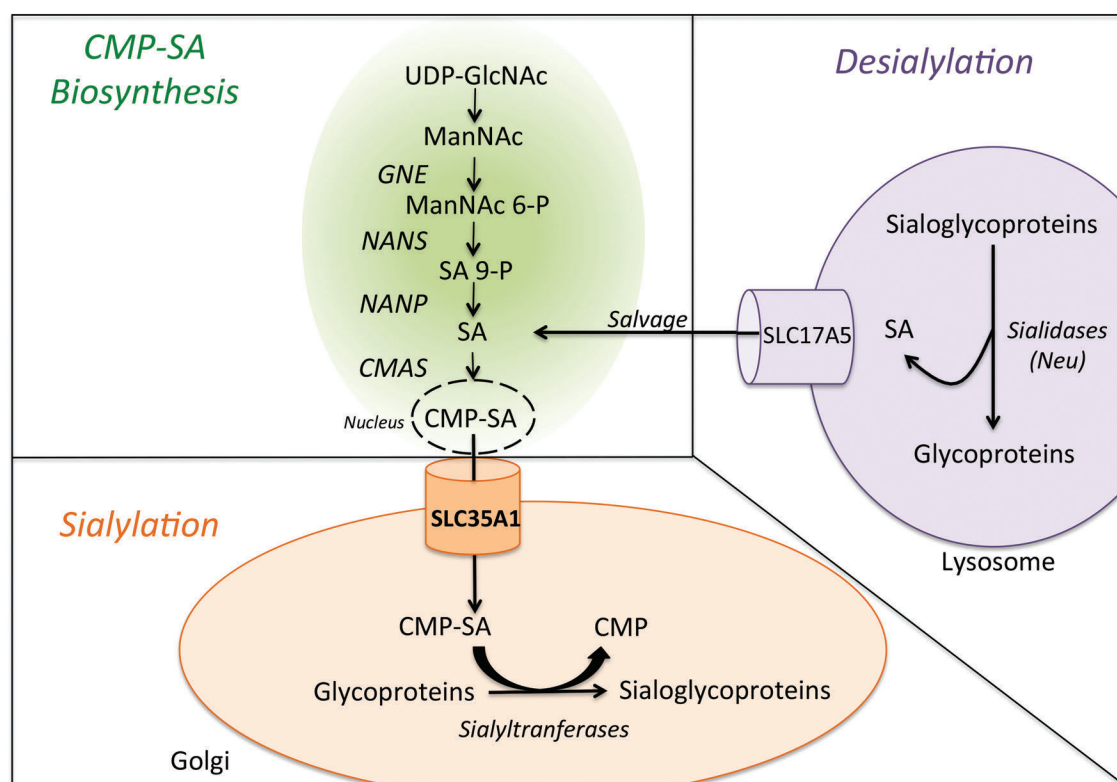


Figure 1. A simplified diagram of sialic acid metabolism in human. Biosynthesis of sialic acid (SA) mostly takes place in the cytoplasm, although the CMP-sialic acid synthase (CMAS) reaction occurs in the nucleus. The synthesis of ManNAc (N-acetylmannosamine) is carried out in two steps by UDP-GlcNAc-2 epimerase (GNE). NeuNAc synthase (NANS) generates phosphorylated forms of sialic acid, which must be dephosphorylated by a specific phosphatase (Neu5Ac-9-P-phosphatase, NANP) to yield free sialic acid in the cytoplasm. The free sialic acid can then reenter the biosynthesis pathway (indicated as "salvage" in the diagram). The CMP-SA (produced in the nucleus) is transferred by SLC35A1 into the Golgi apparatus, where it is used as a substrate for sialylation by sialyltransferases.

and the bone marrow analysis results were suggestive of a compensatory mechanism for peripheral thrombocytopenia.

By combining whole-exome sequencing with the genetic mapping of disease loci (assuming autosomal recessive inheritance), we found that patient II:1 was homozygous for a missense mutation in the *SLC35A1* gene (NM_006416.4: c.439T>C: p.Ser147Pro, Figure 2C). The presence of this variant in both siblings was confirmed by Sanger sequencing (Figure 2C). The variant was absent from the dbSNP150, 1000Genomes or ExAC Browser databases, and was predicted to be pathogenic (Polyphen-2 score: 1).⁵ Both parents were heterozygous for the mutation (Figure 2C). The *SLC35A1* protein comprises 10 transmembrane domains (TMDs), and a topol-

ogy analysis indicated that the p.Ser147Pro mutation was located in TMD-5. Given that the insertion of a Pro residue into a TMD is predicted to have a profound impact on a protein's activity, the mutation p.Ser147Pro is expected to be deleterious. The cytoplasmic loop between TMDs 4 and 5 is important for *SLC35A1*'s transporter activity,⁶ and so a mutation in TMD-5 might change the protein's activity via a conformational change in this loop and/or by destabilizing the transmembrane helix. Capillary electrophoresis of patient II:1's serum transferrin (Figure 2D) showed elevated levels of hyposialylated glycoforms (3-sialo to 1-sialo), which is highly suggestive of a congenital disorder of glycosylation and thus the impaired maturation of protein-linked N-glycans in the Golgi apparatus. *SLC35A1* deficiency

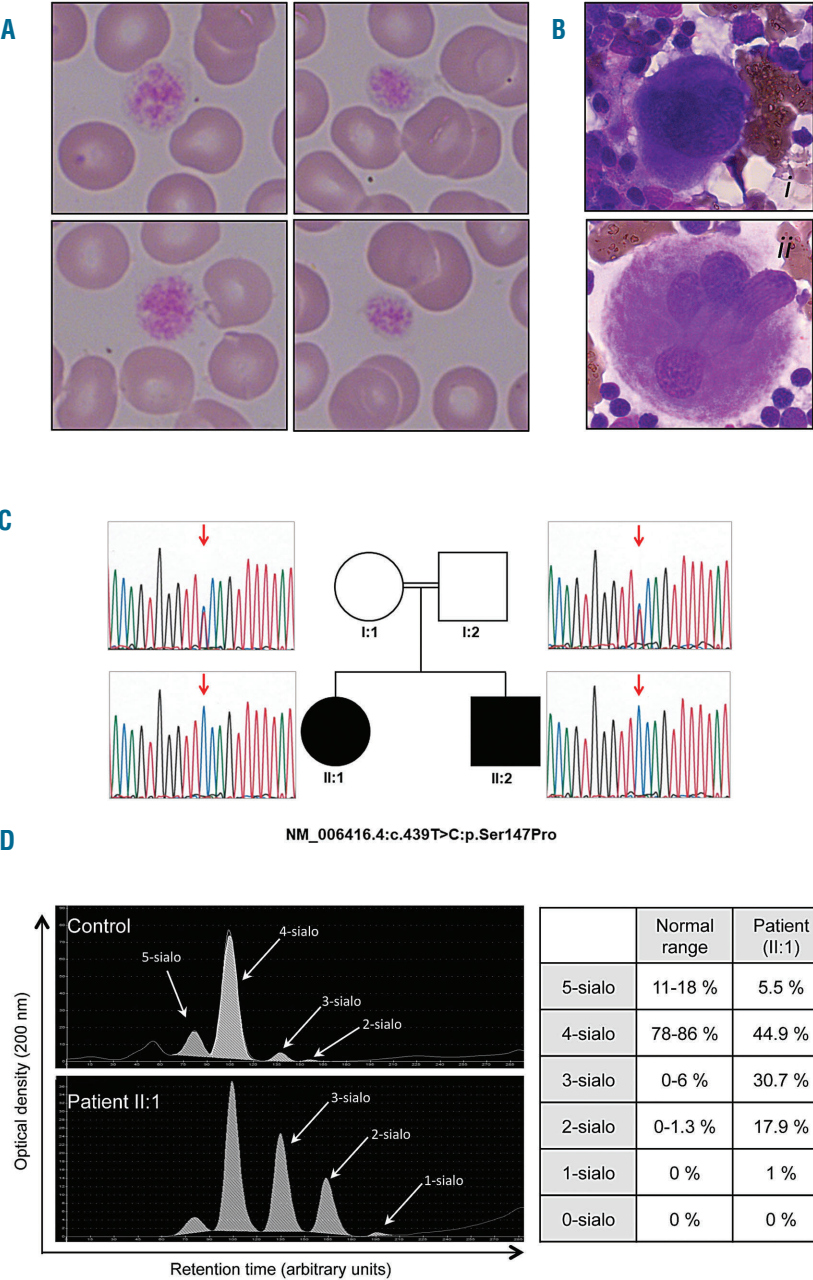


Figure 2. Blood and bone marrow smears, characterization of the *SLC35A1* mutation in the family, and the capillary electrophoresis transferrin profile. Blood (A) and bone marrow (B) smears of patient II:1 were stained with May-Grünwald Giemsa reagent. The blood smear showed the presence of large platelets (relative to the size of red blood cells). The MKs from patient II:1's bone marrow were immature (i), as characterized by small size, hypoblobulation and a basophilic cytoplasm, and (ii) granular MKs. C) The family's pedigree, and Sanger sequencing results. Arrows indicate the position of the mutated nucleotide. Genetic mapping of disease loci in the family was carried out using an Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K NspI SNP microarray. Multipoint linkage analysis of single-nucleotide polymorphism (SNP) data was performed using Alohoma and Merlin software. We performed homozygosity mapping of SNP data, and found 18 candidate loci of at least 1 Mb in size with a maximum logarithm of odds score (Zmax) of 1.8. Whole exome sequencing (WES) was performed in DNA from the index case (II:1), using the Exome Capture Agilent SureSelect XT V5 kit for library preparation and exome enrichment. Sequencing was performed on a Genome Analyzer IIx Illumina instrument in paired-end mode with a read length of 2x100bp. The median WES coverage was 60. Reads were aligned with the human reference genome sequence (UCSC hg19, NCBI build 37.3) using the BWA software package. Variants were selected using SAMtools, and then annotated using Annovar software. Variants in coding regions (including non-synonymous and nonsense mutations), intron-exon junctions or short coding insertions or deletions were selected when the minor allele frequency was less than 0.0030. The homozygous c.439T>C mutation in *SLC35A1* was confirmed by Sanger sequencing, using primers flanking the mutations (SLC960-F: 5'-GCCCGGCCATTATCAAATA-3', SLC960-R: 5'-AAATCAAAGAAATGTAGTCATGCTG-3') in both affected individuals. Both affected individuals were homozygous for the mutation (II:1 and II:2, c.439T>C: p.Ser147Pro). The nucleotide and amino acid changes are indicated with respect to the reference sequences (Genbank: NM_006416.4 and NP_006407.1, respectively). Open symbols: unaffected; filled symbols: affected. D) The capillary electrophoresis transferrin profile for a control (top panel) and for patient II:1 (bottom panel) was performed as previously described.¹⁵ x axis: the migration time in arbitrary units. y axis: the optical density in arbitrary units. 5-sialo, 4-sialo, 3-sialo, 2-sialo, and 0-sialo: penta-, tetra-, tri-, di- and asialotransferrin, respectively. The isoform distributions for the control and for patient II:1 are indicated in the table.

has been referred to as congenital disorder of N-linked glycosylation II_f (CDG-II_f), with the new nomenclature SLC35A1-CDG.⁷

Given the recent discovery of sialylation's importance in senescent platelet clearance, a congenital deficiency in the CMP-sialic acid transporter might account for the thrombocytopenia identified in the two probands. Since SLC35A1 is expressed in megakaryocytes and platelets (*data not shown*), we analyzed platelets from patient II:1. We performed a flow cytometry assay for platelet β -galactose exposure by using the lectin *Ricinus communis* agglutinin (RCA), which is specific for the β -galactose exposed in the absence of sialic acid. The significant elevation ($P<0.001$) in platelet surface RCA labeling for II:1

was highly suggestive of a sialylation defect (Figure 3A). To take platelet size into account, we also measured the ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of RCA to the MFI of GPIIb. A significant elevation ($P<0.01$) in II:1 (relative to a control) was still observed (Figure 3B) - indicating the presence of a qualitative defect in platelet sialylation. This defect could not be attributed to anti-GPIIb antibodies [which have been reported elsewhere to induce platelet desialylation in immune thrombocytopenia (ITP)]⁸ because none were present in II:1's plasma, according to a conventional assay. Moreover, we confirmed the absence of a plasma effect on platelet sialylation; when normal platelets were incubated with either normal plasma or patient II:1's plasma, no difference in

