

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biochimie

par

Michel LOPEZ



CONTRIBUTION A L'ETUDE DU POTENTIEL DE GLYCOSYLATION

DES LIGNEES CELLULAIRES D'INSECTES

soutenue le 29 mai 1997 devant la Commission d'Examen :

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Professeur David H. JOZIASSE

Docteur Rafael ORIOL

Examineurs : Docteur Sharon S. KRAG

Professeur Ph. DELANNOY

Professeur Gérard DEVAUCHELLE

A abuela Nieves et Jean-Gérard

A Hélène

A mes proches

Ce projet a rassemblé la société *PROTEINE PERFORMANCE*, la Station de Pathologie Comparée *INRA / URA* du *CNRS n° 1184* de S^t Christol-les-Alès dirigée par le Professeur Gérard DEVAUCHELLE, et le Laboratoire de Chimie Biologique de l'*Université des Sciences et Technologies de Lille*, *UMR* du *CNRS n°111* dirigé par le Professeur André VERBERT.

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur André VERBERT, qui a accepté de présider le jury de thèse,

Monsieur le Professeur David H. JOZIASSE et Monsieur le Docteur Rafael ORIOL, qui ont bien voulu juger ce mémoire,

Madame le Docteur Sharon S. KRAG et Messieurs les Professeurs Philippe DELANNOY et Gérard DEVAUCHELLE, qui ont accepté d'examiner ce travail.

Cette étude a bénéficié des collaborations de :

Monsieur le Docteur Daniel TETAERT, du Laboratoire de Biologie et Physiopathologie des Cellules Mucipares, *Unité INSERM n° 377* de Lille.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre CARTRON et Monsieur le Docteur Pascal BAILLY, de l'Institut National de la Transfusion Sanguine, *Unité INSERM n° 76* de Paris.

Monsieur le Docteur James LANGRIDGE, de la société *Micromass UK Limited*, Altrincham, Angleterre.

Monsieur le Docteur Pierre SAUTIERE, du Laboratoire de Chimie des Biomolécules, *URA* du *CNRS n° 1309*, Institut Pasteur de Lille.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à faire progresser le projet *Glycosylation et Cellules d'Insectes*.

à Villeneuve d'Ascq,

Monsieur André Verbert, pour avoir initié le projet et m'avoir chaleureusement accueilli au Laboratoire de Chimie Biologique.

Mon directeur de thèse, Monsieur Philippe Delannoy, pour m'avoir intégré au sein de son groupe de recherche, et pour ses conseils judicieux et ses encouragements constants.

Toute la sympathique équipe du O17, Madame Anne Harduin-Lepers, Madame Isabelle Kim, Mademoiselle Marie-Ange Recchi, Messieurs Wim Steelant et Vincent Van Miegem, pour leur soutien et les agréables moments passés en leur compagnie.

Madame Bernadette Coddeville et Madame Annick Pierce, Messieurs Yves Leroy, Yves Plancke, Frédéric Chirat, Guy Ricart, Jérôme Lemoine, Jean-Pierre Decottignies et Gérard Strecker, pour leur grande disponibilité et leur contribution à l'étude structurale des glycannes de lépidoptères.

Messieurs René Cacan, Jean-Claude Michalski, Jean Montreuil et Madame Geneviève Spik, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, et leurs avis enrichissants.

à S^t Christol-les-Alès,

Madame Martine Cerutti et Monsieur Gérard Devauchelle, pour avoir contribué à la mise en place du projet *Glycosylation* et pour l'intérêt constant porté aux travaux menés. Encore merci, pour la participation sans faille et grandissante de votre laboratoire *INRA* après le retrait de *PROTEINE PERFORMANCE*.

Monsieur Michel Kaczorek, pour avoir initié le projet au sein de notre jeune entreprise *PROTEINE PERFORMANCE*.

Messieurs Hassan Chaabihi et Francois-Xavier Deramoudt, pour avoir fait vivre le projet *Glycosylation* au sein de leur équipe respective, génie génétique et culture cellulaire.

Madame Sylvie Juliant et Mademoiselle Maud Gazon pour avoir réalisé l'ensemble des cultures de cellules.

Mademoiselle Catherine Cêtre, Madame Christel Chatelais et Monsieur Laurent Gautier, pour m'avoir fait profiter de leur expérience en biologie moléculaire.

L'ensemble du personnel de *PROTEINE PERFORMANCE*, Caroline Roussel, Carole Tiercelin, Mallory Tiercelin, ...

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
I. LA GLYCOSYLATION CHEZ LES MAMMIFERES	6
A. le rôle biologique des glycannes	6
1. Les glycannes jouent un rôle d'ordre physico-chimique	6
2. Les glycannes modulent la fonction de la glycoprotéine	6
3. La fraction glycanique porte la fonction biologique de la glycoprotéine	7
B. la <i>N</i>-glycosylation	8
1. Les processus de <i>N</i> -glycosylation dans le RER	8
2. Les processus de <i>N</i> -glycosylation dans l'appareil de Golgi	11
3. Hétérogénéité des glycoprotéines naturelles	13
C. la <i>O</i>-glycosylation	15
1. La structure des <i>O</i> -glycannes	15
a) Les noyaux	16
b) Les squelettes	16
c) La périphérie	18
d) La biosynthèse des <i>O</i> -glycannes et son contrôle	19
II. LA PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES	21
A. les différents systèmes de production concurrents du système baculovirus / cellules d'insectes	21
1. Le système procaryote	21
2. Les plantes	23
3. Les levures	24

4. Les cellules de mammifères	25
5. Les animaux transgéniques	26
B. le système baculovirus / cellules d'insectes	26
1. Les insectes et les différentes lignées cellulaires de lépidoptères	26
a) Qu'est-ce qu'un lépidoptère ?	26
b) Comment établir une lignée cellulaire de lépidoptères ?	27
c) Comment cultiver les cellules de lépidoptères ?	30
2. Le cycle naturel du baculovirus	31
3. Application à l'expression de gènes étrangers	33
III. LE POTENTIEL DE GLYCOSYLATION DES SYSTEMES D'EXPRESSION	37
A. les différents systèmes de production concurrents du système « insecte »	37
1. Le système procaryote	37
2. Les plantes	40
3. Les levures	41
4. Les cellules de mammifères	42
B. les cellules de lépidoptères et le système baculovirus / cellules d'insectes	44
1. La <i>N</i> -glycosylation	45
2. La <i>O</i> -glycosylation	48
3. Les tentatives de correction de la glycosylation des insectes	49
IV. SUJET DU PRESENT TRAVAIL	52
A. avant propos	52
B. exposé de la problématique	52

RESULTATS	56
I. LE POTENTIEL DE N-GLYCOSYLATION DE NOS LIGNEES	57
Publication n°1 : <i>Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in Mamestra brassicae cells</i>	59
II. LE POTENTIEL DE O-GLYCOSYLATION DE NOS LIGNEES	104
Publication n°2 : <i>Synthesis potentials of Tn-, T-, and Gala1-4-substituted T-antigens onto endogenous O-glycoproteins in three lepidopteran cell lines</i>	105
<i>Annexe</i>	140
Publication n°3 : <i>Characterization of an UDP-Gal : Galβ1-3GalNAc α1,4-galactosyl-transferase in Mamestra brassicae cell line</i>	144
CONCLUSION	181
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189

INTRODUCTION

Depuis leur synthèse dans la machinerie ribosomale jusqu'à leur localisation finale, les protéines subissent de multiples modifications post-traductionnelles. Parmi celles-ci, la glycosylation offre une grande variété de structures glycaniques due à la diversité des monosaccharides et aux isoméries de liaisons entre les monosaccharides. Bien que l'activité biologique des glycoprotéines soit généralement portée par la partie protéique (fonction enzymatique, hormonale ou de transport), le glycanne contient des informations supplémentaires qui modulent la fonction biologique ou qui déterminent la durée de la vie ou la destinée de la molécule.

Rappelons que l'on distingue deux types de glycosylation en fonction de l'attache covalente du polysaccharide sur la chaîne peptidique : (i) la *N*-glycosylation, quand le glycanne est lié à un résidu asparaginyll et, (ii) la *O*-glycosylation, quand la liaison est réalisée par l'intermédiaire d'un résidu thréonyll ou séryll. Ces deux types de liaisons peuvent se trouver sur une même glycoprotéine. La réaction générale de glycosylation, catalysée par une glycosyltransférase, consiste en un transfert d'un monosaccharide (ou d'un glycanne) sur un accepteur. Cette réaction dépend de la spécificité de chaque glycosyltransférase : un donneur unique, un accepteur souvent très spécifique et une liaison précise.

La recombinaison génétique permet désormais la production à l'identique, par une cellule hôte, de protéines étrangères à celle-ci en introduisant la portion d'ADN codant ces protéines dans le génome de l'hôte. En ce qui concerne les glycannes portés par cette protéine, ils sont fonction du potentiel de glycosylation du système d'expression choisi : bactérie, levure, insecte, mammifère, plante. A l'heure actuelle, il est impossible de maîtriser les processus de glycosylation pour conduire la cellule hôte à reproduire les glycannes naturels via le système de glycosylation propre à la cellule d'origine.

Après avoir rappelé les rôles que peuvent jouer les glycannes d'une glycoprotéine, nous nous intéresserons à la *N*- et à la *O*-glycosylations dans les cellules de mammifères. Enfin,

après une rapide revue des capacités de glycosylation des différentes lignées cellulaires aujourd'hui utilisées pour l'expression de protéines recombinantes, nous porterons notre attention sur les lignées cellulaires d'insectes et, plus particulièrement, sur le système baculovirus / cellules d'insectes.

I. LA GLYCOSYLATION CHEZ LES MAMMIFERES

A. LE ROLE BIOLOGIQUE DES GLYCANNES

(Cumming, 1991; Varki, 1993)

De nombreuses études ont tenté de déterminer les rôles joués par les glycanes au travers de déglycosylations partielles ou totales des glycoprotéines. Les effets de l'altération de la fraction glycanique des glycoprotéines se sont révélés imprévisibles, très variables, et fortement influencés par le contexte biologique où oeuvre la glycoprotéine choisie.

Toutefois, on peut classer les rôles joués par les glycanes d'une glycoprotéine dans trois catégories principales.

1. Les glycanes jouent un rôle d'ordre physico-chimique

Le glycanne contribue à la mise en place de la structure spatiale de la protéine en influençant son repliement. De plus, il joue sur la solubilité de la molécule soit en apportant son caractère hydrophile, soit en induisant une structure spatiale correctement orientée. Enfin, il recouvre la surface de la protéine, jouant ainsi un rôle déterminant dans sa protection contre les attaques protéolitiques ou dans le masquage d'épitopes peptidiques.

2. Les glycanes modulent la fonction de la glycoprotéine

Le deuxième rôle n'est pas directement lié à la fonction biologique de la glycoprotéine mais la module en contrôlant sa demi-vie. Ce sera, par exemple, la clérance hépatique des asialo-

glycoprotéines sanguines par le biais de l'interaction des glycanes, porteurs de résidus de galactose ou de *N*-acétylgalactosamine en position terminale, avec des lectines spécifiques présentes sur la membrane des macrophages, conduisant à l'endocytose des asialo-glycoprotéines. D'autres lectines sont présentes à la surface des macrophages telles que les lectines spécifiques des glycanes riches en résidus de mannose. Le glycanne peut lui-même se révéler être porteur d'épitopes oligosaccharidiques antigéniques tels que le disaccharide Gal α 1-3Gal (Galili *et al.*, 1988).

Le glycanne contrôle aussi le trafic intracellulaire des glycoprotéines en reconnaissant des récepteurs spécifiques. Il les cible vers le lysosome ou contrôle leur vitesse de sécrétion.

3. La fraction glycanique porte la fonction biologique de la glycoprotéine

Le glycanne peut porter lui-même la fonction biologique via l'interaction spécifique avec des biomolécules cibles. Il participe ainsi à l'adhésion inter-cellulaire, à l'organisation tissulaire, et à l'adressage tissulaire de la protéine ou de la cellule qui le porte. Les exemples connus à ce jour, portent sur la reconnaissance cellulaire, illustrée par la domiciliation des lymphocytes, le rôle des sélectines dans les interactions cellulaires et le rôle des protéoglycannes comme modulateurs de l'activité des facteurs de croissance.

Avec en mémoire ces trois types de fonctions, on se rend compte que, d'une protéine à une autre, le glycanne a un rôle plus ou moins crucial et que son activité mesurée *in vitro* ou établie *in vivo* peut être totalement différente. On comprend pourquoi lorsque l'on veut produire une glycoprotéine recombinante d'intérêt thérapeutique, on doit s'évertuer à reproduire strictement ce que la nature a produit.

B. LA *N*-GLYCOSYLATION

(Kornfeld et Kornfeld, 1985)

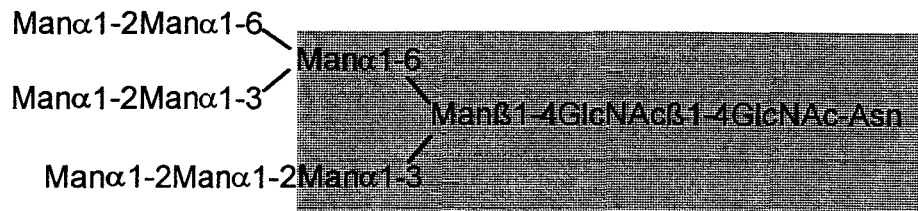
Les *N*-glycannes sont caractérisés par un noyau commun (Figure 1, page 9) : le noyau pentasaccharidique $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, sur lequel se fixent différentes « antennes » qui possèdent à leur extrémité des sucres dits périphériques. On retrouve trois types de *N*-glycannes : le type oligomannosidique, le type hybride et le type *N*-acétyllactosaminique.

Dans les cellules eucaryotes, la voie classique de la *N*-glycosylation des protéines débute dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et se termine dans l'appareil de Golgi (Notre propos sera limité à la voie classique, laissant volontairement de côté les glycosylations cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales.).

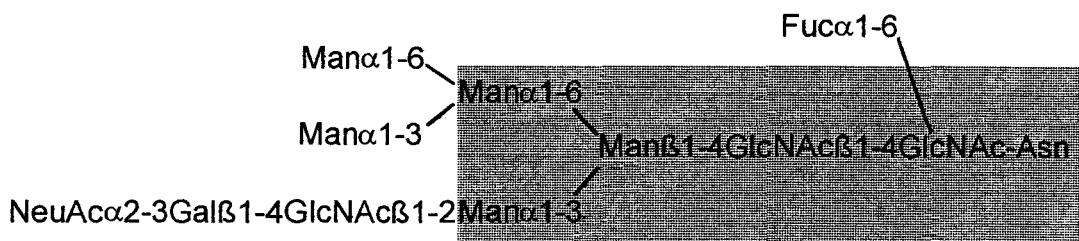
1. Les processus de *N*-glycosylation dans le RER

(Abeijon et Hirschberg, 1992)

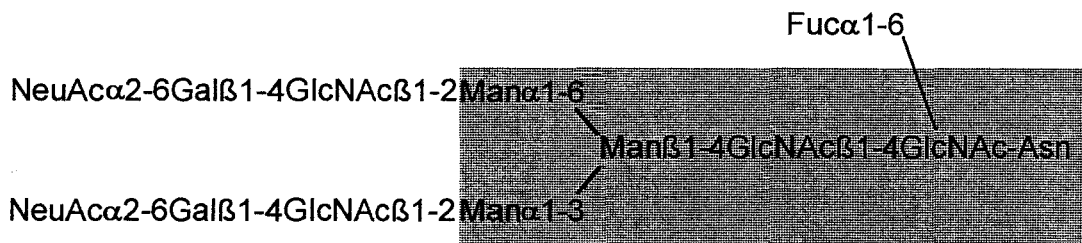
L'étape princeps de la *N*-glycosylation est le transfert *en bloc* d'un tétradéca-saccharide sur un résidu asparaginyll de la protéine naissante. Ce tétradéca-saccharide est pré-assemblé sur un résidu polyisoprénique particulier, le dolichol (Dol), via une liaison pyrophosphate pour former le $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Cet assemblage s'effectue étape par étape dans le RER (Figure 2, page 10). Le $\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ est tout d'abord produit, sur la face cytoplasmique du RER, suivi de l'addition de neuf résidus de mannose, les cinq premiers à partir de GDP-Man sur la face cytoplasmique, les quatre derniers sont ajoutés sur la face luminale après retournement de l'intermédiaire $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ vers la face interne du RER. Le donneur pour les réactions localisées dans la couche lipidique interne est le Man-P-Dol synthétisé face cytoplasmique à partir de GDP-Man. Enfin, c'est par un mécanisme identique que sont additionnés les trois derniers résidus de glucose. L'intermédiaire lipidique ainsi formé $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ a une forte affinité pour l'oligosaccharidyltransférase qui catalyse le transfert *en bloc* de la fraction glycannique sur la protéine.



Type Oligomannosidique



Type Hybride



Type N-acétyllactosaminique

Figure 1 : Les trois principaux types de structures glycaniques retrouvées sur les *N*-glycoprotéines.

Le noyau pentasaccharidique commun à toutes les structures *N*-glycanniques est indiqué par un cadre gris.

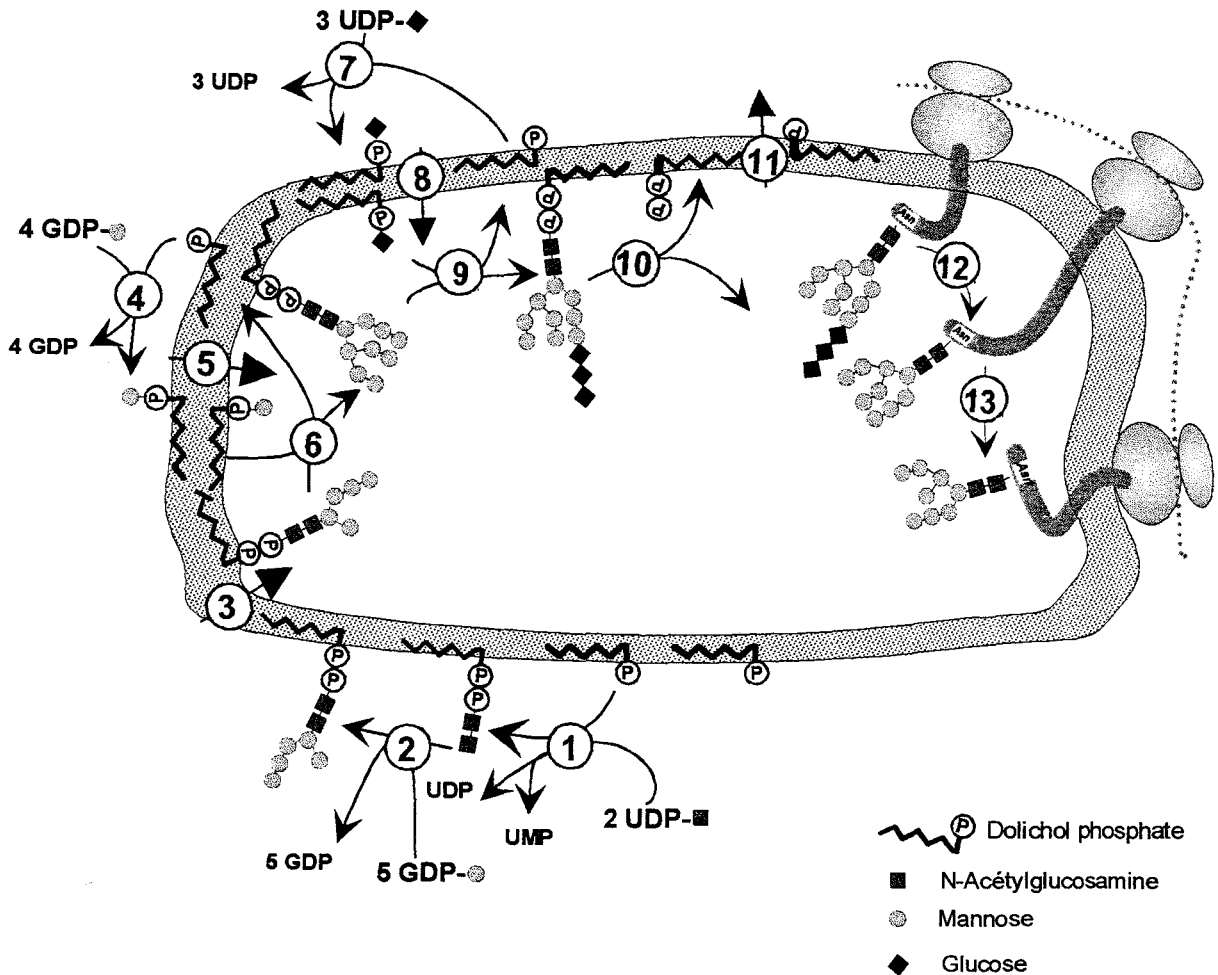


Figure 2 : Topographie du cycle du dolichol (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992).

Les enzymes impliquées à chaque étape de ce cycle sont : 1 : *N*-acétylglucosaminyl-1-P-transférase et *N*-acétylglucosaminyltransférase ; 2 : cinq mannosyltransférases (GDP-Man dépendantes) ; 3 : « flipase » ; 4 et 5 : Man-P-Dol synthétase ; 6 : quatre mannosyltransférases (Man-P-Dol dépendantes) ; 7 et 8 : Glc-P-Dol synthétase ; 9 : glucosyltransférases ; 10 : oligosaccharyltransférase ; 11 : Dol-pyrophosphatase ; 12 : α -glucosidase I et II ; 13 : RE α 1,2-mannosidase.

Le résidu asparaginyll doit être dans un triplet consensus Asn-X-Thr/Ser (X étant un acide quelconque, sauf la proline) pour pouvoir contracter une liaison *N*-glycosidique.

Une fois l'étape de transfert *en bloc* achevée, on est loin de la variété de structures que l'on observe sur la protéine mature. Les processus complexes de déglycosylation et de reglycosylation interviennent tout le long du trajet de la glycoprotéine dans les divers saccules de l'appareil de Golgi. Tout d'abord, l'accès à ces compartiments golgiens est conditionné par l'action sur le glycanne de glucosidases conduisant à une structure Man₉GlcNAc₂-protéine. Il semble que la présence de résidus de glucose empêche la glycoprotéine de quitter le RER.

2. Les processus de *N*-glycosylation dans l'appareil de Golgi

Dans les premières saccules golgiens, la maturation se poursuit par l'action de mannosidases spécifiques pour ne conserver de la structure initiale que le noyau commun à trois résidus de mannose branchés sur le résidu chitobiosyl lié à la protéine. C'est l'action séquentielle de toute une série de glycosyltransférases : *N*-acétylglucosaminyll-, galactosyl-, fucosyl- et sialyltransférases, voire sulfotransférases, qui aboutit à la multiplicité des structures. Elles résultent toutes de l'ordre d'action des glycosyltransférases : le produit particulier de l'action de l'une étant le substrat spécifique de la suivante. On comprend alors que l'enchaînement des réactions dépendra de la localisation correcte des enzymes. Qu'une glycosyltransférase soit absente ou mal localisée et la structure finale sera entièrement différente. Le schéma détaillé de biosynthèse présenté dans Figure 3 (page 12) montre l'évolution tout au long de l'appareil de Golgi des glycannes depuis les structures de type oligomannosidique vers les structures de type hybride, pour aboutir aux structures de type *N*-acétyllactosaminique.