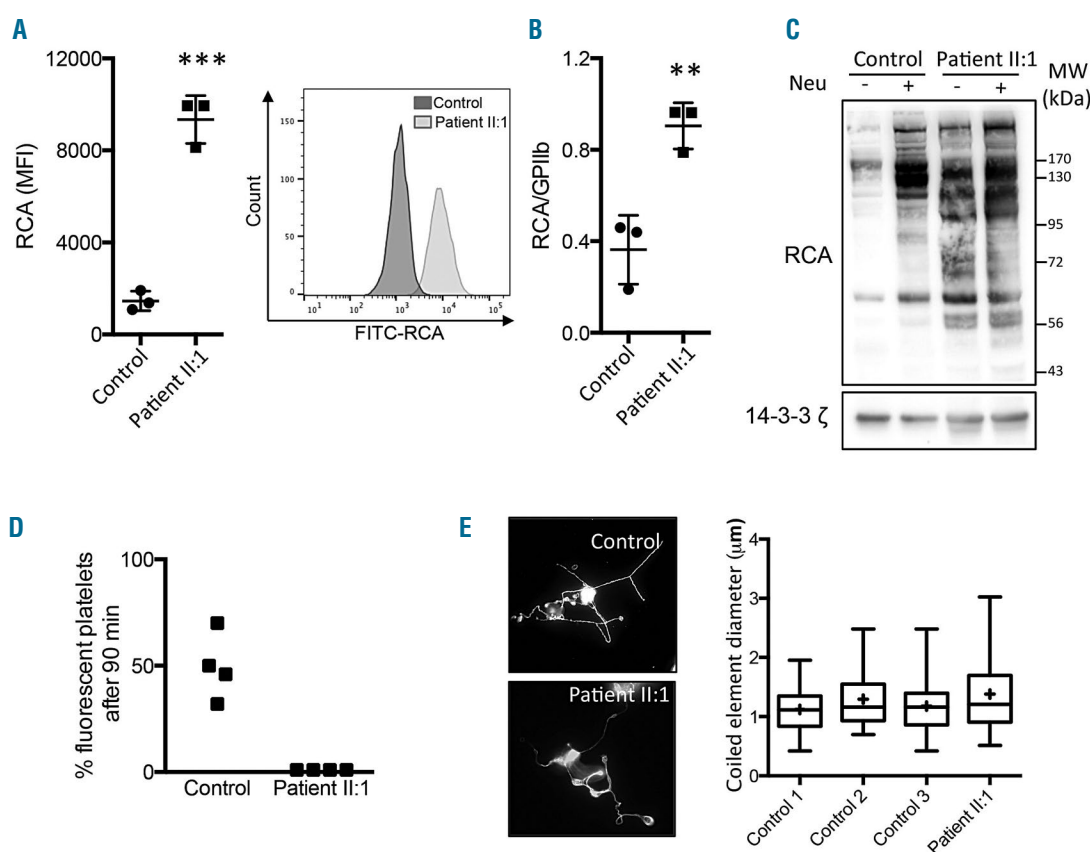


Figure 3. Effect of SLC35A1 mutation on platelet sialylation, life span and proplatelet formation. A) Left panel: the mean fluorescence intensity (MFI) of Ricinus communis agglutinin I (RCA) for three healthy controls and patient II:1 in triplicate. Right panel: the histogram for FITC-RCA labeling on platelets from controls and II:1. Platelet surface β -galactose exposure was determined using flow cytometry with FITC-conjugated RCA (12.5 μ g/mL, Vector Labs). Platelet-rich plasma (5 μ L) was incubated with 12.5 μ g/mL RCA for 30 min at room temperature in a final volume of 100 μ L. The reaction was terminated by adding PBS (400 μ L), and the samples were immediately analyzed in a flow cytometer (Beckman Coulter). For each sample, the MFI was determined for a total of 20,000 cells. GPIIb glycoprotein was also quantified by using the PLT GP/Receptors® assay (Biocytex). B) The mean $\pm$ SEM RCA/GPIIb ratio for three healthy controls and the patient II:1 in triplicate (** $P<0.01$, *** $P<0.001$ in Student's t-test). C) A lectin blot of washed platelets. Washed platelets (3×10^9 /mL) were completely desialylated (or not) by treatment with α -2,3,6,8 neuraminidase from Clostridium perfringens (0.2 U/mL, 15 min, Sigma-Aldrich, indicated as Neu). After 15 min, washed platelets from the control and from II:1 were lysed in SDS denaturing buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 100 μ M phenylarsine oxide, 1% SDS, 5 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin, pH 7.4). The proteins were subjected to SDS-PAGE, and were then transferred to nitrocellulose membranes. The latter were incubated with biotinylated RCA (20 μ g/mL, Vector Labs). A loading control was monitored by the expression of 14-3-3 ζ . Immunoreactive bands were visualized using Enhanced Chemiluminescence Detection Reagents (Pierce). Images of the chemiluminescent signal were captured using G:BOX Chemi XT16 Image Systems software and quantified using Gene Tools software (version 4.0.0.0, Syngene). MW: molecular weights of the protein ladder. D) Measurements of platelet life span in mice. Washed platelets were first stained with 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA, 10 μ M), washed and then intravenously injected in male NOD SCID gamma mice as a single bolus (10^6 CMFDA-labeled platelets). Human platelets were monitored by flow cytometry of whole blood samples collected at 1 min and 90 min after injection. The proportion of fluorescent platelets at 90 min was calculated as a percentage of the fluorescent platelets at 1 min. Four mice were injected with 10^6 platelets from a control, and four other mice were injected with 10^6 platelets from patient II:1. In the scatter plot, each dot represents a mouse. E) Measurement of proplatelet formation. CD34⁺ cells were isolated from peripheral blood using an immunomagnetic technique (Miltenyi Biotec). Human TPO (50 nM) was added once to the culture medium on day 0, followed by 20 nM TPO on day 6. On day 12. The MKs were then observed and stained for α -tubulin (magnification: 600x, bottom panel). The coiled element diameters were then measured (right panel). The quantitative data are presented in box and whisker plots; the lower hinge represents the 25th percentile, and the upper hinge represents the 75th percentile. The line within the box marks the median, and the mean is represented by a cross (+). The maxima and minima are at the ends of the whiskers (n=65 MKs in control 1, 31 in control 2, 96 in control 3, and 53 for patient II:1).

the mean $\pm$ SEM RCA binding was observed (21552 ± 1003 and 23080 ± 1930 arbitrary units (AU), respectively; $n=3$). In contrast, the incubation of normal platelets with control plasma in the presence of botrocetin (a positive control) induced greater RCA binding (38845 ± 880 AU, $n=3$; $P<0.001$), as expected.⁹ Next, we investigated the sialylation defect by Western blotting II:1's platelet lysate. The RCA intensity was four-fold higher in II:1's platelets than in a control sample (Figure 3C), and several bands were only present in patient II:1 (at around 100 kDa, 70-72 kDa, and 56-58 kDa). Interestingly, treatment with neuraminidase increased the RCA intensity in control experiments but not in experiments with patient II:1's platelets – indicating that the latter are already markedly hyposialylated. Taken as a whole, our results suggest that *SLC35A1* has a major role in platelet sialylation.

Given that the sialic acid content and β -galactose exposure at the platelet surface are highly relevant for platelet clearance and platelet life span, we next measured the clearance of patient II:1's hyposialylated platelets in mice. Platelet survival was evaluated *in vivo* after the injection of washed platelets into the circulation of non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD SCID) gamma mice. As shown in Figure 3D, $46 \pm 15\%$ of the control platelets were detected in the circulation 90 minutes after platelet injection. In contrast, II:1's platelets were virtually undetectable – strongly suggesting that the patient's platelets had a very short life span. Given that the circulating platelet count results from the balance between platelet clearance and platelet production, we next looked at whether a mutation in *SLC35A1* disturbed *in vitro* proplatelet formation in cultured human megakaryocytes (MKs). Peripheral blood CD34⁺ cells from the controls and patient II:1 were differentiated *in vitro* in the presence of TPO. We did not observe defective proplatelet formation in the patient's MKs, which contained normal-sized coiled elements (i.e., future platelets) (Figure 3E). These results suggest that *SLC35A1*-dependent sialic acid transport in MKs is not involved in platelet formation. Macrothrombocytopenia has already been reported in two patients with (respectively) a p.Gln101His mutation¹⁰ and a homozygous G>A substitution in the donor splice site of intron 6 in the *SLC35A1* gene.¹¹ Furthermore, mutations in the gene coding for glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) (Figure 1) – an enzyme involved in the CMP-SA pathway – has been linked to macrothrombocytopenia.^{12,13} However, platelet sialylation and life span were not investigated, and a link between thrombocytopenia and defect in platelet sialylation was not highlighted. Herein, we demonstrated that a severe defect in the sialylation pathway resulted in (i) the hyposialylation of platelet glycoproteins, and (ii) a severely shortened platelet half-life. Furthermore, our results suggest that *SLC35A1*-regulated sialic acid transfer is not involved in proplatelet formation in MKs or that it is compensated for by another pathway. The presence of giant platelets in patient II:1 was probably not directly due to *SLC35A1* dysfunction in MKs. The giant platelets might correspond to a compensatory mechanism in a context of thrombocytopenia, as suggested by elevated reticulated platelet levels and a high MK count in the bone marrow.

A better understanding of the mechanism of thrombocytopenia will have consequences for patient care. Indeed, patients with unexplained macrothrombocytopenia are often misdiagnosed with ITP (an exclusion diagnosis). Even though patient II:1 may have experienced

ITP in childhood, hyposialylation was responsible for her basal thrombocytopenia. This knowledge will influence the chosen treatment. Given that thrombocytopenia is associated with a shorter life span for hyposialylated platelets, one can legitimately expect the transfusion of normal platelets to be clinically effective. This was confirmed by Willig *et al.* report on platelet transfusion.¹⁴

Overall, our results demonstrated that sialic acid transport by *SLC35A1* is required for platelet life span and sialic acid content in humans. A limitation in our study resides in the fact that due to lack of parental consent for additional blood sampling, megakaryocytes and *in vivo* platelet clearance experiments could only be performed once. The present case report establishes a link between progress in understanding platelet physiology on one hand and patient care on the other.

Alexandre Kauskot,¹ Tiffany Pascreau,^{1,2} Frédéric Adam,¹ Arnaud Bruneel,³ Christelle Reperant,⁴ Marc-Damien Lourenco-Rodrigues,¹ Jean-Philippe Rosa,⁴ Rachel Petermann,⁴ Hélène Maurey,⁵ Claire Auditeau,⁶ Dominique Lasne,^{1,2} Cécile V. Denis,¹ Marijke Bryckaert,¹ Pascale de Lonlay,⁷ Cécile Lavenu-Bombled,^{1,6} Judith Mellet⁸ and Delphine Borgel^{1,2}

¹HITh, UMR_S 1176, INSERM Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre cedex; ²AP-HP, Department of Biological Hematology, Hôpital Necker, Paris; ³AP-HP, Biochemistry, Bichat University Hospital, Paris; INSERM UMR-1193, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry; ⁴INTS, Platelet Immunology Department, Paris; ⁵AP-HP, Department of Paediatric Neurology, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre; ⁶AP-HP, Department of Biological Hematology, CHU Bicêtre, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre; ⁷AP-HP, Reference Center of Inherited Metabolic Diseases, Hôpital Necker, Université Paris Descartes and ⁸INSERM UMR-1169, University Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

Acknowledgments: the authors wish to thank the patients who participated in this study.

Funding: this study was funded by grants from the INSERM, Force Hémato/Groupe GFHT (to AK), the Agence de Biomedecine (2014) (to JM), EURO-CDG2 and metabERN, and ANR-15RAR3-0004-06 within the framework of E-RARE-3 (to Pd L. and DB).

Correspondence: alexandre.kauskot@inserm.fr
doi:10.3324/haematol.2018.198028

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Hoffmeister KM. The role of lectins and glycans in platelet clearance. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:35-43.
- Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med.* 2015;21(1):47-54.
- Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem.* 1989;264(30):17615-17618.
- Sorensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, et al. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood.* 2009;114(8):1645-1654.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-249.
- Chan KF, Zhang P, Song Z. Identification of essential amino acid residues in the hydrophilic loop regions of the CMP-sialic acid transporter and UDP-galactose transporter. *Glycobiology.* 2010;20(6):689-701.
- Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(9):825-826.
- Li J, van der Wal DE, Zhu G, et al. Desialylation is a mechanism of

- Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun.* 2015;6:7737.
9. Deng W, Xu Y, Chen W, et al. Platelet clearance via shear-induced unfolding of a membrane mechanoreceptor. *Nat Commun.* 2016; 7:12863.
 10. Mohamed M, Ashikov A, Guillard M, et al. Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP--sialic acid transport. *Neurology.* 2013;81(7):681-687.
 11. Martinez-Duncker I, Dupre T, Piller V, et al. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood.* 2005;105(7):2671-2676.
 12. Futterer J, Dalby A, Lowe GC, et al. Mutation in GNE is associated with a severe form of congenital thrombocytopenia. *Blood.* 2018 June 25. [Epub ahead of print]
 13. Manchev VT, Hilpert M, Berrou E, et al. A new form of macrothrombocytopenia induced by a germ-line mutation in the PRKACG gene. *Blood.* 2014;124(16):2554-2563.
 14. Willig TB, Breton-Gorius J, Elbim C, et al. Macrothrombocytopenia with abnormal demarcation membranes in megakaryocytes and neutropenia with a complete lack of sialyl-Lewis-X antigen in leukocytes--a new syndrome? *Blood.* 2001;97(3):826-828.
 15. 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(1-2):64-66.

Annexe IV: Article “Long-term follow-up in PMM2-CDG: are we ready to start treatment trials?”

Long-term follow-up in PMM2-CDG: are we ready to start treatment trials?

Peter Witters, MD, PhD^{1,2}, Tomas Honzik, MD, PhD³, Eric Bauchart, PhD⁴, Ruqaiyah Altassan, MD^{5,6,7}, Tiffany Pascreau, PharmD^{8,9}, Arnaud Bruneel, PharmD, PhD^{10,11}, Sandrine Vuillaumier, PharmD, PhD¹⁰, Nathalie Seta, PhD^{10,12}, Delphine Borgel, PharmD, PhD^{8,9}, Gert Matthijs, PhD¹³, Jaak Jaeken, MD, PhD^{1,2}, Wouter Meersseman, MD, PhD^{14,15}, David Cassiman, MD, PhD¹⁶, Lonlay Pascale de, MD, PhD⁴ and Eva Morava, MD, PhD^{1,17}

Purpose: PMM2-CDG is the most common congenital disorder of glycosylation (CDG), which presents with either a neurologic or multisystem phenotype. Little is known about the longitudinal evolution.

Methods: We performed data analysis on PMM2-CDG patients' clinical features according to the Nijmegen CDG severity score and laboratory data. Seventy-five patients (28 males) were followed up from 11.0 ± 6.91 years for an average of 7.4 ± 4.5 years.

Results: On a group level, there was no significant evolution in overall clinical severity. There was some improvement in mobility and communication, liver and endocrine function, and strabismus and eye movements. Educational achievement and thyroid function worsened in some patients. Overall, the current clinical function, the system-specific involvement, and the current clinical assessment

remained unchanged. On follow-up there was improvement of biochemical variables with (near) normalization of activated partial thromboplastin time (aPTT), factor XI, protein C, antithrombin, thyroid stimulating hormone, and liver transaminases.

Conclusion: PMM2-CDG patients show a spontaneous biochemical improvement and stable clinical course based on the Nijmegen CDG severity score. This information is crucial for the definition of endpoints in clinical trials.

Genetics in Medicine (2019) 21:1181–1188; <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0301-4>

Keywords: PMM2-CDG; CDG severity scale; long-term follow-up; coagulation; liver function test

INTRODUCTION

Congenital disorders of glycosylation (CDG) are a family of diseases. The common denominator is that they all affect the most important posttranslational modification of proteins and lipids: glycosylation.¹ CDG were initially described by Jaak Jaeken and currently comprise a group of some 135 distinct genetic entities.¹ The most abundant type is PMM2-CDG (initially called CDG-1a, or phosphomannomutase 2 deficiency). This subtype affects N-linked protein glycosylation, and leads to either a primarily neurological condition, or to a multisystem disease. So far more than 900 patients have been reported with PMM2-CDG, with varying disease severity. The infantile neurovisceral form is associated with

hepatogastrointestinal disease (failure to thrive, protein losing enteropathy, liver disease), cardiac disease (e.g., pericardial fluid collection, cardiomyopathy), renal disease, and laboratory alterations including abnormal endocrine function and coagulopathy.² PMM2-CDG can be lethal, but if patients reach the age of 3–4 years, CDG follows a more stable course, or may reportedly even improve.³ The neurological type is characterized by psychomotor disability, hypotonia, muscle weakness, cerebellar ataxia, strabismus, retinitis pigmentosa, spasticity, dystonia, and neuropathy.

The most characteristic clinical signs in PMM2-CDG are the abnormal fat distribution on the buttocks (fat pads) and inverted nipples. Screening is usually performed by serum

¹Pediatrics and Metabolic Center, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium; ²Department of Development and Regeneration, Faculty of Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium; ³Department of Pediatrics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic; ⁴AP-HP, Necker University Hospital, French National Reference Centre for Inborn Errors of Metabolism, Paris, France; ⁵Medical Genetic Department, Montréal Children Hospital, McGill University, Montreal, Canada; ⁶Department of Pediatrics, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium; ⁷Department of Medical Genetics, King Faisal Specialist and Research Hospital, Riyadh, Saudi Arabia; ⁸AP-HP, Hôpital Necker, Service d'Hématologie Biologique, Paris, France; ⁹UMR_S1176, INSERM, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ¹⁰Biochemistry Department, AP-HP, Bichat Hospital, Paris, France; ¹¹UMR INSERM 1193, Faculty of Pharmacy, Paris-Sud University, Paris, France; ¹²Biochemistry Department, Paris Descartes University, Bichat Hospital, Paris, France; ¹³Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁴Metabolic Center, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁵Department of General Internal Medicine, Faculty of Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁶Gastroenterology-Hepatology and Metabolic Center, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁷Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA. Correspondence: Peter Witters (peter.witters@uzleuven.be)

Submitted 13 June 2018; accepted: 31 August 2018
Published online: 8 October 2018

sialotransferrin isoelectric focusing/capillary electrophoresis, or by mass spectrometry, which typically display a so-called type 1 pattern (decreased tetrasialo- and increased di- and asialo-transferrin).

Currently, there is no effective treatment for PMM2-CDG. In the past, trials with oral or intravenous mannose did not show any clinical benefit,^{4,5} in spite of the clear biochemical improvement in vitro in patients' fibroblasts.^{4,6} Upcoming clinical trials aim at chaperone therapy, liposomal or chemically camouflaged mannose-1-phosphate supplementation, antisense therapy using morpholino oligonucleotides, or inhibition of connecting pathways, as possible therapeutic approaches.⁷

Little is known about the long-term follow-up of CDG patients. Due to highly variable clinical manifestations and laboratory abnormalities, and even intrapersonal variability of laboratory results, it is not easy to make predictions on the outcome or natural history of an individual patient, or to define relevant endpoints for clinical trials. Quite recently natural history studies were initiated (clinicaltrials.gov identifier NCT03173300) to prepare for upcoming clinical trials.

As there is no formal guideline for follow-up of PMM2-CDG patients, data on patients are collected sporadically, and not well-structured. The purpose of the current study is to describe the long-term follow-up of a large cohort of CDG patients with emphasis on laboratory data and a validated clinical score, the CDG progression score.⁸

MATERIALS AND METHODS

Patient selection

Through the EURO-CDG network, we collected patients from centers with larger PMM2-CDG patient populations. Patients were included from the Reference Center for Inherited Metabolic Disease, AP-HP, Necker-Enfants Malades Hospital, IMAGINE Institute affiliate, University Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Paris, France; the Department of Pediatrics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic; and the Department of Pediatrics and Metabolic Center, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. All patients had genetically confirmed PMM2-CDG.