RETICULUM ENDOPLASMIQUE

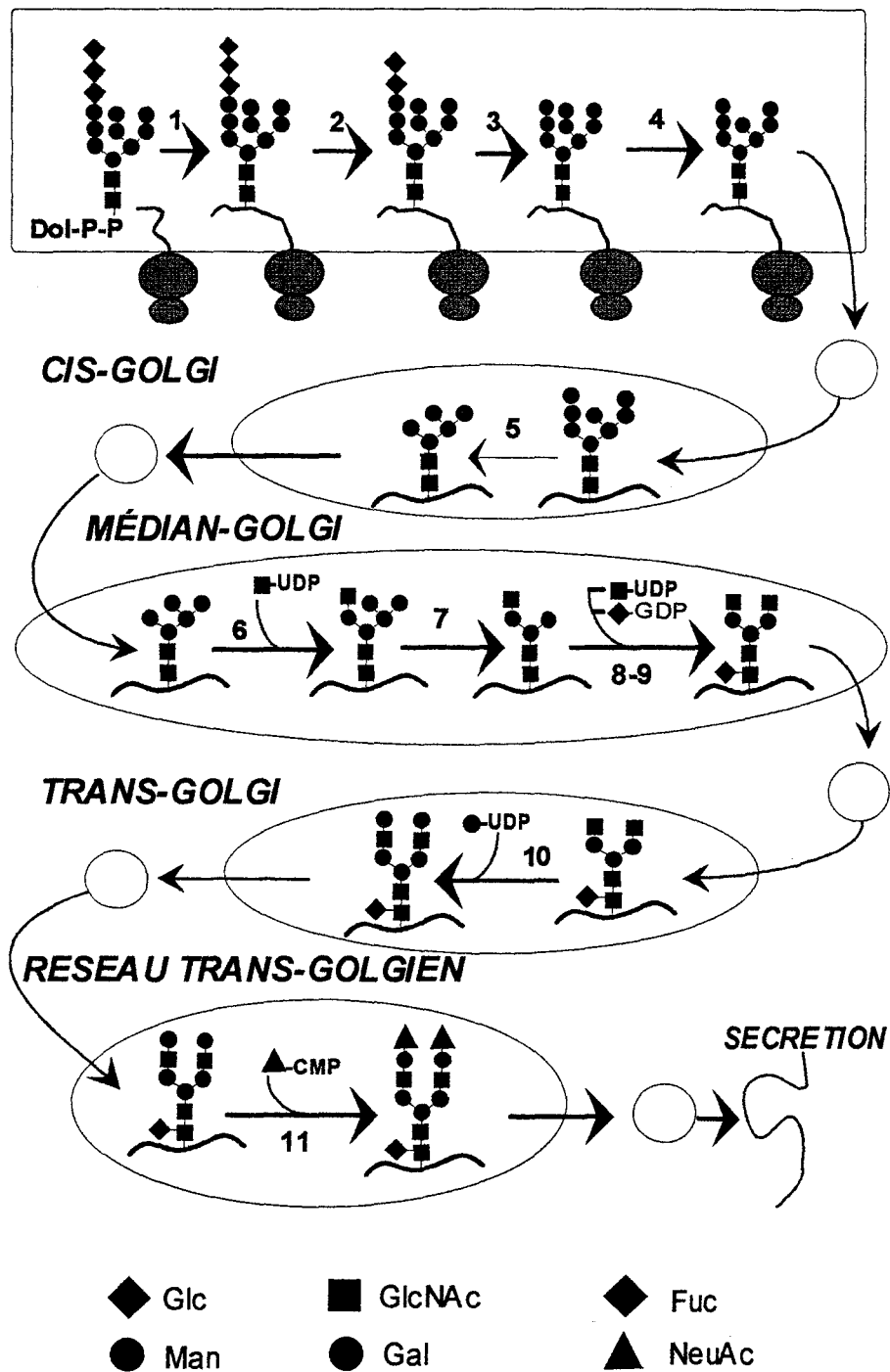


Figure 3 : Schéma simplifié de la biosynthèse des N-glycoprotéines

Les enzymes impliqués à chaque étape sont : 1 : oligosaccharyltransférase ; 2 : α -glucosidase I ; 3 : α -glucosidase II ; 4 : RE α 1,2-mannosidase ; 5 : α -mannosidase I ; 6 : N-acétylglucosaminyltransférase I ; 7 : α -mannosidase II ; 8 : N-acétylglucosaminyltransférase II ; 9 : α 1,6-fucosyltransférase ; 10 : β 1,4-galactosyltransférase ; 11 : α 2,3/6-sialyltransférase.

Une étape charnière dans le passage des structures oligomannosidiques vers des structures de type *N*-acétyllactosaminique est sous le contrôle d'une famille d'enzymes, les *N*-acétylglucosyltransférases (Schachter, 1991) qui contrôlent la substitution des résidus α -mannosyl du noyau par un à cinq résidus de *N*-acétylglucosamine ou, par l'expression d'un résidu de *N*-acétylglucosamine intercalaire lié directement au β -mannosyl. Ces six activités glycosyltransférasiques génèrent des structures de type *N*-acétyllactosaminique de mono- jusqu'à penta-antennées avec ou sans résidu intercalaire (Figure 4).

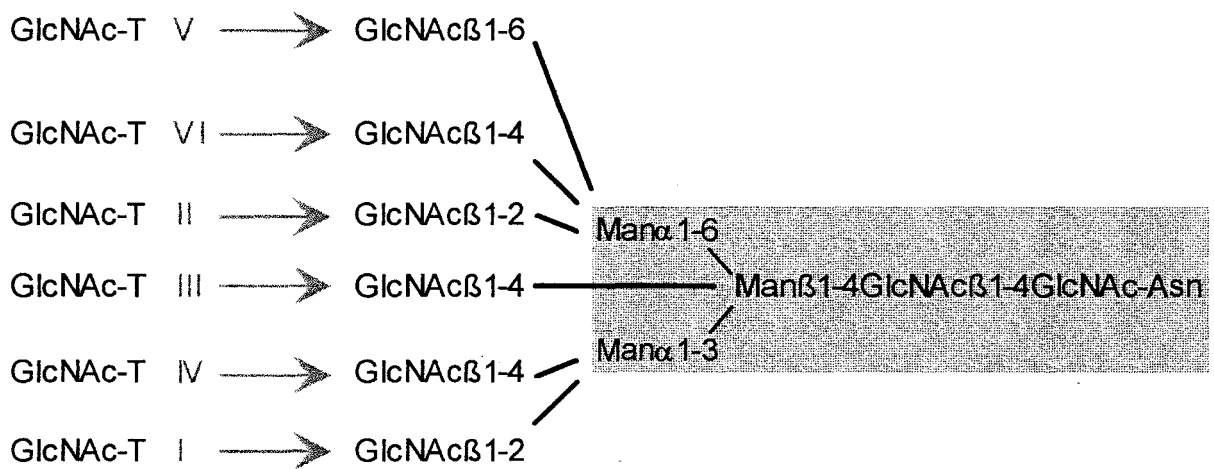


Figure 4 : Les six *N*-acétylglucosaminyltransférases (GlcNAc-T I à VI) impliquées dans la synthèse des *N*-glycannes penta-antennés et dans l'addition d'un résidu de *N*-acétylglucosamine intercalaire (Schachter, 1991).

3. Hétérogénéité des glycoprotéines naturelles

La purification de glycoprotéines à partir de milieux biologiques est à l'origine de la notion de populations hétérogènes fondées sur des structures de chaînes glycaniques variables substituant une fraction protéique inchangée. Par exemple, cette hétérogénéité d'origine glycanique a été observée sur l'hérythropoïétine isolée du sang (Tsuda *et al.*, 1988) ou de l'urine humaine (Takeuchi *et al.*, 1988), mais aussi sur la lactoferrine bovine extraite du lait de

vache (Coddeville *et al.*, 1992). Les *N*-glycannes portés par une glycoprotéine produite par un même tissu ne subissent pas tous une maturation identique. De plus, on a pu observer qu'une glycoprotéine telle que la lactoferrine bovine qui contient 5 sites de *N*-glycosylation (dont 4 sont effectivement glycosylés) possède des sites exclusivement substitués par des glycannes de type oligomannosidique et d'autres préférentiellement porteurs d'oligosaccharides de type *N*-acétyllactosaminique (Spik *et al.*, 1993). Une même glycoprotéine aura donc des oligosaccharides dont la maturation a été stoppée à différents stades, et ceci bien qu'ils aient tous effectué le même cheminement intracellulaire. L'hétérogénéité des *N*-glycannes au sein d'une unique glycoprotéine, comme au sein de l'ensemble d'une population d'une glycoprotéine a conduit à mettre en œuvre des techniques basées le plus souvent sur la spectrométrie de masse afin d'identifier les différents *glycovariants* qui substituent chaque site de *N*-glycosylation, on parlera dans ce cas de microhétérogénéité.

L'hétérogénéité de la fraction glycannique des glycoprotéines ne se limite pas aux *N*-glycannes, les voies de biosynthèse des *O*-glycannes sont elles aussi à l'origine de la formation de structures oligosaccharidiques très variables. La biosynthèse des *O*-glycannes sera abordée dans le chapitre suivant.

C. LA O-GLYCOSYLATION

(Shachter et Brockhausen, 1992 ; Brockhausen, 1995)

Alors que la *N*-glycosylation débute dans le RER par le péassemblage d'un oligosaccharide qui sera transféré *en bloc* sur un résidu asparaginyll de la protéine naissante, la *O*-glycosylation repose exclusivement sur l'addition séquentielle de monosaccharides à partir de glycosyl-nucléotides donneurs. La *O*-glycosylation est généralement initiée par l'addition d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine sur un résidu séryl ou thréonyl de la glycoprotéine. Toutefois on peut retrouver au niveau de glycoprotéines cytoplasmiques ou nucléaires des résidus de *N*-acétylglucosamine liés *O*-glycosidiquement, et des glycoprotéines de levures dont certains résidus séryl ou thréonyl sont substitués par des résidus de mannose. Au cours de cet exposé, nous nous intéresserons exclusivement aux *O*-glycannes de type mucine dont la première réaction aboutit à la formation de la structure GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, cette étape princeps se déroulant dans les tous premiers saccules golgiens, peut-être même dans un compartiment relié au RER.

1. La structure des *O*-glycannes

Outre la *N*-acétylgalactosamine impliquée dans la liaison sucre-protéine, les *O*-glycannes de type mucine contiennent communément de la *N*-acétylglucosamine, du galactose, du fucose et des acides sialiques. En dépit de la complexité apparente due à une grande variabilité structurale, les chaînes *O*-glycanniques se composent de trois régions distinctes : le noyau ou *core*, incluant la liaison avec l'axe peptidique; le squelette, région charnière qui peut être linéaire ou branchée; et la périphérie, région terminant la chaîne glycannique.

a) Les noyaux

A partir de la séquence GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, plusieurs routes placées sous le contrôle de glycosyltransférases sont possibles pour la biosynthèse menant à la formation des 8 *cores* connus à ce jour (Figure 5, page 17). Les *cores* 1 et 2 sont les noyaux les plus communément retrouvés sur les mucines et les glycoprotéines. Le *core* 1 (ou antigène T) est le plus souvent substitué par un ou deux résidus d'acide sialique (Figure 6, page 18). Les *O*-glycannes basés sur les *cores* 3 et 4 ont été caractérisés uniquement sur des mucines, le *core* 5 quant à lui est présent au niveau des glycoprotéines de différentes espèces animales et a été retrouvé chez l'homme au niveau d'adénocarcinomes et du méconium. Le *core* 6 a été caractérisé sur des mucines humaines de kyste ovarien. Le *core* 7 a été mis en évidence sur la mucine sous-maxillaire bovine (Chai *et al.*, 1992). Enfin, le *core* 8 est rencontré sur les mucines respiratoires humaines (van Halbeek *et al.*, 1994).

b) Les squelettes

Ils sont constitués d'unités disaccharidiques formés de galactose et de *N*-acétylglucosamine. Ces disaccharides de type 1 ou lacto (Gal β 1-3GalNAc) ou de type 2 ou néolacto (Gal β 1-4GlcNAc), sont antigéniquement distincts (Kabat, 1982). A la variabilité de la longueur des squelettes s'ajoute une diversité structurale, avec des structures linéaires ou branchées distinctes (Hounsell et Feizi, 1982). Lorsque les structures linéaires ne contiennent que des chaînes de type 2 liées en β 1-3, elles correspondent à l'antigène i (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal-). Les structures branchées ne contenant que des chaînes de type 2, associées par une liaison β 1-6 et une liaison β 1-3 entre la *N*-acétylglucosamine et le galactose, correspond à l'antigène I (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6 [Gal β 1-4GlcNAc β 1-3] Gal- β -).

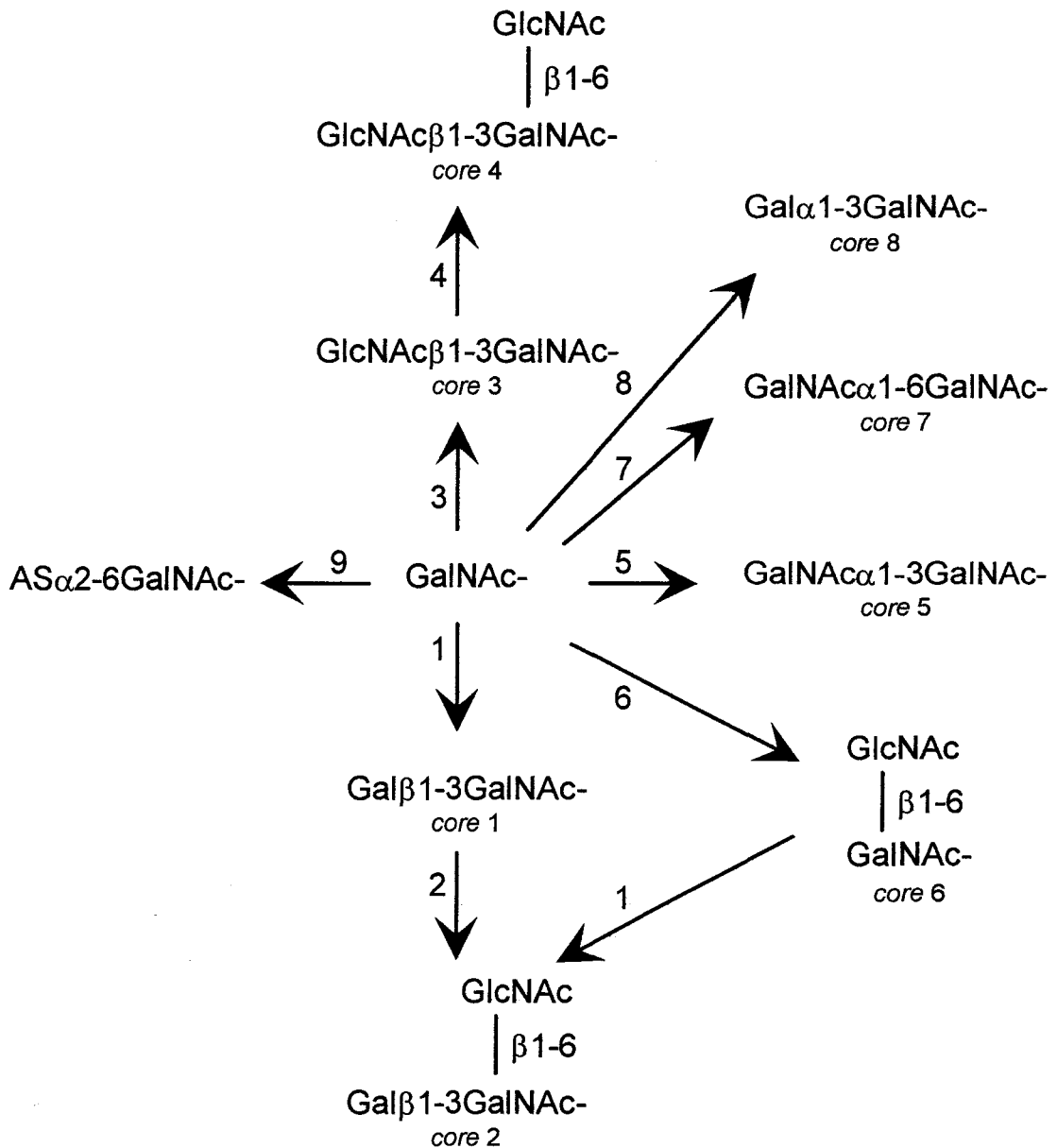


Figure 5 : Schéma de biosynthèse des *cores* O-glycanniques.

Les glycosyltransférases impliquées sont : 1 : core 1 β 1,3Gal-T ; 2 : core 2 β 1,6GlcNAc-T ; 3 : core 3 β 1,3GlcNAc-T ; 4 : core 4 β 1,6GlcNAc-T ; 5 : core 5 α 1,3GalNAc-T ; 6 : core 6 β 1,6GlcNAc-T ; 7 : core 7 α 1,6GalNAc-T ; 8 : core 8 α 1,3Gal-T ; 9 : ST6GalNAc I. (-T = transférase).

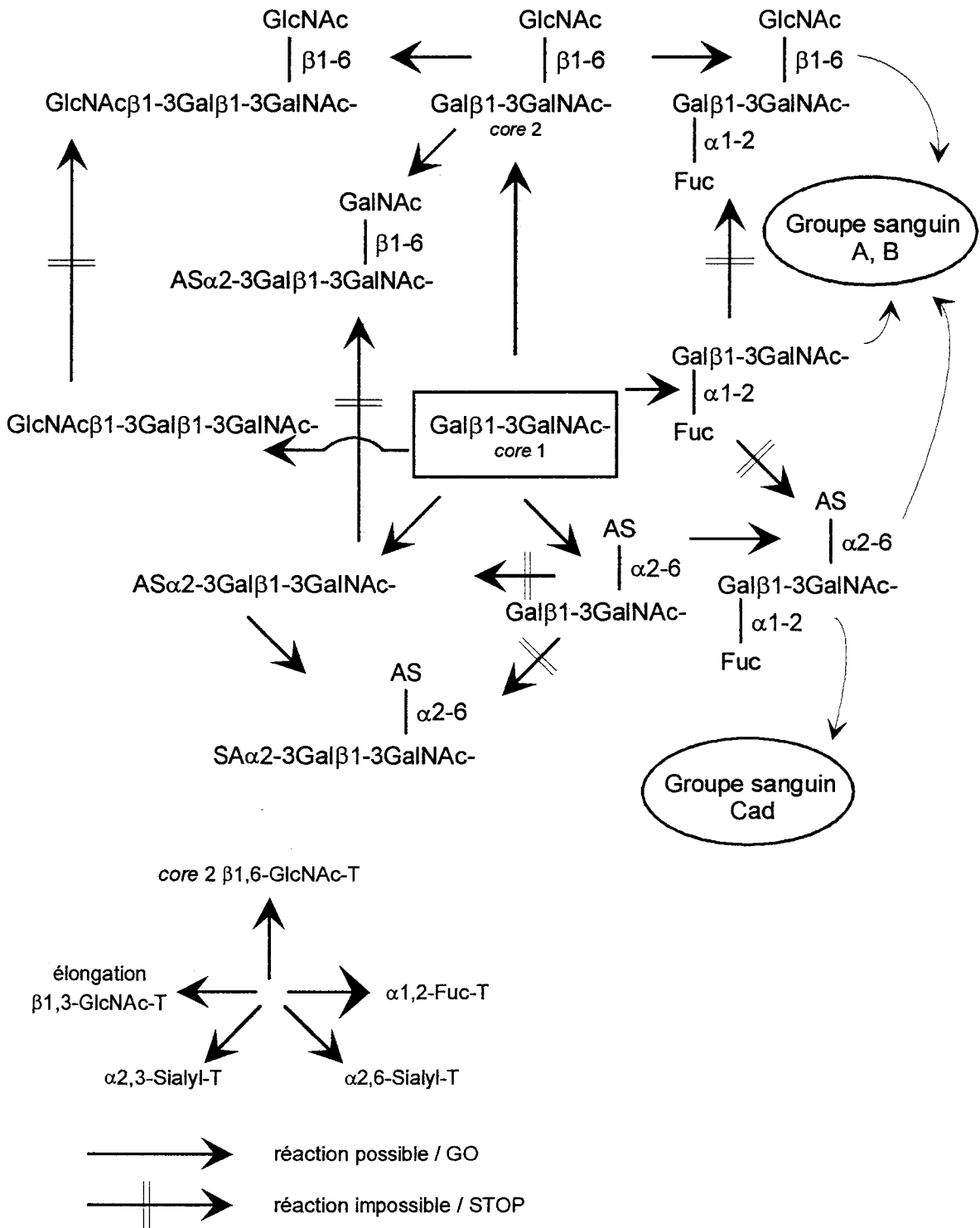


Figure 6: Représentation schématique de la maturation des chaînes O-glycanniques de type 1.

c) La périphérie

Les substituants les plus généralement rencontrés sur les O-glycannes des glycoprotéines de

mammifères sont des résidus d'acide sialique (α 2-3 et α 2-6), de fucose (α 1-2, α 1-3 et α 1-4), de *N*-acétylgalactosamine (α 1-3 et α 1-6), de *N*-acétylgalactosamine (β 1-4), de *N*-acétylglucosamine (α 1-4), de galactose (α 1-3), et des groupements sulfates.

Les régions périphériques les mieux caractérisées sont celles qui possèdent les activités de groupe sanguin A, B, H, et lewis. La présence de ces épitopes sur les mucines dépend des groupes sanguins et du statut sécréteur des sujets (Watkins, 1980 ; Kabat, 1982).

d) La biosynthèse des O-glycannes et son contrôle

La disposition intracellulaire des glycosyltransférases, de leurs cofacteurs et substrats (glycosyl-nucléotides donneurs ou glycoprotéines acceptrices) est discutée. Il semble que les enzymes soient disposés tout le long de l'appareil de Golgi. Ainsi, les *O*-glycoprotéines empruntant la voie de sécrétion verraient leur fraction *O*-glycannique se transformer au cours de leur cheminement depuis le cis- jusqu'au trans-Golgi. Une autre hypothèse propose que les glycosyltransférases seraient rassemblées au sein de complexes multi-enzymatiques où tout ou partie des processus de maturation des *O*-glycannes seraient réalisés.

Bien que la localisation des lieux où se déroulent les processus de *O*-glycosylation est encore imprécise, la *O*-glycosylation nous apparaît comme un processus séquentiel dans lequel chaque addition d'un nouveau monosaccharide est catalysée par une glycosyltransférase spécifique. De plus, de récents travaux montrent que chez les mammifères, la première étape de la *O*-glycosylation (qui consiste en l'addition d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine sur un résidu séryl ou thréonyl) est sous le contrôle d'une famille de polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférases, chacune ayant une spécificité de substrat réduite à un motif peptidique défini. Enfin, l'expression de ces différentes polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférases est fonction de l'espèce et du tissu choisis, plusieurs activités pouvant coexister au sein d'une même cellule (Clausen et Bennett, 1996; Marth, 1996).

On entrevoit ici que la spécificité de substrat des glycosyltransférases est l'un des principaux facteurs qui contrôle les voies de biosynthèse des *O*-glycannes. En effet, l'activité de chaque enzyme se limite à un motif accepteur *O*-glycannique (ou peptidique), à un glycosylnucléotide donneur et à la formation d'une liaison glycosidique précise (anomérie et substitution). Par conséquent, après avoir caractérisé de nombreuses structures *O*-glycanniques et activités enzymatiques, il a été possible de reconstituer les voies de biosynthèse des différents *cores* (Figure 5, page 17), mais aussi mieux comprendre les processus de maturation, comme ceux du core 1 (Figure 6, page 18).

Une simple observation des voies de biosynthèse montre que la spécificité de substrat des différentes enzymes oriente la direction prise par la structure glycannique en formation et que plusieurs activités glycosyltransférales peuvent être en compétition pour un même *O*-glycanne accepteur. D'autres facteurs participent à la conduite des processus de *O*-glycosylation. L'addition de signaux de terminaison sur les chaînes *O*-glycanniques en cours de formation stoppe définitivement toute évolution du *O*-glycanne. Ces signaux sont, par exemple, la substitution de la structure par un résidu d'acide sialique ou par un monosaccharide lié en anomérie α . De plus, la compartimentation cellulaire, en favorisant ou non le contact entre les différents acteurs de la biosynthèse des *O*-glycannes, permettra de limiter la diversité des structures formées. La compartimentation pourrait aussi influencer l'activité des glycosyltransférases en modifiant leur environnement. Par exemple, les activités sialyl- et fucosyltransférales sont sensibles à la concentration en ions divalents, comme le Mn^{++} .

Des structures *O*-glycanniques étant spécifiquement retrouvées chez certaines espèces, tissus ou cellules, on peut envisager une régulation au niveau génétique ou transcriptionnelle des différentes glycosyltransférases. Plusieurs polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférases sont aujourd'hui clonées et l'on peut espérer prochainement obtenir des éclaircissements sur le contrôle génétique de la synthèse des *O*-glycannes (Clausen et Bennett, 1996; Marth, 1996).

II. LA PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES

A. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE PRODUCTION CONCURRENTS DU SYSTEME BACULOVIRUS / CELLULES D'INSECTES

Un système efficace de production d'une protéine hétérologue nécessite de disposer d'un vecteur plasmidique ou viral et d'une cellule hôte compatible (Powel *et al.*, 1985). Le vecteur doit comporter un promoteur généralement dit *fort*, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées à la régulation de la transcription. De plus, il est souhaitable que le vecteur d'expression soit maintenu de façon stable dans la cellule et qu'il possède éventuellement des signaux spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Arbitrairement, les protéines hétérologues sont classées en quatre groupes. Dans le premier groupe, on trouve les petits polypeptides de moins de 80 acides aminés. Le deuxième groupe est constitué de protéines qui sont normalement sécrétées (enzymes, cytokines, hormones) et dont la taille varie entre 80 et 500 acides aminés. Dans le troisième groupe, on trouve de très grosses protéines sécrétées et des récepteurs cellulaires de plus de 500 acides aminés. A l'exception des protéines d'origine bactérienne, elles sont souvent exprimées avec plus de succès dans les cellules de mammifères. Enfin, un quatrième groupe comprend toutes les protéines non sécrétées dont la taille est supérieure à 80 acides aminés.