Retrospective data collection

Current work was approved by the local ethics committee at University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. Data was collected in Excel files on demographic and biometric variables (age, gender, height, weight, head circumference). Information was retrieved on biochemical variables such as coagulation (international normalized ratio [INR], activated partial thromboplastin time (aPTT), factor IX, factor XI, antithrombin, protein C, protein S); hormones (insulin-like growth factor [IGF], IGF binding protein 3 [IGFBP3], thyroid stimulating hormone [TSH], free thyroxine [T4], adrenocorticotrophic hormone [ACTH], cortisol, follicle-stimulating hormone [FSH], luteinizing hormone [LH]), glucose;

cholesterol; high-density lipoprotein; triglycerides; aspartate and alanine transaminases (AST and ALT); creatine kinase; and lactate dehydrogenase.

The clinical characteristics and disease progression score of the patients were documented and followed by the Nijmegen CDG rating scale⁸ (Online supplement 1). Age-appropriate scales were used at different evaluation time points. This score collects information on (1) current function over the last 4 weeks (based on an interview with the patient or caregiver regarding vision, hearing, communication, feeding, mobility); (2) system-specific involvement (history in the last 6 months on seizures, encephalopathy, bleeding diathesis or coagulation defect; and gastrointestinal, endocrine, respiratory, cardiovascular, renal, liver function, and blood anomalies); and (3) current clinical assessment as per clinical examination (growth, development, vision, strabismus, and eye movement; myopathy, ataxia, pyramidal and extrapyramidal symptoms, and neuropathy). Higher scores are associated with worse clinical state.⁸ Treatments with medication like anticoagulation therapy or supplementation with levothyroxine were recorded.

Statistics

SPSS 22 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R version 3.4.3 were used for statistical analysis. All results were expressed as means $\pm$ standard deviation. For differences between repeated measurements in the same individual the Wilcoxon signed rank test was used. Correlations were performed using the Pearson correlation, double sided. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. Graphs were constructed using R.

A sample size of 34 patients was calculated to achieve a power of 80% and a level of significance of 5% (two-sided) for detecting a medium effect size of 0.5 between paired observations (<http://statulator.com>).

Due to the retrospective nature of this study, observations in patients with incomplete data were treated as not available for that specific graph, or descriptive or statistical analysis (pairwise exclusion). Every effort was made to collect a complete data set, including contacting local referring hospitals.

RESULTS

Patient cohort

We collected data on 75 patients with a mean age of 11.02 ± 6.91 years. There were 28 male and 47 female patients, most likely a chance finding as no difference is to be expected. On 61 patients longitudinal follow-up data were available. They were followed up for 7.4 ± 4.5 years. Overall, there were 268 observations (mean of 2.85 observations per patient [range 1–9]). One patient died during the follow-up due to multiorgan failure and invasive aspergillosis at the age of 11.8 years.

There were two patients with homozygous pathogenic variants (L32R/L32R and, T231M/T231M; the remainder of the patients had compound heterozygous pathogenic

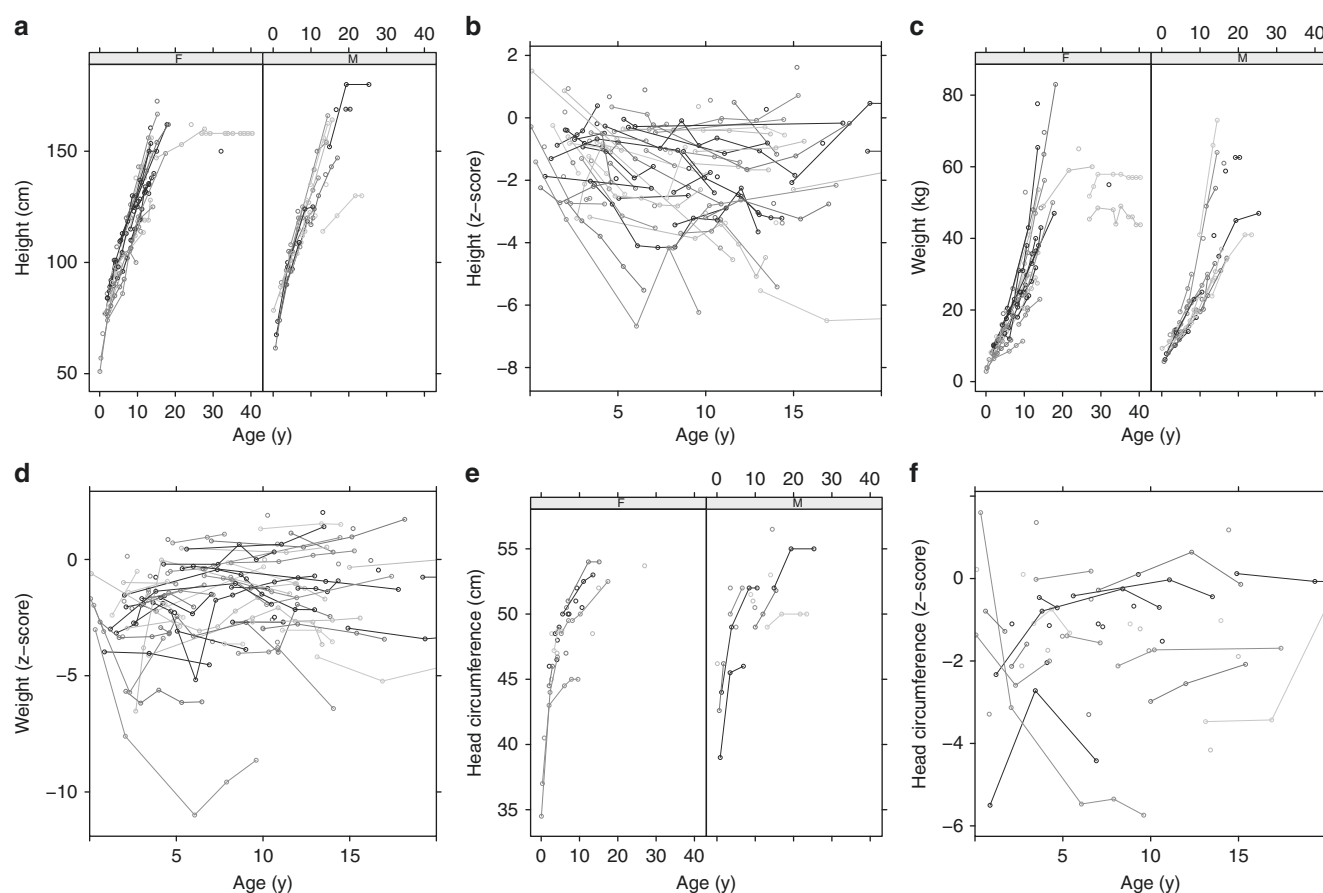


Fig. 1 Biometric charts: growth curves of PMM2-CDG patients. (a) Growth curve (cm for age) by gender. (b) Growth z-score. (c) Weight curve (kg for age) by gender. (d) Weight z-score. (e) Head circumference curve (cm for age) by gender. (f) Head circumference z-score. All data points represent individual measurements. Data collected from the same individual is connected by lines.

variants). The most frequently encountered pathogenic variants were R419H ($n=45$), P113L (14), F119L (10), E139K (9), C241S (7), and T237M (6). The most common compound heterozygous pathogenic variant was P113L/R419H ($n=9$).

Patients who had feeding problems, gastrointestinal comorbidity, bleeding diathesis, coagulation abnormalities, anemia or cytopenia, endocrine abnormalities, respiratory issues, or cardiovascular, liver, renal problems, or growth delay, as evidenced by the Nijmegen CDG severity score, were considered to have a multisystem disease (i.e., neurovisceral form) and not the isolated neurological form of PMM2-CDG. Using this definition there were 68 (90.7%) patients with the neurovisceral form and 7 patients (9.3%) with the isolated neurological form. Moreover, there were 9 additional patients (12%) with the neurovisceral form that at some point during their follow-up had only neurological symptoms. This was due to the appearance ($n=3$), disappearance ($n=4$), or both ($n=2$) of multisystem features such as renal, endocrine, and liver findings; cytopenia, coagulation disorders, or growth issues.

The patients with the neurologic form all had strabismus and global developmental delay (with continued developmental progress in 6/7) and most had ataxia (6/7). A seizure disorder was present in 4/7.

During the follow-up (totaling 449 patient years), there were 11 stroke-like episodes in 5 patients (1 per 70.8 years). Interestingly, there was 1 patient with 5 stroke-like episodes and 2 patients with 2 stroke-like episodes each. All these patients had the neurovisceral type of PMM2-CDG. They had normal prothrombin time, aPTT but decreased levels of factor IX, XI, and antithrombin (AT). Interestingly, 3 of these stroke-like episodes did also occur in adults (ages 21, 21, and 24 years).

There was a clear delay in growth (height z-score -1.21 ± 1.48), weight (weight z-score -1.62 ± 1.71) and head circumference (-1.10 ± 1.58). During follow-up there was no significant improvement in these findings. In fact, there was no catch-up growth but rather a deterioration to -2.02 ± 1.83 , $p < 0.001$ (see Fig. 1). There were no significant biometric differences (expressed as z-scores) between males and females.

Clinical evolution assessed by the CDG severity score

The initial values for the Nijmegen CDG severity score are shown in Table 1. The CDG severity score can be found in the online supplement 1.

Regarding the current clinical function over the preceding 4 weeks (subscore 1, see online supplement 1), the median

Table 1 Distribution of initial scores in %

Current clinical function	0	1	2	3
Vision (<i>n</i> = 68)	47.1	36.8	11.8	4.4
Hearing (<i>n</i> = 71)	88.7	7.0	2.8	1.4
Communication (<i>n</i> = 73)	27.4	32.9	20.5	19.2
Feeding (<i>n</i> = 72)	65.3	25.0	5.6	4.2
Self-care (<i>n</i> = 67)	20.4	26.9	14.9	37.3
Mobility (<i>n</i> = 73)	5.5	11.0	23.3	60.3
Educational achievements (<i>n</i> = 70)	5.7	24.3	32.9	37.1
System-specific involvement	0	1	2	3
Seizures (<i>n</i> = 75)	80.0	17.3	1.3	1.3
Encephalopathy (<i>n</i> = 74)	94.6	1.4	1.4	2.7
Bleeding diathesis or coagulation defects (<i>n</i> = 70)	48.6	49.3	2.9	4.3
Gastrointestinal (<i>n</i> = 73)	69.9	26.0	1.4	2.7
Endocrine (<i>n</i> = 70)	58.6	22.9	18.6	0
Respiratory (<i>n</i> = 72)	100.0	0	0	0
Cardiovascular (<i>n</i> = 74)	89.2	4.1	5.4	1.4
Renal (<i>n</i> = 68)	81.3	9.3	0	0
Liver (<i>n</i> = 72)	58.3	40.3	1.4	0
Blood (<i>n</i> = 70)	82.9	15.7	0	1.4
Current clinical assessment	0	1	2	3
Growth (<i>n</i> = 71)	33.8	54.9	4.2	7.0
Development (<i>n</i> = 68)	1.5	0	3.0	0
Vision (<i>n</i> = 64)	50.0	31.1	14.1	4.7
Strabismus and eye movement (<i>n</i> = 73)	6.8	54.8	37	1.4
Myopathy (<i>n</i> = 68)	85.3	5.9	7.4	1.9
Ataxia (<i>n</i> = 73)	2.7	21.9	35.6	39.7
Pyramidal (<i>n</i> = 65)	81.5	16.9	0	1.5
Extrapyramidal (<i>n</i> = 64)	95.3	4.7	0	0
Neuropathy (<i>n</i> = 70)	44.3	51.4	2.9	1.4

Distribution of the scores according to the Nijmegen CDG severity score. Each item is scored from 0 to 3 according to the current clinical function (based on patient and/or caregiver interview over the preceding 4 weeks), system-specific involvement (based on patient and/or caregiver interview and clinician's knowledge of the patient and clinical notes over the preceding 6 months), and the current clinical assessment (based on the clinical examination at the time of visit). Development is scored from 0 to 6.

A score of 0 indicates age-appropriate findings. The higher the score the more abnormal. For instance for vision the scoring is as follows (0 = Normal: no parental/patient concerns;

1 = Mild: inattention to small objects in visual field or parent concerned about abnormality of visual behavior; 2 = Moderate: visual impairment not fully corrected with glasses or inattention to large objects in visual field; 3 = Severe: not recognizing faces or registered blind or using additional visual aids. The complete scoring detail can be found in the online supplement 1.

patient had mild visual problems (such as inattention to small objects), normal hearing, impaired verbal communication, normal feeding, moderate self-care issues (requiring help with all age-appropriate tasks), severely impaired mobility (being wheelchair/carrier dependent), and moderately severe education achievement issues (attending special school or nursery) (see Table 1). The mean total of all elements of subscore 1 was 8.63 ± 3.99 on a maximum of 21 (a higher score indicates a worse clinical state, *n* = 71). During follow-up the vision, hearing, feeding and self-care showed neither improvement nor deterioration (*p* = NS). (see spaghetti plots in online

supplement 2). There was a decrease in score, indicating clinical improvement, in communication over time (from 1.32 ± 1.08 to 1.26 ± 1.03 , *p* = 0.027, amelioration toward intelligible verbal communication) and mobility (from 2.38 ± 0.89 to 2.28 ± 0.92 , *p* = 0.007, evolution towards mobility, albeit age-inappropriate). Interestingly, three patients evolved from wheelchair dependency to ambulation with only difficulty in climbing stairs or walking uphill. There was an increase in educational score, indicating evolution from attending special school toward not attending school primarily due to illness (from 2.01 ± 0.93 to 2.22 ± 0.81 , *p* = 0.002).

Overall, the current function (subscore 1) did not change over time (8.77 ± 4.22 at the end of follow-up, *p* = 0.45) (see Fig. 2).

Regarding the system-specific involvement over the last 6 months (subscore 2, see online supplement 1) the most often encountered issues were bleeding diathesis or coagulation defects, mainly as laboratory abnormalities, without a need for therapy. Other frequently encountered abnormalities were mild constipation or unexplained vomiting or diarrhea (<1 week) and mildly impaired liver function tests, without evidence of hepatic failure (see Table 1). On follow-up the latter appeared to improve (score evolving from 0.43 ± 0.53 to 0.31 ± 0.5 , *p* = 0.033). All the other findings remained stable, except for a slight deterioration in endocrine score (from 0.60 ± 0.79 to 0.82 ± 0.833 , *p* = 0.033). There were no significant changes in the total subscore 2 over time (from 2.73 ± 2.52 to 3.29 ± 2.89 , *p* = 0.44, NS) (see Fig. 2).

Regarding the current clinical assessment (subscore 3, see online supplement 1) the average patient had a mildly impaired growth (height or weight less than the 2nd centile but growing parallel to it), impaired development (global developmental disability with continued developmental progress), normal or mildly affected vision, intermittent strabismus, ptosis or impaired eye movement at extremities, no clinical neuropathy, moderate ataxia (gait abnormality requiring assistance or severe upper limb dysmetria, no pyramidal or extrapyramidal signs, with mild neuropathy [only areflexia]) (see Table 1). The mean scores were 11.17 ± 3.60 out of a maximum of 31. On follow-up there was slight improvement of the strabismus and eye movements (score from 1.33 ± 0.63 to 1.21 ± 0.71 , *p* = 0.046). All the other items remained stable. Overall there were no significant changes of the subscore over time (at the end of follow-up 11.48 ± 3.70 , *p* = 0.707, NS) (see Fig. 2).

Combination of the different subscores gives a total maximal score of 82. The mean score at the start was 22.27 ± 9.09 . The lowest score was 7, the highest score 50. This score remained surprisingly stable over time (score at the end 23.52 ± 9.44 , *p* = 0.64, NS). There was no evidence for global improvement or significant deterioration in the current cohort.

The maximal scores obtained in our cohort at any time were 16/21 in section I, 9/30 in section II, and 18/31 in section III. There was just one patient who ever scored positive for respiratory involvement. For every element of the score there were patients who scored the minimum (0), demonstrating the variability of disease presentation (see Fig. 2).