1. Le système procaryote

(Orfanoudakis et Egly, 1993)

Historiquement, les procaryotes et particulièrement *Escherichia coli* (*E. coli*) ont été utilisés avec succès pour l'identification de protéines de mammifères. En effet, la protéine hétérologue est souvent biologiquement active *in vitro* et presque toujours immunogène. Chez *E. coli*, on obtient d'excellents résultats avec des protéines dont le nombre d'acides aminés

varie entre 100 et 200. De plus, les plasmides de *E. coli* sont largement utilisés pour l'expression des petits polypeptides de moins de 80 acides aminés sous la forme de protéine de fusion.

Par conséquent, *E. coli* peut se révéler un bon candidat pour la production de protéines entières ou de fragments destinés à la production d'anticorps. Mais, une fois que l'on a obtenu une importante quantité de la protéine recombinante (1 à plusieurs grammes par litre de culture), l'attention se porte sur les possibilités d'utilisation de cette masse de protéine. En effet, *E. coli* ne réalise aucune des modifications post-traductionnelles nécessaires à la maturation des protéines d'eucaryotes et *E. coli* ne peut pas former de ponts disulfures dans l'environnement réducteur de son cytoplasme. Par conséquent, les protéines recombinantes produites dans le cytoplasme de *E. coli* se révèlent être le plus souvent inactives, mal repliées et insolubles, et se retrouvent sous la forme des corps d'inclusion dans le cytoplasme des bactéries (Schein, 1989). Ces corps d'inclusion sont facilement purifiés et la protéine, une fois resolubilisée et renaturée, est partiellement active. Toutefois, le plus souvent, ces molécules demeurent insolubles même après un traitement par des agents chaotropiques (Urée 6 M ou chlorure de guanidium 8 M), suivi d'une renaturation. Enfin, certaines protéines recombinantes sont dégradées sous l'action des protéases cytoplasmiques.

Bien que les capacités sécrétoires de *E. coli* apparaissent limitées (Winckner *et al.*, 1991), un moyen de pallier aux problèmes associés à l'expression de protéines hétérologues inactives dans le cytoplasme est de parvenir à faire sécréter ces protéines dans le périplasma ou dans le milieu de culture. La stratégie la plus simple consiste à placer le gène à exprimer derrière une séquence signal (Lunn *et al.*, 1986). Ainsi, pour stabiliser la protéine exprimée ou pour faciliter sa purification, il est recommandé de faire appel à une protéine de fusion ou à l'addition d'une *queue* peptidique favorisant la sécrétion. Ce fragment fusionné pourra conduire la protéine dans un compartiment différent de la cellule hôte (périplasma ou milieu de culture) et, s'il

possède une affinité pour une molécule particulière, permettra une purification plus facile de la protéine et dans certain cas, favorisera la solubilisation dans le cytoplasme.

2. Les plantes

Il est possible aujourd'hui de produire des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique chez les plantes, suite aux récents développements des biotechnologies végétales, en particulier la maîtrise croissante des techniques de transfert de gènes. Les végétaux représentent une source de protéines considérable à faible coût et d'une grande sécurité vis-à-vis des contaminations virales et bactériennes. Plusieurs systèmes d'exploitation ont été envisagés : les plantes en champs, les cultures de cellules en suspension ou immobilisées, et les cultures de racines.

Agrobacterium tumefaciens est généralement utilisé comme vecteur pour la production de plantes transgéniques (Weising *et al.*, 1988). En effet, il est connu depuis de nombreuses années que *Agrobacterium tumefaciens* est responsable de tumeurs chez les plantes. Ainsi, durant l'induction de la tumeur, *Agrobacterium tumefaciens* transfère à la cellule végétale un morceau d'ADN d'un plasmide bactérien appelé Ti (*Tumor inducing plasmid*). Ce fragment d'ADN est délimité par deux séquences répétées encadrant la région T. Ce T-ADN peut s'intégrer dans l'un des chromosomes de la plante. Le mécanisme d'intégration dans le génome de la plante est encore mal connu bien qu'il apparaisse que le T-ADN s'intègre préférentiellement dans des régions où l'ADN peut être transcrit (Herman *et al.*, 1990). Le nombre de copies intégrées de façon stable du T-DNA présentes dans les cellules transformées est généralement de 1 à 10.

Les rendements en protéines recombinantes obtenus jusqu'alors avec le système végétal sont faibles et représentent pour la plupart des cas 0,01% des protéines totales. Quelques auteurs rapportent des niveaux d'expression plus élevés, environ 1% (Hiatt *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1992). Afin d'atteindre des niveaux plus élevés d'expression, certains paramètres

peuvent être optimisés. En particulier, il est possible de jouer sur la force du promoteur placé en amont du gène d'intérêt. D'autre part, il est important de contrôler le stockage *in vivo* de la protéine recombinante en induisant son adressage dans un compartiment cellulaire choisi. En effet, la stabilité de la protéine synthétisée varie en fonction du compartiment cellulaire dans lequel la protéine est stockée après sa maturation. Lorsque les protéines sont accumulées dans le cytoplasme, elles peuvent subir des attaques protéolytiques. Les compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique ou les vacuoles pourraient être des environnements plus stables, favorables à l'accumulation des protéines recombinantes. Pour orienter le transport des protéines recombinantes dans les cellules végétales, on dispose de différentes séquences peptidiques d'adressage d'origine végétale, permettant la rétention de la protéine hétérologue dans le réticulum endoplasmique, ou dans la vacuole, ou bien encore dans l'espace périplasmique (Duong *et al.*, 1987; Inohara *et al.*, 1989; Jones et Robinson, 1989).

3. Les levures

(Cregg *et al.*, 1993)

Les premières levures sélectionnées pour la production de protéines hétérologues ont été *Saccharomyces cerevisiae*, du fait des nombreuses connaissances acquises sur sa génétique (Fleer *et al.*, 1992). Cependant, la levure méthylo-trophique *Pichia pastoris* est généralement choisie pour une utilisation en production (Romanos *et al.*, 1992). Deux critères ont contribué au choix de *Pichia pastoris* : des conditions de culture bien établies, et sa capacité d'utiliser des promoteurs régulés par le méthanol qui peuvent être utilisés dans le contrôle de l'expression d'une protéine hétérologue.

Les conditions de culture de *Pichia pastoris* nécessitent l'emploi de fermenteurs permettant de maîtriser à la fois le pH, l'aération des cultures et l'apport de la source carbonée. Le temps de culture pour l'obtention du pic de production de protéines recombinantes est classiquement de 150 à 200 heures après le remplacement du glycérol par le méthanol. Quant à la sécrétion

dans le milieu de culture de la protéine recombinante, elle nécessite un peptide signal de sécrétion, le peptide signal de la protéine pouvant parfois être utilisé. Le système de production par les levures permet l'obtention de plusieurs grammes de protéines recombinantes par litre de milieu de culture. Néanmoins, leur forte antigénicité, due le plus souvent à une glycosylation différente de celle de la glycoprotéine naturelle, ne permet pas d'entrevoir, pour les protéines hétérologues produites par les levures, d'applications en thérapie humaine.

4. Les cellules de mammifères

Les cellules d'ovaire de hamster (CHO) est la souche la plus employée actuellement. Différents vecteurs d'expression d'origine virale (virus de la vaccine, SV40, adenovirus, retrovirus) ont été développés pour introduire des gènes dans le génome des cellules CHO. D'autres cellules de mammifères ont été plus récemment utilisées, en particulier les cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK) et des cellules de rein de singe vert (COS) pour la production de vaccin, d'interférons ou encore de facteurs de coagulation (Busby *et al.*, 1985). On distingue deux types d'expression en culture de cellules de mammifères : l'expression transitoire et l'expression stable. Dans le cas de l'expression transitoire, le plasmide porteur du gène exogène peut se répliquer de façon autonome et permettre la synthèse de la protéine hétérologue, mais provoque rapidement la mort de la cellule (70 à 90 heures après transfection) (Selden *et al.*, 1986). En cas d'expression stable, après l'intégration du gène exogène dans le génome de la cellule hôte, un long travail d'amplification génique est nécessaire avant l'obtention de la protéine recombinante (de 6 à 12 mois).

L'expression en cellules de mammifères permet l'obtention de protéines recombinantes conformément proches des protéines humaines, mais ce système d'expression offre de faibles niveaux de production, de l'ordre de quelques mg/l après des mois d'amplification coûteuse. De plus comme nous le verrons ultérieurement, leur potentiel de glycosylation est différent pour chaque lignée cellulaire, et produit des glycoprotéines recombinantes porteuses de

glycannes légèrement différents de ceux trouvés chez l'homme.

5. Les animaux transgéniques

(Houdebine, 1993)

Des protéines recombinantes sont également produites par les mammifères entiers. Dans ce cas, le gène étranger est injecté dans le patrimoine génétique par micro-injection dans le pronucléus de l'oeuf fécondé et ce dernier est ensuite ré-implanté dans l'utérus de la femelle. Les premiers résultats ont été obtenus en 1982 et 1983 par Palmiter *et al.*, après avoir réussi la production de l'hormone de croissance de rat puis de l'hormone de croissance humaine chez des souris transgéniques. S'il convient de noter que 90 % des animaux transgéniques sont des souris, la technique de la transgénèse est transposable à la majorité des autres mammifères (Hammer *et al.*, 1985). Pour faciliter la récupération de la protéine d'intérêt, il est souhaitable qu'elle soit sécrétée dans le sang ou dans le lait des animaux transgéniques. Pour purifier la protéine recombinante à partir du lait, les constructions génétiques contiennent la séquence régulatrice d'une protéine du lait fusionnée au gène d'intérêt à exprimer. Il n'existe pas de vecteur type défini et chaque expérimentation est particulière. Néanmoins dans chaque construction, la présence d'introns et des terminateurs est nécessaire.

B. LE SYSTEME BACULOVIRUS / CELLULES D'INSECTES

1. Les insectes et les différentes lignées cellulaires de lépidoptères

a) Qu'est-ce qu'un lépidoptère ?

Les insectes (environ 700.000 espèces) font partie de l'embranchement des arthropodes (Arms et Camp, 1989) et se caractérisent par : (i) un corps divisé en trois parties tête, thorax et abdomen ; (ii) la présence d'antennes ; (iii) des pièces buccales modifiées pour broyer, sucer ou piquer ; (iv) trois paires de pattes et habituellement deux paires d'ailes.

Les principaux ordres des insectes sont regroupés selon leur mode de développement post-embryonnaire. Ainsi, l'ordre des lépidoptères fait partie des holométaboles, insectes subissant le phénomène de métamorphose, dont les stades successifs du développement sont : l'oeuf, la larve, la nymphe ou la pupe et pour finir, l'imago (insecte adulte sexué).

De plus, les lépidoptères (environ 110.000 espèces) se caractérisent par : (i) des pièces buccales broyeuses chez la larve (chenille), alors que l'adulte possède une longue trompe recourbée de type suceur ; enfin, (ii) l'adulte (papillon) possède de très grandes ailes couvertes d'écailles.

b) Comment établir une lignée cellulaire de lépidoptères ?

Les insectes offrent un choix plus important que les mammifères pour l'établissement de lignées cellulaires du fait de leur différenciation tissulaire moins poussée. Les cellules d'insectes sont soumises à une hiérarchie tissulaire moins affirmée que celle des vertébrés puisque leurs cellules conservent la faculté de se dédifférencier ; ceci permet d'observer chez les insectes, des phénomènes de régénération d'organes. Les lignées établies de cellules d'insectes ont vu le jour dans les années soixante suite aux différents travaux qui ont fourni des milieux de culture de plus en plus adaptés. Toutefois, la plupart des publications concernant l'établissement de lignées stables datent des années soixante-dix (Tableau I, page 28). Ces lignées, outre leur intérêt pour la virologie, ont été déterminantes pour les travaux d'ontogenèse tels que l'étude de la différenciation cellulaire et de la régulation hormonale.

Tableau I. Exemples de lignées cellulaires de lépidoptères disponibles.