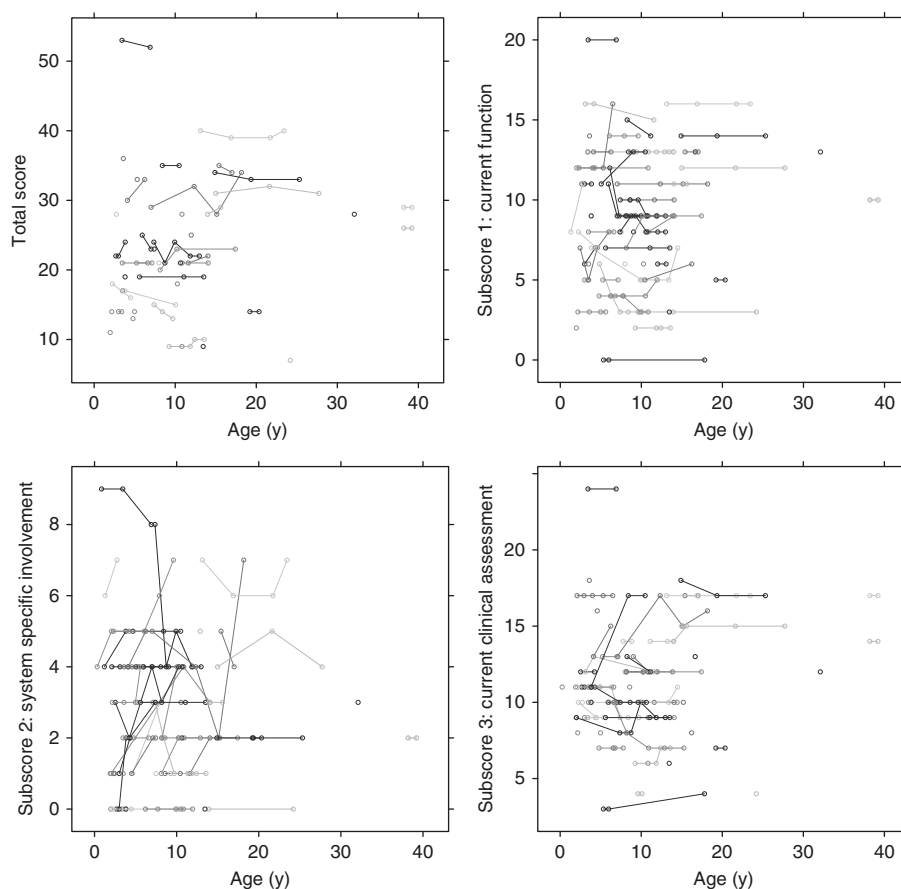


Fig. 2 Congenital disorders of glycosylation (CDG) severity scores. Spaghetti plots of Nijmegen CDG severity score according to age showing the (a) a total score, (b) subscore 1 (current function), (c) subscore 2 (system specific involvement) and (d) subscore 3 (current clinical assessment). Every point represents one observation. Observations in the same patient are connected by lines.

The detailed age-related evolution of individual elements of the score in individual patients can be seen in online supplement 2.

Evolution of biochemical characteristics

The biochemical characteristics of the patients can be found in Table 2.

Coagulation abnormalities were the most striking. Patients had on average, abnormal coagulation studies demonstrated by prolongation of aPTT (38.1 s [normal values: 25.1–36.5 s]), and decreased levels of factor XI (43.5% [70–130%]). Also anticoagulation was disturbed with decreased levels of antithrombin (51.5% [80–130%]) and protein C (59.7% [60–150%]). On follow-up there was a normalization of the aPTT (34.4 s) and protein C (67.1%) in most patients. Factor XI also improved significantly (55.6%) and there was a trend toward improvement of antithrombin (59.6%).

Liver tests (AST and ALT) also improved significantly over time. In infancy/childhood, transaminases were frequently elevated several-fold (AST 84.9 IU/L [<37 IU/L], ALT 98/78 IU/L [<40 IU/L]). However, on follow-up they nearly normalized (see Fig. 3). Creatine kinase was only intermittently elevated. Cholesterol (total and high-density lipoprotein [HDL]) and triglycerides were usually (low)-normal.

Cholesterol significantly increased over time but remained in the normal range. Hypoglycemia was surprisingly common in some patients, mostly in prepubertal age (13 patients, 17%). However, at the group level, glycemia was not significantly low. Missing data for lactate dehydrogenase (LDH), copper, and ceruloplasmin precluded comprehensive analysis.

TSH was often elevated in childhood (13 patients, 17%). However, on follow-up this significantly improved in 4 patients (1 treated, 3 untreated by elthyroxine). T4 levels were mostly normal. Fifteen patients were on T4 supplements at some stage during follow-up. In 6 patients this was started at the age of 1, 1, 1, 13, 15, and 15 years. In only two patients, supplements were stopped at the age of 14 and 20 years old.

IGF shows an age-related increase as can be expected. Due to paucity of data we cannot comment on IGFBP3 levels and ACTH. LH and FSH showed puberty-related changes.

The spaghetti plots on the individual patients for all the above-mentioned variable can be found in online supplement 3.

Correlations between clinical data and biochemistry

There was a significant correlation between the CDG severity score (total score) and numerous coagulation variables such as factor XI ($R = -0.581$, $p < 0.001$, $n = 48$), antithrombin

Table 2 Biochemical measurements at the initial inclusion and at the end of follow-up

Variable (nl values)	Inclusion (mean $\pm$ stdev. [n])	End of follow-up (mean $\pm$ stdev. [n])	p value
INR (0.8–1.2)	1.07 $\pm$ 0.90 (37)	1.05 $\pm$ 0.09 (40)	0.538
aPTT (25.1–36.5 s)	38.09 $\pm$ 27.40 (50)	34.39 $\pm$ 8.31 (44)	^a 0.013
Factor IX (70–130%)	72.05 $\pm$ 1.00 (37)	82.84 $\pm$ 23.11 (40)	0.153
Factor XI (70–130%)	43.45 $\pm$ 1.00 (39)	55.63 $\pm$ 32.50 (42)	^a 0.022
Antithrombin III (80–130%)	51.52 $\pm$ 1.00 (46)	59.47 $\pm$ 26.50 (43)	0.053
Protein C (60–150%)	59.65 $\pm$ 1.00 (45)	67.07 $\pm$ 25.26 (45)	^a 0.037
Protein S (60–150%)	71.62 $\pm$ 30.00 (42)	71.95 $\pm$ 19.66 (40)	0.549
AST (<37 IU/L)	84.78 $\pm$ 12.00 (52)	39.15 $\pm$ 19.09 (46)	^a <0.001
ALT (<40 IU/L)	98.78 $\pm$ 5.88 (50)	40.57 $\pm$ 30.27 (46)	^a <0.001
Creatinine kinase (<180 IU/L)	130.75 $\pm$ 19.00 (27)	122.10 $\pm$ 60.96 (29)	0.224
Triglycerides (<1.69 μ M)	0.76 $\pm$ 0.25 (33)	0.71 $\pm$ 0.44 (36)	0.936
Total cholesterol (<4.92 μ M)	3.31 $\pm$ 1.19 (40)	3.46 $\pm$ 0.71 (38)	^a 0.005
HDL cholesterol (>1.16 μ M)	1.43 $\pm$ 0.64 (11)	1.55 $\pm$ 0.37 (16)	0.446
Glucose (3.9–6.1 μ M)	4.56 $\pm$ 1.00 (40)	4.71 $\pm$ 1.03 (36)	0.116
TSH (0.27–4.20 mIU/L)	2.70 $\pm$ 0.02 (54)	2.32 $\pm$ 1.29 (41)	^a 0.003
T4 (5.1–14.1 μ g/dL)	12.46 $\pm$ 1.00 (53)	12.70 $\pm$ 3.13 (41)	0.550
IGF1 (age-dependent, μ g/L)	166.80 $\pm$ 7.00 (24)	173.99 $\pm$ 104.45 (25)	0.088
ACTH (10–60 ng/L)	24.26 $\pm$ 10.80 (8)	33.06 $\pm$ 26.67 (5)	0.593
Cortisol (2.8–496 mM)	163.57 $\pm$ 2.00 (28)	174.84 $\pm$ 133.48 (21)	0.148
LH (2.4–95/6 IU/L)	12.15 $\pm$ 0.00 (19)	22.66 $\pm$ 13.86 (19)	0.182
FSH (1.2–134.8 IU/L)	46.04 $\pm$ 1.10 (19)	81.19 $\pm$ 42.90 (20)	0.064

Bold type indicates a mean outside the normal range, ^astatistically significant.

ACTH adrenocorticotrophic hormone, ALT alanine transaminase, aPTT activated partial thromboplastin time, AST aspartate transaminase, FSH follicle-stimulating hormone, HDL high-density lipoprotein, IGF insulin-like growth factor, INR international normalized ratio, LH luteinizing hormone TSH thyroid stimulating hormone.

($R = -0.516$, $p < 0.001$, $n = 55$), protein C ($R = -0.478$, $p < 0.001$, $n = 55$). No other significant correlations were found.

DISCUSSION

Information on the natural history of PMM2-CDG is virtually absent from the literature. With the exception of case reports or small series, this is the first article documenting clinical follow-up in a standardized fashion by using the validated Nijmegen CDG severity score, which has low interobserver variability.⁸

We showed that over a period of more than 7 years, there is indeed very little change in the clinical condition. There is no real progression or improvement of the disease as a whole. However, there are improvements in communication, mobility, liver disease, strabismus, or eye movements while other disease aspects deteriorate such as educational achievements and endocrine abnormalities. These findings balance out so that the total CDG severity score and even the three subscores (i.e., the current function, system specific involvement, and current clinical assessment) remain unchanged over time.

This stable clinical state can only be interrupted by stroke-like episodes. These were described in 7% of patients. However, even after suffering a stroke-like episode, there were no significant changes in CDG severity score. In contradiction to previous publications, there were also adult patients suffering from these stroke-like episodes (oldest at 24 years in current series). Mortality in PMM2-CDG has been described in the multisystem (neurovisceral) form and occurs mainly before the age of 4 years.³ In our mainly older cohort, there was only one demise on follow-up, due to multiorgan failure. This indicates a favorable vital prognosis.

Regarding the biochemistry, we do see several variables improving over time. To our knowledge, there has been only one very small follow-up study on biochemical values in 25 patients.² In our cohort, we see the most striking changes in serum transaminases and coagulation/anticoagulation abnormalities.

With regard to liver involvement, hepatomegaly is the most frequent clinical finding.⁹ Biochemically, this has been associated with elevated transaminases in a high proportion of patients (12.5–100%) (refs. ^{2,10–13}) more often than in the neurological form.² Usually, the transaminases become more elevated during viral infections. In our series, there was a several-fold elevation of transaminases that normalized mainly before the 2nd decade. This is consistent with the findings reported in a smaller cohort.² Liver ultrasound can demonstrate steatosis.^{14–16} Liver biopsies have rarely been performed. They mostly show liver steatosis^{17–19} and lysosomal inclusions in the hepatocytes.²⁰ The mechanism for the development of liver steatosis remains unknown.

Coagulation disorders and thrombosis are real concerns in PMM2-CDG. These might require specific measures in case

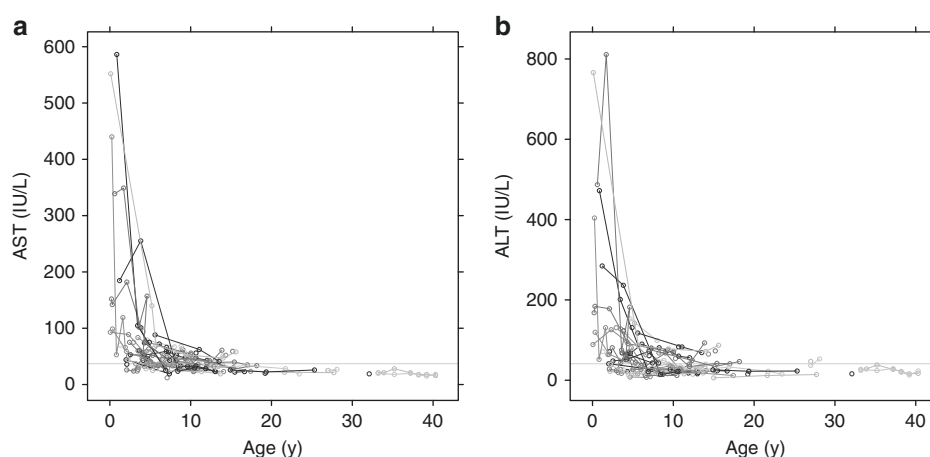


Fig. 3 Spaghetti plots of liver tests. (a) Aspartate transaminase (AST) and (b) alanine transaminase (ALT). Every point represents one observation. Observations in the same patient are connected by lines. The gray line represents the upper limit of normal.

of surgery (plasma transfusion for coagulation disorders) or when recovering from surgery (early mobilization and adequate hydration to minimize risk for deep venous thrombosis or abnormal clotting). Coagulation abnormalities have been described in 344 PMM2-CDG patients so far. Both procoagulant and anticoagulant factors are affected. Antithrombin deficiency was the most reported (160 patients) followed closely by factor XI and protein C deficiency (128 and 123 patients respectively). Protein S and factor IX can also be decreased (40 and 17 patients respectively). We show for the first time that there is a gradual normalization of aPTT, protein C, and a clear improvement in antithrombin levels, and confirm the previously reported improvement in factor XI.² This implies that the risk in adults could be less than expected, however, parents and caregivers should be educated on symptoms of thrombosis so they can be treated quickly and appropriately. Careful follow-up of coagulation and laboratory variables over several years is hence informative.

Failure to thrive in the first year of life is a commonly reported feature (141 individuals with PMM2-CDG). It is mostly associated with other extraneurological symptoms.^{2,10,15,16,18,19} In our series, there are decreased mean z-scores for weight, height, and head circumference. Surprisingly, there is no catch-up growth as is normally seen. It is unclear whether this is a primary problem, or due to insufficient caloric intake. Maybe aggressive nutritional support early in life (circumventing issues with hypotonia and oral muscle dysfunction) could make a difference.

In the clinical follow-up of PMM2-CDG patients with the neurological type, one has to remain vigilant for the appearance of other multisystemic features. We have shown that 12% (9/75) can evolve over time from a neurological form to the multisystem form or vice versa. Most like these are not clearly delineated entities. Because of this overlap, PMM2-CDG could present a clinical spectrum from asymptomatic over isolated neurological involvement to hydrops fetalis.²¹

Overall our study adds two new insights in PMM2-CDG. First, clinicians making a new diagnosis of PMM2-CDG, or following up patients with PMM2-CDG, can counsel the parents that a stable clinical state can be expected in the age range we studied (1 month to 40 years). They can also be reassured that a lot of the biochemical abnormalities, more specifically the coagulation and liver tests, will ameliorate if current findings can be replicated in a prospective natural history study.

Second, for the upcoming therapy trials in PMM2-CDG, it is paramount to take into account the clinical condition of patients, because on follow-up we see a spontaneous improvement of biochemical variables. Therefore, future nutritional therapeutic trials will ideally be double blind randomized controlled trials.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41436-018-0301-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

ACKNOWLEDGEMENTS

P.W. is supported by the clinical research fund, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. E.M. and D.C. are recipients of the clinical investigatorship, FWO Flanders, Belgium. T.H. is supported by the Ministry of Health of the Czech Republic: MZ AZV 16-31932A and the grant RVO-VFN 64165. This work was supported by the European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN) and by a grant from ANR-15RAR3-0004-06 under the frame of ERARE-3, the ERA-Net for Research on Rare Diseases.