Espèce de lépidoptère	Origine tissulaire	Nom de la lignée cellulaire
<i>Bombyx mori</i> Angl. : Silkworm Franç. : Ver à soie	Ovaire/Embryon/ Tissu adipeux	SES-BoMo-15A
<i>Mamestra brassicae</i> Angl. : Cabbage moth Franç. : Piérale du chou	Ovaire de pupes Ovaire de larves Ovaire d'adultes Hémocyte de larves Tissu adipeux de larves	NIAS-MB 19,25,32 IZD-MB 1203 HPB-MB IZD-MB 0503, 0504, 2006, 2506, 2007
<i>Plodia interpunctella</i> Angl. : Indianmeal moth	Disques imaginaux	IAL-PiD2
<i>Spodoptera frugiperda</i> Ang. : Fall armyworm	Ovaire de pupes Hémocyte/ovaire	IPLB-Sf21 IPLB-Sf21AE IPLB-Sf1254 IAL-SfD1 clone Sf9 de IPLB-Sf21AE (parent)
<i>Spodoptera littoralis</i> Angl. : Cotton leaf worm	Larve trypsinisée Ovaire	HPB-SL HPB-SI-26, CLS-79
<i>Trichoplusia ni</i> Angl. : Cabbage looper	Disques imaginaux Embryon Ovaire	IAL-TND1 BTI-Tn4B1 Tn-368, TN-CL1 clones 3/5/8/10 de Tn-368 (parent) subclones 1-3 de Tn-368 (parent)

La méthodologie suivie pour créer une lignée cellulaire d'insectes débute par l'établissement d'une primoculture. L'établissement de la primoculture est tout d'abord confronté à la difficulté d'obtenir des fragments tissulaires en quantité suffisante. De préférence, on débute avec les phases immatures de l'insecte qui offrent plus de chances de réussite. Plusieurs types cellulaires sont susceptibles d'être utilisés. On trouve ainsi des lignées établies à partir de tissus adipeux, d'ovaires, de tissus embryonnaires, d'hémolymphe ou de disques imaginaux (les disques imaginaux sont des groupes de cellules présents chez les insectes subissant le phénomène de métamorphose. Ces entités discrètes s'assemblent lorsque la larve se transforme en chrysalide ou en puppe et se différencient pour former des structures dont l'épithélium sécrète la cuticule, polymère complexe de *N*-acétylglucosamine, sous l'influence d'hormones.). Cela dit, dès que les cellules se sont différenciées et multipliées, il est impossible de définir leur provenance tissulaire et de la même façon, elles ont perdu toutes les activités associées à leur état différencié. Les premières cellules qui se déplacent hors de l'implant sont généralement fusiformes, de même apparence que les fibroblastes. On trouve aussi des cellules plus rondes, peu adhérentes, d'origine épithéliale.

Au cours de la phase de primoculture, les cellules passent par différents stades où elles changent de morphologie, à la suite de quoi dans la plupart des cas elles meurent au bout de quelques semaines voire plusieurs mois. Dans certains cas, un phénomène d'adaptation difficile à interpréter fait que les cellules acquièrent la faculté de se multiplier, on parle alors de lignées cellulaires établies.

A la suite de la phase d'adaptation, la culture est composée d'une population de cellules, physiologiquement et morphologiquement différentes. On a donc recours au clonage pour rechercher une homogénéité, qu'il faut cependant entretenir au bout de nombreux repiquages en procédant à un nouveau clonage. Citons pour exemple la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* 21 et son clone *Spodoptera frugiperda* 9.

Le Tableau I (page 28) représente quelques exemples de lignées cellulaires de lépidoptères disponibles à ce jour. Bien que seules des lignées de lépidoptères pouvant être infectées par le baculovirus sont citées dans ce tableau, il faut signaler qu'il existe d'autres lignées cellulaires d'insectes provenant de diptères et, dans une moindre mesure de coléoptères et d'orthoptères. On remarquera que pour une même espèce de lépidoptère telle que *Mamestra brassicae*, on relate plusieurs lignées ayant différentes origines tissulaires. Toutes les lignées présentées ne sont pas également sensibles à l'infection par un baculovirus donné et, selon le milieu de culture utilisé, cette sensibilité varie à tel point que des lignées connues autrefois comme non-permissives le deviennent à l'heure actuelle.

c) Comment cultiver les cellules de lépidoptères ?

(Devauchelle et Cerutti, 1993)

Un grand nombre de milieux de culture permet la multiplication des cellules et la réplication des baculovirus (Mitsuhashi, 1989; Chiou et Wu, 1990).

Les milieux les plus communément utilisés sont le milieu de Grace (Grace, 1962), le TC 100, l'IPL-41 et les milieux dérivés du TC-199-MK (McQuade *et al.*, 1989). Tous ces milieux sont le plus souvent complétés par 2 à 10% de sérum de veau foetal et par des extraits de levure ou des hydrolysats protéiques tels que la lactalbumine. La composition du milieu de culture, telle que la quantité de sérum de veau, peut influencer considérablement les taux de production de protéines recombinantes. Actuellement, plusieurs milieux autorisent la culture de cellules en absence totale de sérum de veau foetal. Ces milieux permettent d'obtenir une bonne multiplication des cellules et une bonne production de protéines recombinantes. Il s'agit par exemple du Sf 900 (Gibco), EX-CELL 400 et 401™ (Sera-Lab, UK) et du milieu BM-25 développé à la station de pathologie comparée (INRA de S^t Christol-les-Alès) par le Dr. J.M. Quiot. En fonction de l'objectif, on pourra disposer de milieux peu onéreux mais de

composition mal définie ou beaucoup plus sophistiqués, mais mieux définis. Dans ce dernier cas, les protéines recombinantes obtenues pourront être purifiées dans de bonnes conditions, ces milieux ne renfermant que très peu de protéines.

Pour la croissance de la plupart des cellules de lépidoptères, il existe un optimum de température compris entre 25 et 30°C. Contrairement aux cellules de mammifères, il n'est pas utile d'employer un tampon bicarbonate-CO₂ et d'ajouter du rouge de phénol. Il suffit d'utiliser un tampon efficace à pH 6,2. Le temps de doublement des populations de cellules est de 16 à 24 heures et, dans des conditions normales en fermenteurs, la densité cellulaire varie de 2x10⁶ à 5x10⁶ cellules/ml, ce qui permet d'obtenir des taux de protéines de plusieurs dizaines de mg par litre. Enfin, la plupart des lignées de cellules d'insectes peuvent croître en tapis cellulaire ou en suspension (Miller *et al.*, 1986; Piwnica-Worms, 1990). La culture de cellules d'insectes dans des bioréacteurs de 5 à 100 litres est fréquemment rencontrée dans des installations pilotes. Actuellement la culture à haute densité se révèle potentiellement intéressante, les densités cellulaires pouvant dépasser 5x10⁷ cellules/ml ce qui permet d'atteindre des taux de protéines de plusieurs centaines de mg par litre.

2. Le cycle naturel du baculovirus

(Devauchelle et Cerutti, 1993)

Les baculovirus (du latin baculum = petit bâtonnet) constituent un groupe de virus présents uniquement chez les arthropodes et capables d'infecter plus de 600 espèces d'insectes. Différentes espèces de baculovirus peuvent infecter des larves de lépidoptères ce qui explique leur utilisation pour la lutte biologique contre les lépidoptères ravageurs de culture et comme système d'expression de gènes étrangers. Si les baculovirus sont virulents contre certaines espèces d'insectes, ils ne sont pathogènes ni pour les plantes ni pour les vertébrés (Granados et Hashimoto, 1989).

Ces virus en forme de bâtonnets d'une longueur d'environ 350 nm et d'un diamètre moyen

de 50 nm, contiennent un génome constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire dont la taille varie entre 88 et 153 kpb.

La famille des baculoviridae est divisée en deux sous-familles (Wilson *et al.*, 1991) : (i) les nudibaculoviridae, qui regroupent les baculovirus dépourvus de corps d'inclusion pendant tout leur cycle de développement et, (ii) les eubaculoviridae, qui sont subdivisés en deux genres :

- Le genre polyhédrie nucléaire (NPV, *Nucléar Polyedrosis Virus*) qui regroupe les virus inclus dans des corps protéiques de 1 à 5 μm : les polyèdres. On les subdivise en deux sous-genres selon que l'enveloppe renferme une seule nucléocapside (SNPV, *Single NPV*) ou plusieurs nucléocapsides (MNPV, *Multiple NPV*).
- Le genre granuleuse (GV, *Granulosis Virus*) qui regroupe les virus dont la nucléocapside est incluse dans le corps d'inclusion appelé granule.

Un des virus les plus étudiés aujourd'hui est celui qui a été originellement isolé des larves de *Autographa californica*. Ce virus connu sous le sigle AcNPV (ou AcMNPV) se multiplie dans le noyau de plus de 30 espèces différentes de lépidoptères (Groner, 1986).

Le cycle de réplication de ce virus est relativement complexe (Granados et Federeci, 1986a et 1986b; Blissard. et Rohrmann, 1990). Un des aspects les plus curieux est la synthèse biphasique de deux formes différentes du virus : les particules virales extracellulaires qui vont bourgeonner de la cellule et les particules virales incluses dans les polyèdres. La polyédrine est une protéine structurale viro-codée qui constitue la matrice protéique cristallisée formant les corps d'inclusion. Ceux-ci protègent le virus des facteurs de l'environnement qui inactivent rapidement les formes libres. Les larves ingèrent les polyèdres qui sont dissous dans le suc intestinal en général très alcalin, les virions sont libérés et pénètrent dans les cellules par fusion membranaire ou par endocytose dans les cellules permissives, et la nucléocapside est amenée jusqu'au noyau où elle libère son ADN. La transcription des gènes précoces peut alors

commencer. La réplication de l'ADN commence 7 heures après l'infection et l'expression des gènes précoces est réprimée au bénéfice des gènes tardifs. Entre 10 et 48 heures, des particules virales bourgeonnent à la surface des cellules et permettent, après leur libération, d'infecter les autres cellules. Les corps d'inclusion sont visibles à partir de la 18ème heure et restent dans les cellules jusqu'à 4 à 5 jours au moment de la lyse cellulaire (Figure 7, page 34).

3. Application à l'expression de gènes étrangers

(pour revue, Summer et Smith, 1987; Luckow, 1990; Devauchelle et Cerutti, 1993)

Le génie génétique a utilisé ce système pour exprimer des protéines hétérologues par le biais de cellules d'insectes infectées. Les gènes de la polyédrine et de la protéine P10 se sont montrés intéressants puisque d'une part, le produit de ces gènes n'est pas indispensable en culture cellulaire, et d'autre part, parce qu'ils sont tous deux sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. Il était dès lors possible de cloner en aval du promoteur de la polyédrine (ou de celui de la protéine P10) et d'infecter des cellules en culture avec ce baculovirus recombinant.

Des études menées sur l'infection *in vitro* de cellules de *Spodoptera frugiperda* ont mis en évidence quatre phases dans l'expression des gènes d'AcNPV au niveau transcriptionnel et traductionnel (Miller *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1989; Blissard et Rohrmann, 1990). Les gènes de la phase très précoce de 0 à 4 heures, sont réprimés avant la réplication de l'ADN. Les gènes de la phase précoce, qui nécessitent les produits de certains gènes de la phase très précoce, sont activés de 5 à 7 heures. Puis viennent les gènes tardifs exprimés entre 8 et 18 heures, qui sont des protéines de structure. Enfin au moins deux gènes tardifs-tardifs, ceux de la polyédrine et de la protéine P10, sont transcrits très tardivement, après 18 heures.

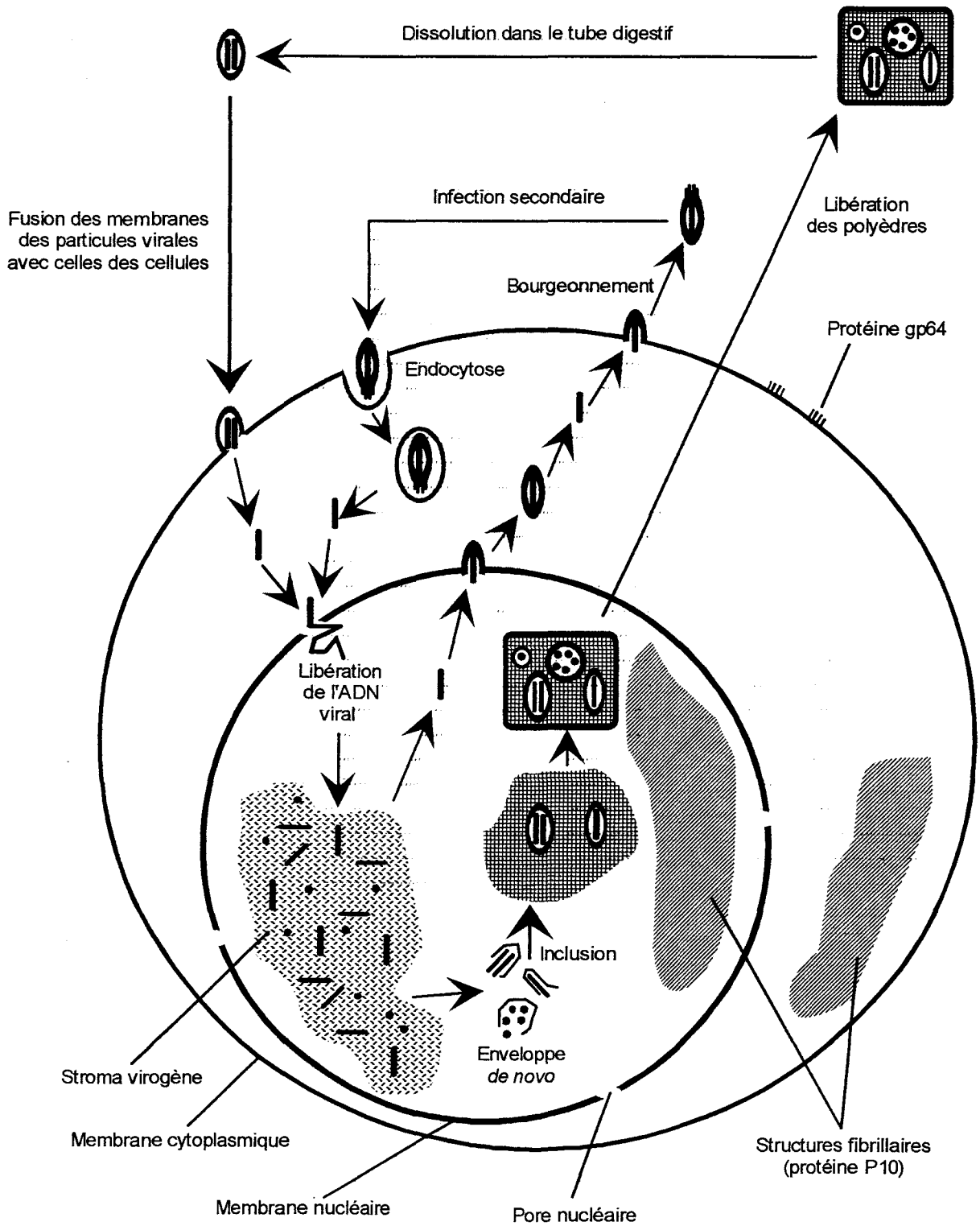


Figure 7 : Schéma du cycle de multiplication des baculovirus de la polyédrose nucléaire (Chaabihi, Thèse, 1992).

La construction d'un baculovirus recombinant vecteur d'un gène étranger est en général effectuée en deux étapes (Figure 8, page 36). La taille importante de l'ADN du baculovirus ne permet pas de manier de façon aisée ce génome. L'introduction du gène à exprimer au sein du baculovirus est réalisée par l'intermédiaire d'un vecteur plasmidique qui permet la recombinaison homologue avec le génome viral. Ainsi, le gène étranger est inséré dans un plasmide possédant un site de polyclonage en aval du promoteur du gène de la polyédrine ou de la protéine P10, entouré de régions flanquantes de l'ADN du baculovirus : c'est le vecteur de transfert. Une culture de cellules d'insecte (lignée *Spodoptera frugiperda* 9 en général) est cotransfectée avec le vecteur de transfert et l'ADN du baculovirus. Il peut alors se produire une recombinaison entre les régions homologues du plasmide et du génome viral, ce qui conduit à l'obtention d'un virus ayant intégré le gène à exprimer (Luckow et Summers, 1988; Luckow, 1990).

Différentes techniques de cotransfection ont été utilisées, citons la cotransfection au phosphate de calcium, la lipofection et l'électroporation. Le pourcentage de virus recombinants varie de 0,1 à 5% et différents facteurs semblent intervenir tels que, (i) la quantité et la proportion respectives de plasmide et de virus, (ii) la longueur des régions flanquantes dans le vecteur de transfert et, (iii) la taille du gène étranger. Les baculovirus recombinants sont souvent identifiés par la morphologie des plages de lyse observées à faible grossissement sous le microscope. En effet, dans un tapis cellulaire, une cellule infectée ne se divise plus et rapidement elle produit des particules virales bourgeonnantes qui vont infecter les cellules voisines. Pour éviter la dispersion de ces virions, une couche d'agarose est placée sur le tapis cellulaire. Au bout de 4 à 5 jours, de nombreuses cellules qui entourent la cellule initiale sont également infectées et meurent. Ainsi, en utilisant un colorant vital comme le rouge neutre, il est très facile de distinguer ces plages qui forment des « trous » non colorés dans le tapis rouge des cellules vivantes.

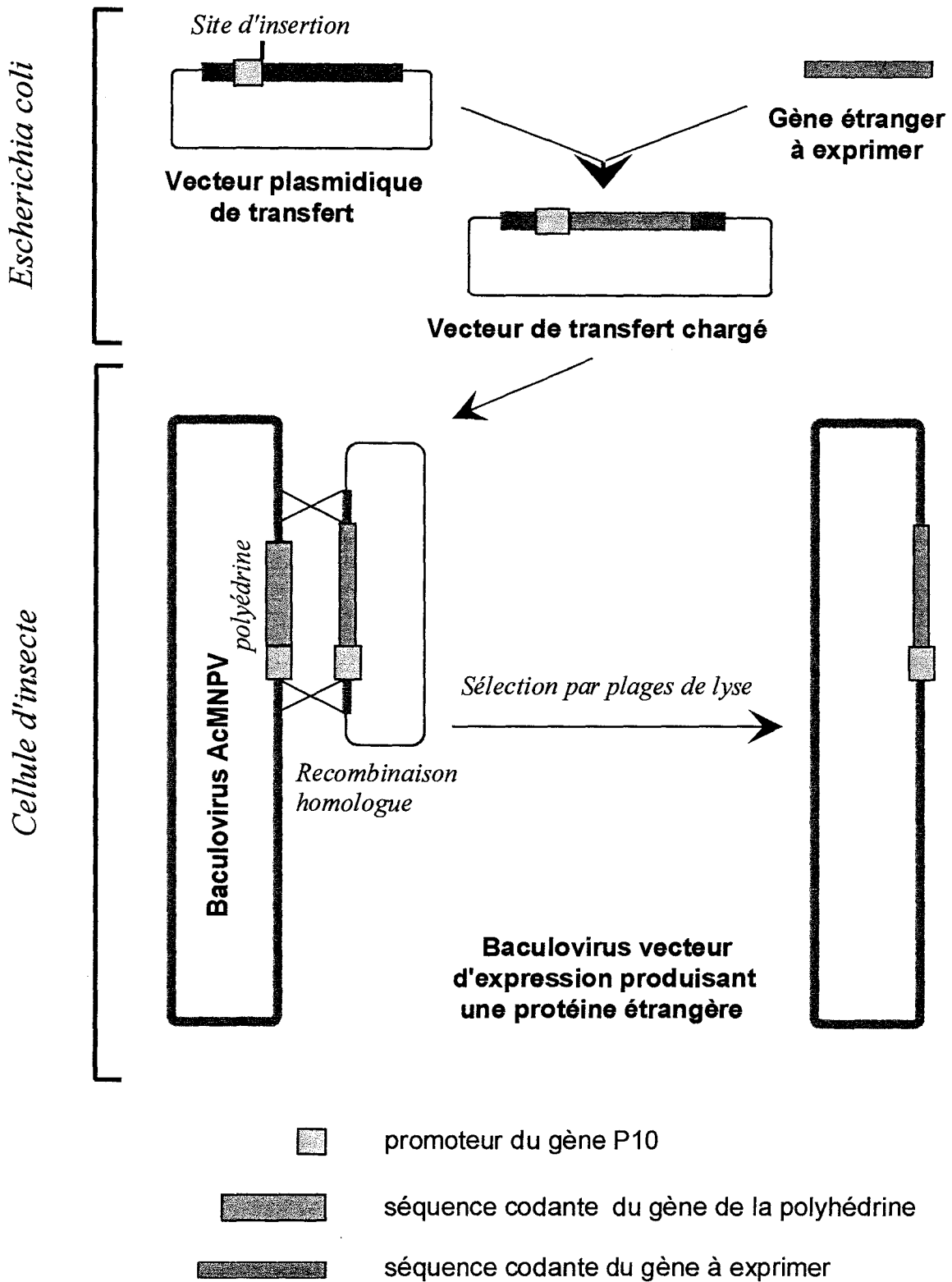


Figure 8: Principe de construction de baculovirus recombinants exprimant un gène étranger sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine P10 (Chaabihi, Thèse, 1992).

Toutes les plages examinées au microscope vont présenter soit un phénotype « présence de polyèdres » correspondant à une infection par un virus sauvage, soit un phénotype « absence de polyèdre », ce qui correspond alors à un virus recombinant qui possède le gène étranger à la place de celui de la polyédrine. Le travail de sous clonage qui en découle est long et fastidieux, c'est pourquoi un ADN linéarisé de baculovirus est maintenant disponible. Dans ce cas, seule la recombinaison avec le gène étranger introduit dans le plasmide permet la recircularisation de l'ADN viral et donc sa réplication. Ainsi, seuls les virus ayant intégré le gène étranger se multiplient dans le milieu et la sélection n'est alors plus une absolue nécessité. Néanmoins, un sous clonage est vivement conseillé afin de s'assurer de la pureté du virus recombinant.

III. LE POTENTIEL DE GLYCOSYLATION DES SYSTEMES D'EXPRESSION

Quelle que soit la cellule, les mêmes lois gouvernent la synthèse des protéines. En ce qui concerne les modifications postraductionnelles subies par les protéines et particulièrement la glycosylation, celles-ci sont sous la dépendance de l'équipement enzymatique propre à chaque lignée cellulaire et le plus souvent, la fraction glycanique des glycoprotéines recombinantes garde une information spécifique issue du système qui l'a produite.

A. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE PRODUCTION CONCURRENTS DU SYSTEME « INSECTE »

(Jenkins *et al.*, 1996)

1. Le système procaryote

Les bactéries, particulièrement *E. coli*, ont été utilisées comme système d'expression. Si elle offre bien des avantages, *E. coli* est dépourvue de l'équipement enzymatique nécessaire pour la glycosylation des protéines (Letourneur *et al.*, 1995). Ce sont donc des protéines non

glycosylées qui sont produites. De telles molécules peuvent avoir une bonne activité biologique *in vitro*, cependant elles n'ont souvent pas d'intérêt thérapeutique car, *in vivo*, leur solubilité est souvent réduite, leur demi-vie abrégée et leur antigénicité accrue par la présence de nouveaux épitopes démasqués par l'absence de glycannes.

Toutefois, des travaux ont mis en évidence chez les archéobactéries des glycoprotéines d'enveloppe (les *S-layer* glycoprotéines) porteuses de *N*- et *O*-glycannes (Sumper et Wieland, 1995). L'analyse de ces *S-layer* glycoprotéines fait apparaître une grande diversité structurale des *N*- et *O*-glycannes formés chez ces procaryotes. Néanmoins, comme chez les eucaryotes, seuls les résidus asparaginyll inclus dans le triplet consensus Asn-X-Ser/Thr peuvent être substitués par des oligosaccharides. Si l'on s'intéresse à la *S-layer* glycoprotéine de *Halobacterium halobium*, elle porte simultanément des oligosaccharides linéaires sulfatés, qui sont formés (i) d'unités pentasaccharidiques répétées (entre 10 et 15 fois), ou bien (ii) simplement d'un enchaînement linéaire d'une dizaine de copies d'un oligosaccharide sulfaté. Ces unités de répétition sont constituées de monosaccharides neutres (Glc, GlcNAc, GalNAc, ...) et d'acides uroniques quelquefois méthylés (GalA, MeOGalA, ...). Les *N*-glycannes de procaryotes étant sulfatés et renfermant des résidus d'acide uronique, ils confèrent à la *S-layer* glycoprotéine un fort caractère acide. Concernant la *O*-glycosylation des *S-layer*-glycoprotéines de *Halobacterium halobium*, elle se résume au disaccharide Glc α 1-2Gal lié *O*-glycosidiquement sur des résidus de thréonine (Figure 9, page 39).

Les archéobactéries ne sont pas les seuls procaryotes contenant des glycoprotéines endogènes. En effet, des investigations menées sur les eubactéries montrent qu'elles possèdent aussi des protéines d'enveloppe glycosylées, à chaque espèce correspondant une unité de répétition saccharidique spécifique. Récemment, des trisaccharides *O*-glycosidiquement liés sur des protéines endogènes de *Neisseria meningitidis* ont été observés (Stimson *et al.*, 1995).