DISCLOSURE

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Jaeken J, Peanne R. What is new in CDG? *J Inherit Metab Dis*. 2017;40:569–586.
2. Schiff M, Roda C, Monin ML, et al. Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *J Med Genet*. 2017;54:843–851.
3. Funke S, Gardeitchik T, Kouwenberg D, et al. Perinatal and early infantile symptoms in congenital disorders of glycosylation. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:578–584.
4. Kjaergaard S, Kristiansson B, Stibler H, et al. Failure of short-term mannose therapy of patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Acta Paediatr*. 1998;87:884–888.
5. Mayatepek E, Kohlmuller D. Mannose supplementation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I and phosphomannomutase deficiency. *Eur J Pediatr*. 1998;157:605–606.
6. Panneerselvam K, Freeze HH. Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts. *J Clin Invest*. 1996;97:1478–1487.
7. Brasil S, Pascoal C, Francisco R, et al. CDG Therapies: from bench to bedside. *Int J Mol Sci*. 2018;19.
8. Achouitar S, Mohamed M, Gardeitchik T, et al. Nijmegen paediatric CDG rating scale: a novel tool to assess disease progression. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34:923–927.
9. Marques-da-Silva D, Dos Reis Ferreira V, Monticelli M, et al. Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40:195–207.
10. Kjaergaard S, Schwartz M, Skovby F. Congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia): phenotypic spectrum of the R141H/F119L genotype. *Arch Dis Child*. 2001;85:236–239.
11. Grunewald S, Schollen E, Van Schaftingen E, Jaeken J, Matthijs G. High residual activity of PMM2 in patients' fibroblasts: possible pitfall in the diagnosis of CDG-Ia (phosphomannomutase deficiency). *Am J Hum Genet*. 2001;68:347–354.
12. Arnoux JB, Boddaert N, Valayannopoulos V, et al. Risk assessment of acute vascular events in congenital disorder of glycosylation type Ia. *Mol Genet Metab*. 2008;93:444–449.
13. Monin ML, Mignot C, De Lonlay P, et al. 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:207.
14. Al Teneiji A, Bruun TU, Sidky S, et al. Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. *Mol Genet Metab*. 2017;120:235–242.
15. de Lonlay P, Seta N, Barrot S, et al. A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet*. 2001;38:14–19.
16. Barone R, Sturiale L, Sofia V, et al. Clinical phenotype correlates to glycoprotein phenotype in a sib pair with CDG-Ia. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2103–2108.
17. Enns GM, Steiner RD, Buist N, et al. Clinical and molecular features of congenital disorder of glycosylation in patients with type 1 sialotransferrin pattern and diverse ethnic origins. *J Pediatr*. 2002;141:695–700.
18. Damen G, de Klerk H, Huijman J, den Hollander J, Sinaasappel M. Gastrointestinal and other clinical manifestations in 17 children with congenital disorders of glycosylation type Ia, Ib, and Ic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38:282–287.
19. Perez-Duenas B, Garcia-Cazorla A, Pineda M, et al. Long-term evolution of eight Spanish patients with CDG type Ia: typical and atypical manifestations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2009;13:444–451.
20. Grunewald S, De Vos R, Jaeken J. Abnormal lysosomal inclusions in liver hepatocytes but not in fibroblasts in congenital disorders of glycosylation (CDG). *J Inherit Metab Dis*. 2003;26:49–54.
21. Vuillaumier-Barrot S, Isidor B, Dupre T, Le Bizec C, David A, Seta N. Expanding the spectrum of PMM2-CDG phenotype. *JIMD Rep*. 2012;5:123–125.

Références bibliographiques

1. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 448–462 (2012).
2. Aebi, M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 2430–2437 (2013).
3. Nakayama, Y., Nakamura, N., Tsuji, D., Itoh, K. & Kurosak, A. Genetic Diseases Associated with Protein Glycosylation Disorders in Mammals. in *Genetic Disorders* (ed. Puiu, M.) (InTech, 2013). doi:10.5772/54097.
4. Scott, D. W. & Patel, R. P. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* **23**, 622–633 (2013).
5. Haltiwanger, R. S. & Lowe, J. B. Role of Glycosylation in Development. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 491–537 (2004).
6. Azim, M. & Surani, H. Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos: Compaction and trophoblast adhesion. *Cell* **18**, 217–227 (1979).
7. Kaufman, R. J. *et al.* The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 411–421 (2002).
8. Marek, K. W., Vijay, I. K. & Marth, J. D. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* **9**, 1263–1271 (1999).
9. Ioffe, E. & Stanley, P. Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 728–732 (1994).
10. Lu, Q., Hasty, P. & Shur, B. D. Targeted Mutation in b1,4-Galactosyltransferase Leads to Pituitary Insufficiency and Neonatal Lethality. **11**.
11. Mühlenhoff, M., Eckhardt, M. & Gerardy-Schahn, R. Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 558–564 (1998).
12. Eckhardt, M. *et al.* Mice Deficient in the Polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 Allow Discrimination of the Roles of Neural Cell Adhesion Molecule Protein and Polysialic Acid in Neural Development and Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **20**, 5234–5244 (2000).
13. Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. A. & Marth, J. D. T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 12070–12074 (1995).
14. Lowe, J. B. & Marth, J. D. A Genetic Approach to Mammalian Glycan Function. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 643–691 (2003).
15. Roseman, S. The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. *Chem. Phys. Lipids* **5**, 270–297 (1970).
16. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. & Sandhoff, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1485**, 63–99 (2000).
17. Yamashita, T. *et al.* A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9142–9147 (1999).
18. Coetzee, T. *et al.* Myelination in the Absence of Galactocerebroside and Sulfatide: Normal Structure with Abnormal Function and Regional Instability. *Cell* **86**, 209–219 (1996).
19. Fujimoto, H. *et al.* Requirement of Seminolipid in Spermatogenesis Revealed by UDP-galactose:Ceramide Galactosyltransferase-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 22623–22626 (2000).
20. Takamiya, K. *et al.* Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10662–10667 (1996).
21. Sheikh, K. A. *et al.* Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 7532–7537 (1999).
22. Jaeken, J. *et al.* Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new

syndrome? *Pediatr. Res.* 179 (1980).

23. Jaeken, J. *et al.* Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin. Chim. Acta* **144**, 245–247 (1984).
24. Jaeken, J. [A not-previously described hereditary neurological disease with a deficiency of sialic acid, galactose and N-acetylglucosamine of plasma glycoproteins]. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* **51**, 377–406 (1989).
25. Jaeken, J., Stibler, H. & Hagberg, B. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* **375**, 1–71 (1991).
26. Dupré, T., Lavieu, G., Moore, S. & Seta, N. Les anomalies congénitales de glycosylation des N-glycosylprotéines. *médecine/sciences* **20**, 331–338 (2004).
27. Jaeken, J., Hennot, T., Matthijs, G. & Freeze, H. H. CDG nomenclature: Time for a change! *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1792**, 825–826 (2009).
28. Jansen, J. C. *et al.* CCDC115 Deficiency Causes a Disorder of Golgi Homeostasis with Abnormal Protein Glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* **98**, 310–321 (2016).
29. Dulary, E., Potelle, S., Legrand, D. & Foulquier, F. TMEM165 deficiencies in Congenital Disorders of Glycosylation type II (CDG-II): Clues and evidences for roles of the protein in Golgi functions and ion homeostasis. *Tissue Cell* **49**, 150–156 (2017).
30. Houdou, M. *et al.* Involvement of thapsigargin- and cyclopiazonic acid-sensitive pumps in the rescue of TMEM165-associated glycosylation defects by Mn²⁺. *FASEB J.* **33**, 2669–2679 (2019).
31. Jaeken, J. & Péanne, R. What is new in CDG? *J. Inherit. Metab. Dis.* **40**, 569–586 (2017).
32. Péanne, R. *et al.* Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur. J. Med. Genet.* **61**, 643–663 (2018).
33. Schollen, E., Kjaergaard, S., Legius, E., Schwartz, M. & Matthijs, G. Lack of Hardy-Weinberg equilibrium for the most prevalent PMM2 mutation in CDG-Ia (congenital disorders of glycosylation type Ia). *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 367–371 (2000).
34. Vals, M.-A., Pajusalu, S., Kals, M., Mägi, R. & Öunap, K. The Prevalence of PMM2-CDG in Estonia Based on Population Carrier Frequencies and Diagnosed Patients. *JIMD Rep.* **39**, 13–17 (2017).
35. Supraha Goreta, S., Dabelic, S. & Dumic, J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochem. Medica* 156–170 (2012) doi:10.11613/BM.2012.019.
36. Kingma, H., van der Sluijs, F. & Heiner-Fokkema, M. Fast screening of N-glycosylation disorders by sialotransferrin profiling with capillary zone electrophoresis. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **55**, 693–701 (2018).
37. Helander, A., Eriksson, G., Stibler, H. & Jeppsson, J.-O. Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. *Clin. Chem.* **9** (2001).
38. Carchon, H. A. Diagnosis of Congenital Disorders of Glycosylation by Capillary Zone Electrophoresis of Serum Transferrin. *Clin. Chem.* **50**, 101–111 (2004).
39. Sturiale, L. *et al.* Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology* **15**, 1268–1276 (2005).
40. Adamowicz, M. *et al.* Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: Using the clues and avoiding the pitfalls. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 407–407 (2007).
41. Pompach, P. *et al.* Site-specific Glycoforms of Haptoglobin in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1281–1293 (2013).
42. Pompach, P. *et al.* Protein and Site Specificity of Fucosylation in Liver-Secreted Glycoproteins. *J. Proteome Res.* **13**, 5561–5569 (2014).
43. Bortolotti, F., De Paoli, G. & Tagliaro, F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001–2005. *J. Chromatogr. B* **841**, 96–109 (2006).
44. Vermeer, S. *et al.* Cerebellar ataxia and congenital disorder of glycosylation Ia (CDG-Ia) with normal routine CDG screening. *J. Neurol.* **254**, 1356–1358 (2007).
45. Bruneel, A. *et al.* Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation.

ELECTROPHORESIS **39**, 3123–3132 (2018).

46. Grünewald, S., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Jaeken, J. & Matthijs, G. High Residual Activity of PMM2 in Patients' Fibroblasts: Possible Pitfall in the Diagnosis of CDG-Ia (Phosphomannomutase Deficiency). *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 347–354 (2001).
47. Péanne, R. *et al.* Assessing ER and Golgi N-Glycosylation Process Using Metabolic Labeling in Mammalian Cultured Cells. in *Methods in Cell Biology* vol. 118 157–176 (Elsevier, 2013).
48. Kranz, C. *et al.* A mutation in the human MPDU1 gene causes congenital disorder of glycosylation type If (CDG-If). *J. Clin. Invest.* **108**, 1613–1619 (2001).
49. Lefeber, D. J., Morava, E. & Jaeken, J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 849–852 (2011).
50. Guillard, M. *et al.* Plasma N-Glycan Profiling by Mass Spectrometry for Congenital Disorders of Glycosylation Type II. *Clin. Chem.* **57**, 593–602 (2011).
51. Faid, V., Chirat, F., Seta, N., Foulquier, F. & Morelle, W. A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. *PROTEOMICS* **7**, 1800–1813 (2007).
52. Matthijs, G., Schollen, E., Van Schaftingen, E., Cassiman, J.-J. & Jaeken, J. Lack of Homozygotes for the Most Frequent Disease Allele in Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type 1A. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 542–550 (1998).
53. Kjaergaard, S., Skovby, F. & Schwartz, M. Absence of homozygosity for predominant mutations in PMM2 in Danish patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Eur. J. Hum. Genet.* **6**, 331–336 (1998).
54. Pirard, M. *et al.* Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Lett.* **452**, 319–322 (1999).
55. Lécicée, N. *et al.* Should PMM2-deficiency (CDG Ia) be searched in every case of unexplained hydrops fetalis? *Mol. Genet. Metab.* **101**, 253–257 (2010).
56. Makhamreh, M. M., Cottingham, N., Ferreira, C. R., Berger, S. & Al-Kouatly, H. B. Non-Immune Hydrops Fetalis and Congenital Disorders of Glycosylation: A Systematic Literature Review. *J. Inherit. Metab. Dis.* doi:10.1002/jimd.12162.
57. Altassan, R. *et al.* International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 5–28 (2019).
58. Ferreira, C. R. *et al.* Recognizable phenotypes in CDG. *J. Inherit. Metab. Dis.* **41**, 541–553 (2018).
59. de Lonlay, P. *et al.* A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J. Med. Genet.* **38**, 14–19 (2001).
60. Vuillaumier-Barrot, S. *et al.* Expanding the Spectrum of PMM2-CDG Phenotype. in *JIMD Reports - Case and Research Reports, 2012/2* (ed. SSIEM) vol. 5 123–125 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
61. Schiff, M. *et al.* Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature. *J. Med. Genet.* **54**, 843–851 (2017).
62. Grünewald, S. The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1792**, 827–834 (2009).
63. Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G. & Patterson, M. C. Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol.* **11**, 453–466 (2012).
64. Hagberg, B. A., Blennow, G., Kristiansson, B. & Stibler, H. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: Peculiar group of new disorders. *Pediatr. Neurol.* **9**, 255–262 (1993).
65. de Lonlay, P. *et al.* A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J. Med. Genet.* **38**, 14–19 (2001).
66. Iizuka, T. [Pathogenesis and treatment of stroke-like episodes in MELAS]. *Rinsho Shinkeigaku* **48**, 1006–1009 (2008).
67. Shellhaas, R. A., Smith, S. E., O'Tool, E., Licht, D. J. & Ichord, R. N. Mimics of Childhood Stroke: Characteristics of a Prospective Cohort. *PEDIATRICS* **118**, 704–709 (2006).
68. Monin, M.-L. *et al.* 29 French adult patients with PMM2-congenital disorder of glycosylation: outcome

- of the classical pediatric phenotype and depiction of a late-onset phenotype. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, (2014).
69. Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K. & Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* **25**, 155–167 (2011).
 70. Nieswandt, B. & Watson, S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**, 449–461 (2003).
 71. Lazarus, A. H., Song, S. & Crow, A. R. Understanding platelet function through signal transduction. *Transfus. Med. Rev.* **17**, 45–56 (2003).
 72. Ruggeri, Z. M. & Mendolicchio, G. L. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circ. Res.* **100**, 1673–1685 (2007).
 73. Witkowski, M., Landmesser, U. & Rauch, U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc. Med.* **26**, 297–303 (2016).
 74. Mann, K. G., Brummel-Ziedins, K., Orfeo, T. & Butenas, S. Models of blood coagulation. *Blood Cells. Mol. Dis.* **36**, 108–117 (2006).
 75. Dahlback, B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J. Intern. Med.* **257**, 209–223 (2005).
 76. Long, A. T., Kenne, E., Jung, R., Fuchs, T. A. & Renné, T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 427–437 (2016).
 77. Pauer, H.-U. *et al.* Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene—a model for contact phase activation in vivo. *Thromb. Haemost.* **92**, 503–508 (2004).
 78. Maruyama, H., Brooks, M. B., Stablein, A. & Frye, A. Factor XII deficiency is common in domestic cats and associated with two high frequency F12 mutations. *Gene* **706**, 6–12 (2019).
 79. Key, N. S. Epidemiologic and clinical data linking factors XI and XII to thrombosis. *Hematology* **2014**, 66–70 (2014).
 80. Renné, T. *et al.* Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J. Exp. Med.* **202**, 271–281 (2005).
 81. Renné, T., Schmaier, A. H., Nickel, K. F., Blombäck, M. & Maas, C. In vivo roles of factor XII. *Blood* **120**, 4296–4303 (2012).
 82. Kleinschnitz, C. *et al.* Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J. Exp. Med.* **203**, 513–518 (2006).
 83. Kuijpers, M. J. E. *et al.* Factor XII Regulates the Pathological Process of Thrombus Formation on Ruptured Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1674–1680 (2014).
 84. Xu, Y. *et al.* Factor XIIa inhibition by Infestin-4: in vitro mode of action and in vivo antithrombotic benefit. *Thromb. Haemost.* **111**, 694–704 (2014).
 85. Yau, J. W. *et al.* Selective depletion of factor XI or factor XII with antisense oligonucleotides attenuates catheter thrombosis in rabbits. *Blood* **123**, 2102–2107 (2014).
 86. Matafonov, A. *et al.* Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood* **123**, 1739–1746 (2014).
 87. Maroney, S. A., Ellery, P. E. & Mast, A. E. Alternatively spliced isoforms of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Res.* **125**, S52–S56 (2010).
 88. Baugh, R. J., Broze, G. J. & Krishnaswamy, S. Regulation of Extrinsic Pathway Factor Xa Formation by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **273**, 4378–4386 (1998).
 89. van Doorn, P., Rosing, J., Wielders, S. J., Hackeng, T. M. & Castoldi, E. The C-terminus of tissue factor pathway inhibitor- α inhibits factor V activation by protecting the Arg¹⁵⁴⁵ cleavage site. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 140–149 (2017).
 90. Rau, J. C., Beaulieu, L. M., Huntington, J. A. & Church, F. C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis: Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 102–115 (2007).
 91. Perry, D. J. Antithrombin and its inherited deficiencies. *Blood Rev.* **8**, 37–55 (1994).
 92. Dahlbäck, B. & Villoutreix, B. O. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* **579**, 3310–3316 (2005).
 93. Hackeng, T. M., Sere, K. M., Tans, G. & Rosing, J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3106–3111 (2006).

94. Nachman, R. L. & Jaffe, E. A. Subcellular platelet factor VIII antigen and von Willebrand factor. *J. Exp. Med.* **141**, 1101–1113 (1975).
95. Mannucci, P. M. Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2428–2432 (1995).
96. McGrath, R. T., McRae, E., Smith, O. P. & O'Donnell, J. S. Platelet von Willebrand factor - structure, function and biological importance. *Br. J. Haematol.* **148**, 834–843 (2010).
97. Canis, K. *et al.* Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor. *Biochem. J.* **447**, 217–228 (2012).
98. McGrath, R. T. *et al.* Expression of terminal 2-6-linked sialic acid on von Willebrand factor specifically enhances proteolysis by ADAMTS13. *Blood* **115**, 2666–2673 (2010).
99. Samor, B. *et al.* Primary structure of the major O-glycosidically linked carbohydrate unit of human von Willebrand factor. *Glycoconj. J.* **6**, 263–270 (1989).
100. Ward, S., O'Sullivan, J. M. & O'Donnell, J. S. von Willebrand factor sialylation—A critical regulator of biological function. *J. Thromb. Haemost.* (2019) doi:10.1111/jth.14471.
101. Aguila, S. *et al.* Increased galactose expression and enhanced clearance in patients with low von Willebrand factor. *Blood* **133**, 1585–1596 (2019).
102. Williams, S. B., McKeown, L. P., Krutzsch, H., Hansmann, K. & Gralnick, H. R. Purification and characterization of human platelet von Willebrand factor. *Br. J. Haematol.* **88**, 582–591 (1994).
103. McKinnon, T. A. J. *et al.* Specific N-linked glycosylation sites modulate synthesis and secretion of von Willebrand factor. *Blood* **116**, 640–648 (2010).
104. Wagner, D. D. Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J. Cell Biol.* **102**, 1320–1324 (1986).
105. Federici, A. B. *et al.* Adhesive properties of the carbohydrate-modified von Willebrand factor (CHO-vWF). *Blood* **71**, 947–952 (1988).
106. Carew, J. A., Quinn, S. M., Stoddart, J. H. & Lynch, D. C. O-Linked Carbohydrate of Recombinant von Willebrand Factor Influences Ristocetin-induced Binding to Platelet Glycoprotein Ib. 10.
107. Berkowitz, S. D. & Federici, A. B. Sialic acid prevents loss of large von Willebrand factor multimers by protecting against amino-terminal proteolytic cleavage. *Blood* **72**, 1790–1796 (1988).
108. McGrath, R. T. *et al.* Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood* **122**, 4107–4110 (2013).
109. McKinnon, T. A. J., Chion, A. C. K., Millington, A. J., Lane, D. A. & Laffan, M. A. N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood* **111**, 3042–3049 (2008).
110. Nowak, A. A. *et al.* ADAMTS-13 glycans and conformation-dependent activity. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 1155–1166 (2017).
111. Sodetz, M. & McKee, A. Relationship of Sialic Acid to Function and in Vivo Survival of Human Factor VIII von Willebrand Factor Protein. 10.
112. Stoddart, J. H., Andersen, J. & Lynch, D. C. Clearance of Normal and Type 2A von Willebrand Factor in the Rat. 9.
113. Ellies, L. G. *et al.* Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10042–10047 (2002).
114. Lenting, P. J. *et al.* An Experimental Model to Study the *in Vivo* Survival of von Willebrand Factor: BASIC ASPECTS AND APPLICATION TO THE R1205H MUTATION. *J. Biol. Chem.* **279**, 12102–12109 (2004).
115. Grewal, P. K. *et al.* The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat. Med.* **14**, 648–655 (2008).
116. Ward, S. E. *et al.* A novel role for the macrophage galactose-type lectin receptor in mediating von Willebrand factor clearance. *Blood* **131**, 911–916 (2018).
117. Pegon, J. N. *et al.* Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* **97**, 1855–1863 (2012).
118. O'Sullivan, J. M., Ward, S., Lavin, M. & O'Donnell, J. S. von Willebrand factor clearance – biological mechanisms and clinical significance. *Br. J. Haematol.* **183**, 185–195 (2018).
119. Burkhart, J. M. *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* **120**, e73–

e82 (2012).

120. Li, R. & Emsley, J. The Organizing Principle of Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *J. Thromb. Haemost. JTH* **11**, 605–614 (2013).
121. Rao, A. K. & Songdej, N. Parsing the repertoire of GPIb-IX-V disorders. *Blood* **129**, 403–404 (2017).
122. Cai, X., Thinn, A. M. M., Wang, Z., Shan, H. & Zhu, J. The importance of N-glycosylation on β 3 integrin ligand binding and conformational regulation. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
123. Kunicki, T. J., Cheli, Y., Moroi, M. & Furihata, K. The influence of N-linked glycosylation on the function of platelet glycoprotein VI. *Blood* **106**, 2744–2749 (2005).
124. Wang, Y. *et al.* Platelet biogenesis and functions require correct protein O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 16143–16148 (2012).
125. Chang, I. J. *et al.* Factor VIII and vWF deficiency in STT3A-CDG. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 325–332 (2019).
126. Lefrère, B. *et al.* Multifactorial hypercoagulable state associated with a thrombotic phenotype in phosphomannomutase-2 congenital disorder of glycosylation (PMM2-CDG): Case report and brief review of the literature. *Thromb. Res.* **178**, 75–78 (2019).
127. Geet, C. V. *et al.* Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**, 477–492 (2001).
128. de la Morena-Barrio, M. E. *et al.* Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients. *Thromb. Res.* **133**, 412–417 (2014).
129. Kauskot, A. *et al.* A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica* **103**, e613–e617 (2018).
130. Jansen, A. J. G. *et al.* Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIb α metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood* **119**, 1263–1273 (2012).
131. Hoffmeister, K. M. The role of lectins and glycans in platelet clearance. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 35–43 (2011).
132. Shands, J. W. Macrophage factor X activator formation: metabolic requirements for synthesis of components. *Blood* **65**, 169–175 (1985).
133. Paborsky, L. R. *et al.* Purification of recombinant human tissue factor. *Biochemistry* **28**, 8072–8077 (1989).
134. Paborsky, L. R. & Harris, R. J. Post-translational modifications of recombinant human tissue factor. *Thromb. Res.* **60**, 367–376 (1990).
135. Harlos, K. *et al.* Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. **370**, 5 (1994).
136. Krudysz-Amblo, J., Jennings, M. E., Mann, K. G. & Butenas, S. Carbohydrates and Activity of Natural and Recombinant Tissue Factor. *J. Biol. Chem.* **285**, 3371–3382 (2010).
137. Kothari, H., Rao, L. V. M. & Pendurthi, U. R. Glycosylation of tissue factor is not essential for its transport or functions: TF glycosylation. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1511–1520 (2011).
138. Kothari, H., Pendurthi, U. R. & Rao, L. V. M. Tissue factor purified from different cellular sources and non-glycosylated tissue factor show similar procoagulant activity. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 2066–2068 (2013).
139. Wang, H. *et al.* N-glycosylation in the protease domain of trypsin-like serine proteases mediates calnexin-assisted protein folding. *eLife* **7**, (2018).
140. Sutkeviciute, I., Mistiniene, E., Sereikaite, J. & Bumelis, V. A. The influence of different glycosylation patterns on factor VII biological activity. *Biochimie* **91**, 1123–1130 (2009).
141. Bolt, G., Steenstrup, D. & Kristensen, C. All post-translational modifications except propeptide cleavage are required for optimal secretion of coagulation factor VII. *Thromb. Haemost.* **98**, 988–997 (2007).
142. Begbie, M. E. *et al.* An important role for the activation peptide domain in controlling factor IX levels in the blood of haemophilia B mice. *Thromb. Haemost.* **94**, 1138–47 (2005).
143. Blasko, E. *et al.* Hepatocyte clearance and pharmacokinetics of recombinant factor IX glycosylation variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 485–489 (2013).
144. Bolt, G. *et al.* Hyperglycosylation prolongs the circulation of coagulation factor IX. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 2397–2398 (2012).
145. Brooks, A. R. *et al.* Glycoengineered factor IX variants with improved pharmacokinetics and

- subcutaneous efficacy. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1699–1706 (2013).
146. Sinha, U. & Wolf, D. L. Carbohydrate residues modulate the activation of coagulation factor X. *J. Biol. Chem.* **268**, 3048–3051 (1993).
 147. Yang, L., Manithody, C. & Rezaie, A. R. Functional role of O-linked and N-linked glycosylation sites present on the activation peptide of factor X. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1696–1702 (2009).
 148. McVey, J. H. *et al.* Characterisation of blood coagulation factor XIT475I. *Thromb. Haemost.* (2005) doi:10.1160/TH05-01-0051.
 149. Müller, F. & Renné, T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system: *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 516–521 (2008).
 150. De Maat, S., Hofman, Z. L. M. & Maas, C. Hereditary angioedema: the plasma contact system out of control. *J. Thromb. Haemost.* **16**, 1674–1685 (2018).
 151. Dewald, G. & Bork, K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 1286–1289 (2006).
 152. Bork, K., Wulff, K., Hardt, J., Witzke, G. & Lohse, P. Characterization of a partial exon 9/intron 9 deletion in the coagulation factor XII gene (*F12*) detected in two Turkish families with hereditary angioedema and normal C1 inhibitor. *Haemophilia* **20**, e372–e375 (2014).
 153. Kiss, N. *et al.* Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin. Immunol.* **149**, 142–145 (2013).
 154. Björkqvist, J. *et al.* Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *J. Clin. Invest.* **125**, 3132–3146 (2015).
 155. PittmanS, D. D. Post-translational Requirements for Functional Factor V and Factor VI11 Secretion in Mammalian Cells. 9.
 156. Nicolaes, G. A. F., Villoutreix, B. O. & Dahlbäck, B. Partial Glycosylation of Asn ²¹⁸¹ in Human Factor V as a Cause of Molecular and Functional Heterogeneity. Modulation of Glycosylation Efficiency by Mutagenesis of the Consensus Sequence for N-Linked Glycosylation [†]. *Biochemistry* **38**, 13584–13591 (1999).
 157. Kim, S. W. *et al.* Partial Glycosylation at Asparagine-2181 of the Second C-Type Domain of Human Factor V Modulates Assembly of the Prothrombinase Complex [†]. *Biochemistry* **38**, 11448–11454 (1999).
 158. Fernández, J. A., Hackeng, T. M., Kojima, K. & Griffin, J. H. The Carbohydrate Moiety of Factor V Modulates Inactivation by Activated Protein C. *Blood* **89**, 4348–4354 (1997).
 159. Dorner, A. J. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J. Cell Biol.* **105**, 2665–2674 (1987).
 160. Pipe, S. W., Morris, J. A., Shah, J. & Kaufman, R. J. Differential Interaction of Coagulation Factor VIII and Factor V with Protein Chaperones Calnexin and Calreticulin. *J. Biol. Chem.* **273**, 8537–8544 (1998).
 161. Zheng, C. *et al.* Structural Characterization of Carbohydrate Binding by LMAN1 Protein Provides New Insight into the Endoplasmic Reticulum Export of Factors V (FV) and VIII (FVIII). *J. Biol. Chem.* **288**, 20499–20509 (2013).
 162. Iino, M., Foster, D. C. & Kisiel, W. Functional Consequences of Mutations in Ser-52 and Ser-60 in Human Blood Coagulation Factor VII. *Arch. Biochem. Biophys.* **352**, 182–192 (1998).
 163. Wang, H., Wang, L., Li, S., Dong, N. & Wu, Q. N-Glycan-calnexin interactions in human factor VII secretion and deficiency. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **113**, 67–74 (2019).
 164. Brodin, E. *et al.* Regulation of thrombin generation by TFPI in plasma without and with heparin. *Transl. Res.* **153**, 124–131 (2009).
 165. Schröder, M. & Friedl, P. Overexpression of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells results in malformation and decreased secretion of recombinant protein. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 547–559 (1997).
 166. Zettlmeissl, G., Conradt, H. S., Nimtz, M. & Karges, H. E. Characterization of recombinant human antithrombin III synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 21153–21159 (1989).
 167. Ni, H., Blajchman, M. A., Ananthanarayanan, V. S., Smith, I. J. & Sheffield, W. P. Mutation of Any Site of N-Linked Glycosylation Accelerates the In Vivo Clearance of Recombinant Rabbit Antithrombin.

Thromb. Res. **99**, 407–415 (2000).

168. Turk, B., Brieditis, I., Bock, S. C., Olson, S. T. & Björk, I. The oligosaccharide side chain on Asn-135 of alpha-antithrombin, absent in beta-antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change. *Biochemistry* **36**, 6682–6691 (1997).
169. Grinnell, B. W., Walls, J. D. & Gerlitz, B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J. Biol. Chem.* **266**, 9778–9785 (1991).
170. Lu, D., Xie, R. L., Rydzewski, A. & Long, G. L. The effect of N-linked glycosylation on molecular weight, thrombin cleavage, and functional activity of human protein S. *Thromb. Haemost.* **77**, 1156–1163 (1997).
171. Zauner, G. *et al.* Glycoproteomic Analysis of Human Fibrinogen Reveals Novel Regions of O-Glycosylation. *J. Proteome Res.* **11**, 5804–5814 (2012).
172. Adamczyk, B., Struwe, W. B., Ercan, A., Nigrovic, P. A. & Rudd, P. M. Characterization of Fibrinogen Glycosylation and Its Importance for Serum/Plasma N -Glycome Analysis. *J. Proteome Res.* **12**, 444–454 (2013).
173. Nagel, T. *et al.* Fast and facile analysis of glycosylation and phosphorylation of fibrinogen from human plasma-correlation with liver cancer and liver cirrhosis. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 7965–7977 (2018).
174. Richard, E. *et al.* Congenital disorder of glycosylation Ia: New differentially expressed proteins identified by 2-DE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 267–271 (2009).
175. Stibler, H., Holzbach, U., Tengborn, L. & Kristiansson, B. Complex functional and structural coagulation abnormalities in the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* **7**, 118–126 (1996).
176. Schröder, M. & Friedl, P. Overexpression of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells results in malformation and decreased secretion of recombinant protein. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 547–559 (1997).
177. McCoy, A. J., Pei, X. Y., Skinner, R., Abrahams, J.-P. & Carrell, R. W. Structure of β -Antithrombin and the Effect of Glycosylation on Antithrombin's Heparin Affinity and Activity. *J. Mol. Biol.* **326**, 823–833 (2003).
178. Damen, G., de Klerk, H., Huijmans, J., den Hollander, J. & Sinaasappel, M. Gastrointestinal and Other Clinical Manifestations in 17 Children With Congenital Disorders of Glycosylation Type Ia, Ib, and Ic: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **38**, 282–287 (2004).
179. Ishikawa, N., Tajima, G., Ono, H. & Kobayashi, M. Different neuroradiological findings during two stroke-like episodes in a patient with a congenital disorder of glycosylation type Ia. *Brain Dev.* **31**, 240–243 (2009).
180. Babovic-Vuksanovic, D. *et al.* Severe hypoglycemia as a presenting symptom of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Pediatr.* **135**, 7 (1999).
181. Zentilin Boyer, M. *et al.* Hypotrophie et manifestations digestives des désordres congénitaux de la glycosylation. *Arch. Pédiatrie* **10**, 590–595 (2003).
182. de Koning, T. J. *et al.* Congenital hepatic fibrosis in 3 siblings with phosphomannose isomerase deficiency. *Virchows Arch.* **437**, 101–105 (2000).
183. de Lonlay, P. *et al.* Hyperinsulinemic hypoglycemia as a presenting sign in phosphomannose isomerase deficiency: A new manifestation of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose. *J. Pediatr.* **135**, 5 (1999).
184. Helander, A., Jaeken, J., Matthijs, G. & Eggertsen, G. Asymptomatic phosphomannose isomerase deficiency (MPI-CDG) initially mistaken for excessive alcohol consumption. *Clin. Chim. Acta* **431**, 15–18 (2014).
185. Vuillaumier-Barrot, S. Protein losing enteropathy-hepatic fibrosis syndrome in Saguenay-Lac St-Jean, Quebec is a congenital disorder of glycosylation type Ib. *J. Med. Genet.* **39**, 849–851 (2002).
186. Mention, K. *et al.* Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib. *Mol. Genet. Metab.* **93**, 40–43 (2008).
187. Medrano, C. *et al.* Clinical and molecular diagnosis of non-phosphomannomutase 2 N-linked congenital disorders of glycosylation in Spain. *Clin. Genet.* **95**, 615–626 (2019).
188. Zeevaert, R. *et al.* Bone Dysplasia as a Key Feature in Three Patients with a Novel Congenital Disorder

- of Glycosylation (CDG) Type II Due to a Deep Intronic Splice Mutation in TMEM165. *JIMD Rep.* **8**, 145–152 (2012).
189. Linssen, M., Mohamed, M., Wevers, R. A., Lefeber, D. J. & Morava, E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol. Genet. Metab.* **109**, 107–111 (2013).
 190. Linssen, M., Mohamed, M., Wevers, R. A., Lefeber, D. J. & Morava, E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol. Genet. Metab.* **109**, 107–111 (2013).
 191. Nihues, R. *et al.* Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *J. Clin. Invest.* **101**, 1414–1420 (1998).
 192. Pedersen, P. S. & Tygstrup, I. Congenital Hepatic Fibrosis Combined with Protein-Losing Enteropathy and Recurrent Thrombosis. *Acta Paediatr.* **69**, 571–574 (1980).
 193. Tamminga, R. Y. J., Lefeber, D. J., Kamps, W. A. & van Spronsen, F. J. Recurrent thrombo-embolism in a child with a congenital disorder of glycosylation (CDG) type Ib and treatment with mannose. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **25**, 762–768 (2008).
 194. Pelletier, V. A. *et al.* Secretory diarrhea with protein-losing enteropathy, enterocolitis cystica superficialis, intestinal lymphangiectasia, and congenital hepatic fibrosis: a new syndrome. *J. Pediatr.* **107**, 61–65 (1985).
 195. Morava, E. *et al.* ALG6-CDG: a recognizable phenotype with epilepsy, proximal muscle weakness, ataxia and behavioral and limb anomalies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **39**, 713–723 (2016).
 196. Pode-Shakked, B. *et al.* Cerebral and portal vein thrombosis, macrocephaly and atypical absence seizures in Glycosylphosphatidyl inositol deficiency due to a PIGM promoter mutation. *Mol. Genet. Metab.* (2019) doi:10.1016/j.ymgme.2019.08.003.
 197. Morena-Barrio, M. E. de la *et al.* Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 1549–1560 (2016).
 198. de Lonlay, P. & Seta, N. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1792**, 841–843 (2009).
 199. Marques-da-Silva, D. *et al.* Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature. *J. Inherit. Metab. Dis.* **40**, 195–207 (2017).
 200. Izquierdo-Serra, M. *et al.* Stroke-Like Episodes and Cerebellar Syndrome in Phosphomannomutase Deficiency (PMM2-CDG): Evidence for Hypoglycosylation-Driven Channelopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 619 (2018).
 201. Peatfield, R. C. Can Transient Ischaemic Attacks and Classical Migraine Always be Distinguished? *Headache J. Head Face Pain* **27**, 240–243 (1987).
 202. Nozari, A. *et al.* Microemboli May Link Spreading Depression, Migraine Aura, and Patent Foramen Ovale. *Ann. Neurol.* **67**, 221–229 (2010).
 203. Mann, K. G., Brummel, K. & Butenas, S. What is all that thrombin for? *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1504–1514 (2003).
 204. Hemker, H. C., Al Dieri, R., De Smedt, E. & Béguin, S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb. Haemost.* **96**, 553–561 (2006).
 205. Hemker, H. C. *et al.* Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **33**, 4–15 (2003).
 206. Dargaud, Y., Trzeciak, M. C., Bordet, J. C., Ninet, J. & Negrier, C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb. Haemost.* **96**, 562–567 (2006).
 207. Dargaud, Y. & Negrier, C. Thrombin generation testing in haemophilia comprehensive care centres. *Haemophilia* **16**, 223–230 (2010).
 208. ten Cate, H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thromb. Res.* **129**, 367–370 (2012).
 209. Nair, S. C., Dargaud, Y., Chitlur, M. & Srivastava, A. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders: TESTS OF GLOBAL HAEMOSTASIS AND THEIR APPLICATIONS. *Haemophilia* **16**, 85–92 (2010).
 210. Pelkmans, L., Misztal, A., Al Dieri, R., de Laat, B. & Kelchtermans, H. Thrombin generation in the presence of platelets is sensitive to the activation status of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.*

113, 209–211 (2015).

211. Szanto, T., Nummi, V., Jouppila, A., Brinkman, H. J. M. & Lassila, R. Platelets compensate for poor thrombin generation in type 3 von Willebrand disease. *Platelets* 1–9 (2019) doi:10.1080/09537104.2019.1581922.
212. Regnault, V., Hemker, H. C., Wahl, D. & Lecompte, T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography—potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb. Res.* **114**, 539–545 (2004).
213. Gerotziafas, G. *et al.* The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thromb. Haemost.* **107**, 1044–1052 (2012).
214. Gatt, A. *et al.* Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro. *Thromb. Haemost.* **100**, 350–355 (2008).
215. Douxflis, J., Chatelain, C., Chatelain, B., Dogné, J.-M. & Mullier, F. Impact of apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide. *Thromb. Haemost.* **110**, 283–294 (2013).
216. Samama, M. M., Guinet, C., Le Flem, L., Ninin, E. & Debue, J.-M. Measurement of dabigatran and rivaroxaban in primary prevention of venous thromboembolism in 106 patients, who have undergone major orthopedic surgery: an observational study. *J. Thromb. Thrombolysis* **35**, 140–146 (2013).
217. Berezovskaya, G. *et al.* Thrombin generation test for evaluation of antiplatelet treatment in patients with coronary artery disease after percutaneous coronary intervention. *Platelets* **29**, 185–191 (2018).
218. Schols, S. E. M. *et al.* Increased thrombin generation and fibrinogen level after therapeutic plasma transfusion: Relation to bleeding. *Thromb. Haemost.* **99**, 64–70 (2008).
219. Waters, E. K., Sigh, J., Friedrich, U., Hilden, I. & Sørensen, B. B. Concizumab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, induces increased thrombin generation in plasma from haemophilia patients and healthy subjects measured by the thrombin generation assay. *Haemophilia* **23**, 769–776 (2017).
220. Dargaud, Y. *et al.* Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica* **103**, e181–e183 (2018).
221. Tripodi, A. *et al.* Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology* **41**, 553–558 (2005).
222. Tripodi, A. *et al.* Normal thrombin generation in neonates in spite of prolonged conventional coagulation tests. *Haematologica* **93**, 1256–1259 (2008).
223. Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**, 85–94 (2001).
224. Levi, M., de Jonge, E. & van der Poll, T. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: *Crit. Care Med.* **29**, S90–S94 (2001).
225. Petros, S., Kliem, P., Siegemund, T. & Siegemund, R. Thrombin generation in severe sepsis. *Thromb. Res.* **129**, 797–800 (2012).
226. Perrin, J. *et al.* Coagulation phenotypes in septic shock as evaluated by calibrated automated thrombography. *Shock Augusta Ga* **43**, 74–79 (2015).
227. Stenflo, J. A New Vitamin K-dependent protein. *J. Biol. Chem.* **251**, 355–363 (1975).
228. Kisiel, W. Human Plasma Protein C. *J. Clin. Invest.* **64**, 761–769 (1979).
229. Stenflo, J. Structure and Function of Protein C. *Semin. Thromb. Hemost.* **10**, 13 (1984).
230. Foster, D. C., Yoshitake, S. & Davie, E. W. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4673–4677 (1985).
231. Plutzky, J., Hoskins, J. A., Long, G. L. & Crabtree, G. R. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 546–550 (1986).
232. Hansson, K. & Stenflo, J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 2633–2648 (2005).
233. Miletich, J. P. & Broze, G. J. Beta Protein C Is Not Glycosylated at Asn 329. *J. Biol. Chem.* **265**, 11397–11404 (1990).
234. Maruyama, I., Bell, C. E. & Majerus, C. E. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins,

- capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J. Cell Biol.* **101**, 363–371 (1985).
235. Ishii, H. & Majerus, P. W. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J. Clin. Invest.* **76**, 2178–2181 (1985).
 236. Wu, K. K. TM hidden treasure: lectin-like domain. *Blood* **119**, 3 (2012).
 237. Tsiang, M., Lentz, S. R. & Sadler, J. E. Functional domains of membrane-bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/threonine-rich domain are required for cofactor activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 6164–6170 (1992).
 238. Horvat, R. & Palade, G. E. Thrombomodulin and thrombin localization on the vascular endothelium; their internalization and transcytosis by plasmalemmal vesicles. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 299–313 (1993).
 239. Esmon, C. T. Regulation of blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1477**, 349–360 (2000).
 240. López-Sagasetta, J. *et al.* Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity: EPCR inhibits the tissue factor pathway. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1817–1824 (2007).
 241. Ye, X. *et al.* The Endothelial Cell Protein C Receptor (EPCR) Functions as a Primary Receptor for Protein C Activation on Endothelial Cells in Arteries, Veins, and Capillaries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 671–677 (1999).
 242. Mohan Rao, L. V., Esmon, C. T. & Pendurthi, U. R. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* **124**, 1553–1562 (2014).
 243. Nayak, R. C. *et al.* Endothelial cell protein C receptor cellular localization and trafficking: potential functional implications. *Blood* **114**, 1974–1986 (2009).
 244. Xu, J., Qu, D., Esmon, N. L. & Esmon, C. T. Metalloproteolytic Release of Endothelial Cell Protein C Receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 6038–6044 (2000).
 245. Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D. J., Hidari, N. & Esmon, C. T. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J. Clin. Invest.* **100**, 411–418 (1997).
 246. Kurosawa, S., Esmon, C. T. & Stearns-Kurosawa, D. J. The Soluble Endothelial Protein C Receptor Binds to Activated Neutrophils: Involvement of Proteinase-3 and CD11b/CD18. *J. Immunol.* **165**, 4697–4703 (2000).
 247. Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1800–1814 (2005).
 248. Ritchie, E. *et al.* Cytokine upregulation of proteinase-activated- receptors 2 and 4 expression mediated by p38 MAP kinase and inhibitory kappa B kinase b in human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **11** (2007).
 249. McLaughlin, J. N., Patterson, M. M. & Malik, A. B. Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5662–5667 (2007).
 250. Bae, J.-S., Yang, L., Manithody, C. & Rezaie, A. R. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* **110**, 3909–3916 (2007).
 251. Camerer, E., Huang, W. & Coughlin, S. R. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5255–5260 (2000).
 252. Feistritzer, C. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* **105**, 3178–3184 (2005).
 253. Madhusudhan, T. *et al.* Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes. *Blood* **119**, 874–883 (2012).
 254. Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P. & Trejo, J. Clathrin Adaptor AP2 Regulates Thrombin Receptor Constitutive Internalization and Endothelial Cell Resensitization. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3231–3242 (2006).
 255. Luo, W., Wang, Y. & Reiser, G. p24A, a Type I Transmembrane Protein, Controls ARF1-dependent Resensitization of Protease-activated Receptor-2 by Influence on Receptor Trafficking. *J. Biol. Chem.* **282**, 30246–30255 (2007).
 256. Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B. & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br. J.*

- Pharmacol.* **160**, 191–203 (2010).
257. Esmon, C. T. The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation. *J. Biol. Chem.* **264**, 4743–46 (1989).
 258. Fukudome, K. *et al.* Activation Mechanism of Anticoagulant Protein C in Large Blood Vessels Involving the Endothelial Cell Protein C Receptor. *J. Exp. Med.* **187**, 1029–1035 (1998).
 259. Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Mollica, J. S., Ferrell, G. L. & Esmon, C. T. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10212–10216 (1996).
 260. Bouwens, E. A. M., Stavenuiter, F. & Mosnier, L. O. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 242–253 (2013).
 261. Petäjä, J. & Manco-Johnson, M. J. Protein C pathway in infants and children. *Semin. Thromb. Hemost.* **29**, 349–362 (2003).
 262. Goldenberg, N. A. & Manco-Johnson, M. J. Protein C deficiency: PROTEIN C DEFICIENCY. *Haemophilia* **14**, 1214–1221 (2008).
 263. White, B. *et al.* Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor κ B (NF- κ B) and tumour necrosis factor α (TNF- α) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br. J. Haematol.* **110**, 130–134 (2000).
 264. Shu, F. *et al.* Activated protein C suppresses tissue factor expression on U937 cells in the endothelial protein C receptor-dependent manner. *FEBS Lett.* **477**, 208–212 (2000).
 265. Mosnier, L. O., Zlokovic, B. V. & Griffin, J. H. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* **109**, 3161–3172 (2007).
 266. Murakami, K. *et al.* Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood* **87**, 642–647 (1996).
 267. Nick, J. A. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood* **104**, 3878–3885 (2004).
 268. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
 269. Liu, D. *et al.* Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat. Med.* **10**, 1379–1383 (2004).
 270. Cerutti, C. & Ridley, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* **358**, 31–38 (2017).
 271. Mehta, D. & Malik, A. B. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol. Rev.* **86**, 279–367 (2006).
 272. Park-Windhol, C. & D’Amore, P. A. Disorders of Vascular Permeability. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 251–281 (2016).
 273. Lampugnani, M. G., Malinverno, M., Dejana, E. & Rudini, N. Endothelial cell disease: emerging knowledge from cerebral cavernous malformations. *Curr. Opin. Hematol.* **24**, 256–264 (2017).
 274. Singleton, P. A., Dudek, S. M., Chiang, E. T. & Garcia, J. G. N. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P₁ receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and α -actinin. *FASEB J.* **19**, 1646–1656 (2005).
 275. Griffin, J. H., Zlokovic, B. V. & Mosnier, L. O. Activated protein C: biased for translation. *Blood* **125**, 2898–2907 (2015).
 276. Mosnier, L. O., Sinha, R. K., Burnier, L., Bouwens, E. A. & Griffin, J. H. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood* **120**, 5237–5246 (2012).
 277. Griffin, J. H., Zlokovic, B. V. & Mosnier, L. O. Activated protein C: biased for translation. *Blood* **125**, 2898–2907 (2015).
 278. Burnier, L. & Mosnier, L. O. Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood* **122**, 807–816 (2013).
 279. Parkinson, J. F., Vlahos, C. J., Yan, S. C. B. & Bang, N. U. Recombinant human thrombomodulin. Regulation of cofactor activity and anticoagulant function by a glycosaminoglycan side chain. *Biochem. J.* **283**, 151–157 (1992).
 280. Honda, G. *et al.* The Roles Played by the D2 and D3 Domains of Recombinant Human Thrombomodulin in Its Function. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 1030–1036 (1995).

281. Liaw, P. C. Y., Mather, T., Oganessian, N., Ferrell, G. L. & Esmon, C. T. Identification of the Protein C/Activated Protein C Binding Sites on the Endothelial Cell Protein C Receptor: implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class 1-type receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 8364–8370 (2001).
282. Soto, A. G. & Trejo, J. N-Linked Glycosylation of Protease-activated Receptor-1 Second Extracellular Loop: a critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization. *J. Biol. Chem.* **285**, 18781–18793 (2010).
283. Soto, A. G. *et al.* N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3600–E3608 (2015).
284. Áinle, F. N. *et al.* Activated Protein C N-Linked Glycans Modulate Cytoprotective Signaling Function on Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 1323–1330 (2011).
285. Gleeson, E. M. *et al.* Activated protein C b-glycoform promotes enhanced noncanonical PAR1 proteolysis and superior resistance to ischemic injury. **126**, 5 (2015).
286. Bernard, G. R. *et al.* Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 699–709 (2001).
287. Abraham, E. *et al.* Drotrecogin Alfa (Activated) for Adults with Severe Sepsis and a Low Risk of Death. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1332–1341 (2005).
288. Ranieri, V. M. *et al.* Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2055–2064 (2012).
289. Folsom, A. R. *et al.* Prospective Study of Markers of Hemostatic Function With Risk of Ischemic Stroke. *Circulation* **100**, 736–742 (1999).
290. Shibata, M. *et al.* Anti-Inflammatory, Antithrombotic, and Neuroprotective Effects of Activated Protein C in a Murine Model of Focal Ischemic Stroke. *Circulation* **103**, 1799–1805 (2001).
291. Fernández, J. A., Xu, X., Liu, D., Zlokovic, B. V. & Griffin, J. H. Recombinant murine-activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells. Mol. Dis.* **30**, 271–276 (2003).
292. Zlokovic, B. V. *et al.* Functional recovery after embolic stroke in rodents by activated protein C. *Ann. Neurol.* **58**, 474–477 (2005).
293. Uchiba, M. *et al.* Activated Protein C Induces Endothelial Cell Proliferation by Mitogen-Activated Protein Kinase Activation In Vitro and Angiogenesis In Vivo. *Circ. Res.* **95**, 34–41 (2004).
294. Hooper, W. C., Phillips, D. J., Renshaw, M. A., Evatt, B. L. & Benson, J. M. The Up-Regulation of IL-6 and IL-8 in Human Endothelial Cells by Activated Protein C. *J. Immunol.* **161**, 2567–2573 (1998).
295. Hooper, W. C., Phillips, D. J. & Renshaw, M. A. Activated Protein C Induction of MCP-1 in Human Endothelial Cells: A Possible Role for Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase. *Thromb. Res.* **103**, 209–219 (2001).
296. Mosnier, L. O. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* **104**, 1740–1744 (2004).
297. Lyden, P. *et al.* Final Results of the RHAPSODY Trial: A Multi-Center, Phase 2 Trial Using a Continual Reassessment Method to Determine the Safety and Tolerability of 3K3A-APC, A Recombinant Variant of Human Activated Protein C, in Combination with Tissue Plasminogen Activator, Mechanical Thrombectomy or both in Moderate to Severe Acute Ischemic Stroke. *Ann. Neurol.* **85**, 125–136 (2019).
298. de la Morena-Barrio, M. E. *et al.* MPI-CDG with transient hypoglycosylation and antithrombin deficiency. *Haematologica* **104**, e79–e82 (2019).
299. Yang, A. C. *et al.* Congenital disorder of glycosylation due to DPM1 mutations presenting with dystroglycanopathy-type congenital muscular dystrophy. *Mol. Genet. Metab.* **110**, 345–351 (2013).
300. Ng, B. G. *et al.* DPAGT1 Deficiency with Encephalopathy (DPAGT1-CDG): Clinical and Genetic Description of 11 New Patients. *JIMD Rep.* **44**, 85–92 (2018).
301. Keularts, I., Zivelin, A., Seligsohn, U., Hemker, H. C. & Béguin, S. The Role of Factor XI in Thrombin Generation Induced by Low Concentrations of Tissue Factor. *Thromb. Haemost.* **85**, 1060–1065 (2001).
302. Rugeri, L. *et al.* Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk. *Haemophilia* **16**, 771–777 (2010).
303. Pike, G. N., Cumming, A. M., Hay, C. R. M., Bolton-Maggs, P. H. B. & Burthem, J. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI

- deficiency. *Blood* **126**, 397–405 (2015).
304. Koga, Y. *et al.* MELAS and L-arginine therapy: pathophysiology of stroke-like episodes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1201**, 104–110 (2010).
 305. Schurks, M. *et al.* Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **339**, b3914–b3914 (2009).
 306. Tietjen, G. E. & Collins, S. A. Hypercoagulability and Migraine. *Headache J. Head Face Pain* **58**, 173–183 (2018).
 307. Horvath, B. *et al.* Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. *Exp. Clin. Cardiol.* **9**, 31–34 (2004).
 308. Vischer, U. M. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 1186–1193 (2006).
 309. Rusu, L. & Minshall, R. D. Endothelial Cell von Willebrand Factor Secretion in Health and Cardiovascular Disease. in *Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges* (ed. Lenasi, H.) (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.74029.
 310. Pawlak, K., Myśliwiec, M. & Pawlak, D. Kynurenine pathway – a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv. Med. Sci.* **55**, 196–203 (2010).
 311. Taylan, A. *et al.* Evaluation of various endothelial biomarkers in ankylosing spondylitis. *Clin. Rheumatol.* **31**, 23–28 (2012).
 312. Dharmasaroja, P., Dharmasaroja, P. A. & Sobhon, P. Increased Plasma Soluble Thrombomodulin Levels in Cardioembolic Stroke. *Clin. Appl. Thromb.* **18**, 289–293 (2012).
 313. Lin, S.-M. *et al.* Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome, and mortality in patients with sepsis*. *Crit. Care Med.* **36**, 683–689 (2008).
 314. Schneider, A. *et al.* Successful prenatal mannosidase treatment for congenital disorder of glycosylation-Ia in mice. *Nat. Med.* **18**, 71–73 (2012).
 315. Thiel, C., Lubke, T., Matthijs, G., von Figura, K. & Korner, C. Targeted Disruption of the Mouse Phosphomannomutase 2 Gene Causes Early Embryonic Lethality. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5615–5620 (2006).
 316. Rosenberg, R. D. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. *Am. J. Med.* **87**, S2–S9 (1989).
 317. Tollefsen, D. M. & Pestka, C. A. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. *Blood* **66**, 769–774 (1985).
 318. Wood, J. P., Ellery, P. E. R., Maroney, S. A. & Mast, A. E. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **123**, 2934–2943 (2014).
 319. Moore, K. L., Andreoli, S. P., Esmon, N. L., Esmon, C. T. & Bang, N. U. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* **79**, 124–130 (1987).
 320. Chen, Y. *et al.* CRP regulates the expression and activity of tissue factor as well as tissue factor pathway inhibitor via NF- κ B and ERK 1/2 MAPK pathway. *FEBS Lett.* **583**, 2811–2818 (2009).
 321. Isermann, B. *et al.* Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *J. Clin. Invest.* **108**, 11 (2001).
 322. Conway, E. M., Liu, L. & Nowakowski, B. Heat Shock of Vascular Endothelial Cells Induces an Up-regulatory Transcriptional Response of the Thrombomodulin Gene That Is Delayed in Onset and Does Not Attenuate. **8**.
 323. Fu, Q. *et al.* Involvement of Heat Shock Factor 1 in Statin-Induced Transcriptional Upregulation of Endothelial Thrombomodulin. *Circ. Res.* **103**, 369–377 (2008).
 324. Pathak, R. *et al.* IKK β regulates endothelial thrombomodulin in a Klf2-dependent manner. *J. Thromb. Haemost.* **12**, 1533–1544 (2014).
 325. Lopez-Ramirez, M. A. *et al.* Cerebral cavernous malformations form an anticoagulant vascular domain in humans and mice. *Blood* **133**, 193–204 (2019).
 326. Grey, S. T., Cszizmadia, V. & Hancock, W. W. Differential effect of tumor necrosis factor- α on thrombomodulin gene expression by human monocytoid (THP-1) cell versus endothelial cells. *Int. J.*

Hematol. **67**, 53–62 (1998).

327. Nan, B., Lin, P., Lumsden, A. B., Yao, Q. & Chen, C. Effects of TNF- α and curcumin on the expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. *Thromb. Res.* **115**, 417–426 (2005).
328. Séguin, C., Abid, M. R., Spokes, K. C. & Aird, W. C. Thrombin downregulates thrombomodulin expression and activity in primary human endothelial cells. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* **15**, 143–148 (2008).
329. Lin, P.-Y. *et al.* The inhibition in tumor necrosis factor- α -induced attenuation in endothelial thrombomodulin expression by carvedilol is mediated by nuclear factor- κ B and reactive oxygen species. *J. Thromb. Thrombolysis* **29**, 52–59 (2010).
330. Sohn, R. H. Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B. *Blood* **105**, 3910–3917 (2005).
331. Sangwung, P. *et al.* KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight* **2**, (2017).
332. Alluri, H., Wiggins-Dohlvik, K., Davis, M. L., Huang, J. H. & Tharakan, B. Blood–brain barrier dysfunction following traumatic brain injury. *Metab. Brain Dis.* **30**, 1093–1104 (2015).
333. Liu, J., Jin, X., Liu, K. J. & Liu, W. Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Occludin Degradation and Caveolin-1-Mediated Claudin-5 Redistribution Contribute to Blood-Brain Barrier Damage in Early Ischemic Stroke Stage. *J. Neurosci.* **32**, 3044–3057 (2012).
334. Brouns, R., Wauters, A., De Surgeloose, D., Mariën, P. & De Deyn, P. P. Biochemical Markers for Blood-Brain Barrier Dysfunction in Acute Ischemic Stroke Correlate with Evolution and Outcome. *Eur. Neurol.* **65**, 23–31 (2011).
335. Wacker, B. K., Freie, A. B., Perfater, J. L. & Gidday, J. M. Junctional Protein Regulation by Sphingosine Kinase 2 Contributes to Blood–Brain Barrier Protection in Hypoxic Preconditioning-Induced Cerebral Ischemic Tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1014–1023 (2012).
336. Weinl, C. *et al.* Endothelial depletion of murine SRF/MRTF provokes intracerebral hemorrhagic stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9914–9919 (2015).
337. Nakano-Doi, A., Sakuma, R., Matsuyama, T. & Nakagomi, T. Ischemic stroke activates the VE-cadherin promoter and increases VE-cadherin expression in adult mice. *Histol. Histopathol.* **33**, 507–521 (2018).
338. Mauge, L. *et al.* Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential. *Cytotherapy* **16**, 213–224 (2014).
339. Ormiston, M. L. *et al.* Generation and Culture of Blood Outgrowth Endothelial Cells from Human Peripheral Blood. *J. Vis. Exp.* (2015) doi:10.3791/53384.
340. Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A. & Hebbel, R. P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* **105**, 71–77 (2000).

Titre : Étude de l'hémostase et de l'endothélium dans les déficits héréditaires de la glycosylation des protéines (CDG)

Mots clés : hémostase, endothélium, glycosylation, CDG, test de génération de thrombine

Résumé : L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer le rôle des N-glycosylations sur l'hémostase, à la fois sur les protéines de la coagulation et sur l'endothélium. Le rôle des chaînes glycaniques des protéines de l'hémostase a été principalement étudié à l'aide des méthodes de déglycosylation enzymatique et de mutagenèse dirigée. Afin d'étudier le rôle des N-glycannes sur l'hémostase dans un système global, nous nous sommes intéressés aux déficits héréditaires de glycosylation (CDG). Les patients atteints de CDG présentent fréquemment des anomalies de l'hémostase principalement caractérisées par des déficits en facteurs de la coagulation et en inhibiteurs physiologiques. Ces anomalies de l'hémostase s'accompagnent de complications neurologiques aiguës appelées stroke-like (SL) dont le mécanisme physiopathologique n'est pas complètement élucidé. Afin d'évaluer de façon globale l'impact de l'ensemble des anomalies rencontrées chez les patients sur la coagulation nous avons choisi d'utiliser le test de génération de thrombine (TGT) en absence et en présence de thrombomoduline soluble (TMs) de manière à mobiliser le système de la protéine C (PC). Sur notre série de 35 patients atteints de CDG, les déficits en antithrombine et facteur XI sont les plus fréquents (71% et 57% des patients respectivement), suivi des déficits en PC et protéine S (29% et 26% respectivement). Seulement 11% des patients présentent un déficit en FIX. En l'absence de TMs, le TGT révèle un profil hypercoagulant. Après addition de TMs on observe une résistance à la mobilisation du système de la PC, ce qui renforce l'hypercoagulabilité observée sans TMs. Afin d'étudier les propriétés de l'endothélium affecté par un défaut de glycosylation, nous avons également développé un modèle cellulaire inactivé pour PMM2 à partir d'une lignée endothéliale cérébrale hCMEC/D3. L'endothélium est doté de propriétés anticoagulantes en exprimant entre autres les récepteurs impliqués dans l'activation de la PC, la TM et l'*endothelial protein C receptor* (EPCR). Nous avons montré que les cellules inactivées pour PMM2 présentent un défaut d'activation de la PC dû à une diminution des transcrits des gènes codant pour la TM et l'EPCR et donc une diminution de l'expression de la TM et de l'EPCR concourant à une perte du potentiel anticoagulant de l'endothélium. Par ailleurs nous avons mis en évidence une hyperperméabilité de la barrière endothéliale à l'état basal en partie expliquée par la perte d'intégrité des jonctions adhérentes. De plus, nous avons montré que la barrière formée par les cellules inactivées pour PMM2 est plus sensible à un stimulus déstabilisateur comme la thrombine. En revanche les effets cytoprotecteurs de la protéine C activée (PCA) sont conservés. La dysfonction endothéliale ainsi mise en évidence pourrait jouer un rôle dans le développement de l'hyperperméabilité rencontrée dans les épisodes de SL. De plus, malgré l'absence de mise en évidence de thrombus au cours des SL, l'hypothèse de la formation de micro-thrombi et d'ischémie transitoire favorisés par les anomalies de la coagulation observées chez les patients atteints de CDG ne peut être exclue.

Title : Study of hemostasis and endothelium in congenital disorder of glycosylation (CDG)

Keywords : hemostasis, endothelium, glycosylation, CDG, thrombin generation assay

Abstract: The aim of this study was to evaluate the role of N-glycosylations on hemostasis, both on coagulation proteins and on the endothelium. In order to study the role of glycans on hemostasis in a global system, we were interested in congenital disorder of glycosylation (CDG). Patients with CDG have hemostasis abnormalities mainly characterized by deficiencies in coagulation factors and physiological inhibitors. These abnormalities are accompanied by acute neurological complications called stroke-like (SL) whose pathophysiological mechanism is not fully understood. In order to assess the overall impact of all the abnormalities encountered in patients on coagulation, we used the thrombin generation assay (TGA) with or without soluble thrombomodulin (sTM) in order to mobilize the protein C (PC) system. In our series of 35 patients with CDG, antithrombin and factor XI deficits are the most frequent (71% and 57% of patients respectively), followed by PC and protein S deficits (29% and 26% respectively). Only 11% of patients have a FIX deficiency. In the absence of sTM, the TGA revealed an hypercoagulant profile. After addition of sTM, resistance to the mobilization of the PC system was observed, which reinforced the hypercoagulability state observed without sTM. In order to study the properties of endothelium affected by glycosylation defect, we developed a PMM2 knock-down (KD) endothelial model hCMEC/D3. The endothelium has anticoagulant properties by expressing, the receptors involved in PC activation, TM and endothelial protein C receptor (EPCR). We have shown that PMM2 KD cells have a lack of PC activation due to a decrease in transcripts of genes encoding TM and EPCR and thus a decrease in TM and EPCR expression contributing to a loss of endothelium anticoagulant potential. In addition, we have demonstrated a hyperpermeability of the endothelial barrier in the basal state, partly explained by the loss of integrity of the adherens junctions. In addition, we have shown that the barrier formed by PMM2 KD cells is more sensitive to a destabilizing stimulus such as thrombin. On the other hand, the cytoprotective effects of activated protein C (APC) are maintained. The endothelial dysfunction that we have highlighted could play a role in the development of hyperpermeability encountered in SL episodes. In addition, despite the absence of evidence of thrombus during SL, the hypothesis of the formation of microthrombi and transient ischemia favoured by coagulation abnormalities observed in patients with CDG cannot be excluded.