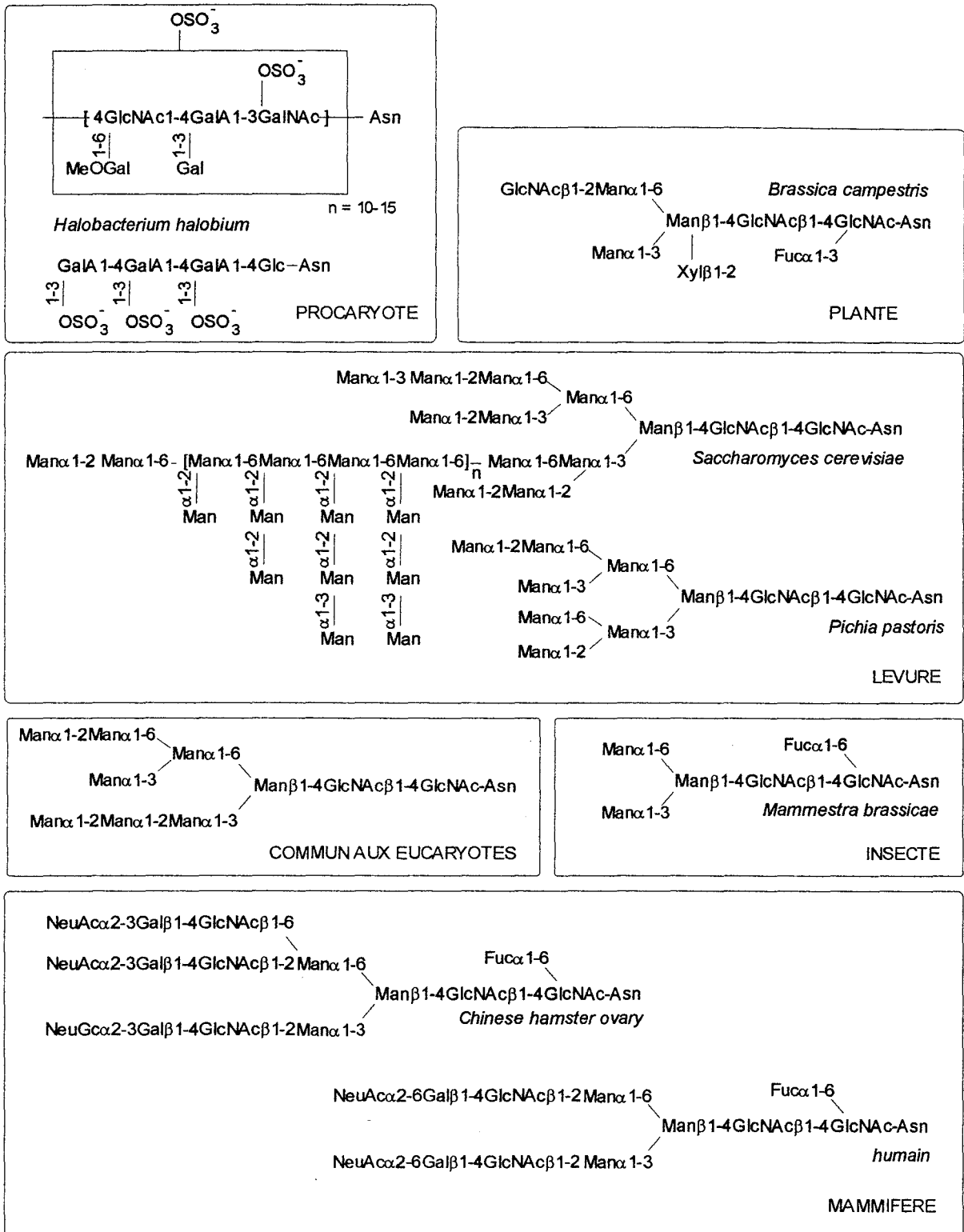


Figure 9 : Exemples de structures glycaniques rencontrées dans les différents systèmes d'expression de glycoprotéines recombinantes.

En résumé, le potentiel de glycosylation chez les procaryotes est très souvent nul, ou dans le cas contraire, les oligosaccharides formés sont très différents de ceux habituellement décrits chez les mammifères.

2. Les plantes

Les informations aujourd'hui disponibles au sujet de la glycosylation chez les plantes concernent essentiellement la *N*-glycosylation. En effet, on a pu mettre en évidence chez les végétaux deux types de glycannes *N*-liés, (i) des glycannes de type oligomannosidique dont les structures sont identiques à celles rencontrées chez les mammifères (Man_{5,9}GlcNAc₂-protéine) et, (ii) des glycannes dits biantennés (Figure 9, page 39) différant principalement de leurs homologues mammifères par l'absence d'acide sialique, la présence d'un résidu β 1,2 xylose lié au β -mannose et d'un résidu de fucose lié en α 1,3 au résidu de *N*-acétylglucosamine proximal du noyau (Faye *et al.*, 1993).

L'érythropoïétine produite dans des cellules de tabac n'a pas d'activité *in vivo*, probablement du fait d'une rapide élimination de la circulation sanguine (Matsumoto *et al.*, 1995). De plus, les particularités structurales des glycannes de plantes confèrent aux glycoprotéines produites chez les végétaux une très grande immunogénicité qui interdit pour l'instant leur usage en thérapie (Altmann *et al.*, 1993b; Ma *et al.*, 1995).

Néanmoins, il est possible d'envisager une maîtrise de la glycosylation permettant d'aboutir à des glycannes n'ayant pas subi de processus de maturation, donc dépourvus d'épitopes glycaniques. En premier lieu, on peut envisager d'utiliser le RE comme compartiment de stockage des glycoprotéines recombinantes, et ceci, (i) non seulement parce que les glycoprotéines présentent une plus grande stabilité dans le RE, (ii) mais aussi car les glycannes des glycoprotéines retenues ne seront probablement pas modifiés par les enzymes golgiens. Une seconde stratégie consiste en l'utilisation de plantes déficientes en une ou plusieurs des glycosyltransfé-

rases golgiennes responsables de la maturation des *N*-glycannes. Déjà, un mutant d'*Arabidopsis thaliana* a été isolé qui, bien que déficient en *N*-acétylglucosaminyltransférase I et ne fabriquant plus de glycannes de type "*N*-acétyllactosaminique", se développe normalement et présente un cycle végétatif complet. Ce mutant synthétise exclusivement des glycannes de type oligomannosidique, principalement Man₅GlcNAc₂-protéine (von Schaewen *et al.*, 1993). Cette étude met également en évidence le rôle clef de l'activité *N*-acétylglucosaminyltransférase I dans la biosynthèse des glycannes de type "*N*-acétyllactosaminique" chez les végétaux. Cet enzyme est maintenant une cible potentielle pour la stratégie d'inactivation de gènes dans des plantes de grandes cultures en vue de la production en masse de glycoprotéines non immunogènes.

3. Les levures

Les premières étapes de la *N*-glycosylation chez les levures apparaissent identiques à celles rencontrées chez les cellules de mammifères. Néanmoins, l'hypermannosylation est une propriété commune à la plupart des levures et compromet l'efficacité des protéines recombinantes (Herscovics et Orlean, 1993). Ces capacités d'hypermannosylation dépendent de la souche utilisée. Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* construit des polysaccharides contenant entre 50 et 150 résidus de mannose, alors que *Pichia pastoris* synthétise majoritairement des *N*-glycannes Man₈₋₁₄GlcNAc₂ (mais aussi des structures contenant jusqu'à 30 résidus de mannose) (Cregg *et al.*, 1993). Ces structures polymannosylées (Figure 9, page 39) peuvent être évitées en exprimant les protéines d'intérêt dans des souches mutantes de levures chez lesquelles la *N*-glycosylation est réduite à un noyau oligomannosidique comprenant un nombre limité de mannoses (entre 8 et 15), ce qui tend à augmenter l'activité biologique (Kniskern *et al.*, 1994; Lehle *et al.*, 1995).

Quant à la *O*-glycosylation on parlera de *O*-mannosylation, puisqu'elle se résume en l'addition sur des résidus séryl ou thréonyl de courtes chaînes linéaires constituées de résidus

de mannose (2 résidus chez *Saccharomyces cerevisiae* ; 4 résidus chez *Candida albicans*) (Lehle et Tanner, 1995). De plus, chez les levures, il semble que l'addition de *O*-glycannes sur des glycoprotéines recombinantes soit souvent effectuée sur des sites différents de ceux naturellement occupés chez les mammifères (Kalsner *et al.*, 1992).

4. Les cellules de mammifères

Les espèces les plus proches de l'homme phylogénétiquement ont théoriquement une machinerie enzymatique comparable. Néanmoins, chaque lignée cellulaire possède ses propres particularités, et la glycosylation dépend d'une part du type cellulaire utilisé et d'autre part des conditions de culture.

D'une façon générale, la plupart des lignées de mammifères expriment une α 1,3-galactosyltransférase qui est à l'origine de la formation d'un trisaccharide Gal α 1,3Gal β 1-4GlcNAc fortement antigénique (Galili *et al.*, 1988; Rother and Squinto, 1996). En effet, environ 1% des IgG circulant chez l'homme est spécifique de l'épitope Gal α 1,3Gal porté par des glycoprotéines (Castronovo *et al.*, 1987; Towbin *et al.*, 1987) ou des glycolipides (Galili *et al.*, 1984, 1985 and 1987). L'homme, mais aussi certains singes, font partie des exceptions notables chez qui le gène est devenu inactif par suite d'une mutation (Larsen *et al.*, 1990; Joziase *et al.*, 1991; Shaper *et al.*, 1992)

Si l'on s'intéresse aux lignées murines aujourd'hui disponibles, telles que les hybridomes, les hétérohybridomes murin/humain, et la lignée C127, on observe qu'elles possèdent toutes des structures terminales du type Gal α 1,3Gal β 1-4GlcNAc (Borrebaeck *et al.*, 1993; Tsuji *et al.*, 1990). En revanche, les myélomes de souris NS0 et de rat Y0 produisent des anticorps dépourvus de l'épitope α Gal terminal (Yu-Ip *et al.*, 1994; Lifely *et al.*, 1995). De plus, des différences existent en ce qui concerne le type d'acide sialique porté par les protéines synthétisées par ces systèmes d'expression murins. Comme chez les humains, les glycannes

formés par les hybridomes murins ou murin/humain sont substitués à leurs extrémités par de l'acide sialique. Cependant, alors que chez l'homme adulte le seul représentant de cette famille est l'acide *N*-acétylneuraminique (NeuAc), les anticorps produits par les hybridomes possèdent essentiellement de l'acide *N*-glycolylneuraminique (NeuGc) (Monica *et al.*, 1995). L'utilisation en thérapie de glycoprotéines recombinantes telle que la fétuine contenant 7% de NeuGc peut provoquer une réponse immunitaire du patient (Noguchi *et al.*, 1995). De plus, on a établi une corrélation entre le fort taux de NeuGc porté par une glycoprotéine chimère CT4-IgG et sa demi-vie très brève, tout ceci comparé au comportement de la même molécule chimère porteuse uniquement de NeuAc (Flesher *et al.*, 1995).

Les lignées de hamster les plus couramment utilisées sont les cellules CHO chez lesquelles le gène de l' α 1,3-galactosyltransférase n'est pas exprimé (Smith *et al.*, 1990). De plus, ces lignées synthétisent majoritairement du NeuAc mais elles gardent la capacité de synthétiser un faible taux de NeuGc (Hokke *et al.*, 1995) (Figure 9 page 39). Contrairement aux tissus humains, les cellules CHO et BHK sont déficientes en β -galactosidase α 2,6-sialyltransférase (ST6Gal I) et synthétisent exclusivement des structures dont l'acide sialique terminal est branché en α 2,3 sur le motif Gal β 1-4GlcNAc. Il faut noter cependant que la lignée CHO a pu être modifiée génétiquement par transfection, ce qui a permis l'obtention de lignées exprimant des protéines recombinantes possédant à la fois des acides sialiques branchés en α 2,3 et en α 2,6 (Lee *et al.*, 1989; Grabenhorst *et al.*, 1995).

L'utilisation de lignées cellulaires humaines pour la production de glycoprotéines recombinantes a été envisagée, bien que l'obtention d'une lignée humaine stable soit difficile et que cette adaptation peut entraîner des modifications de leur potentiel de glycosylation. Un des principaux obstacles à l'utilisation de lignées humaines reste la purification des glycoprotéines produites, puisque la barrière des espèces n'existant plus dans ce cas, il y a un risque de contamination virale des patients. Néanmoins, les premières investigations menées avec une

lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (lignée Namalwa) ont montré que les *N*- et *O*-glycannes portés par l'activateur du plasminogène recombinant (tPA) étaient semblables à ceux existant sur la glycoprotéine naturelle (Khan *et al.*, 1995).

En ce qui concerne les glycoprotéines produites dans le lait d'animaux transgéniques, il est probable que leur glycosylation soit le reflet des capacités de glycosylation de l'espèce animale qui les a produites. Par conséquent, on envisage de remodeler *in situ* les glycannes des glycoprotéines recombinantes par l'expression directe de glycosyltransférases dans la glande mammaire de ces animaux.

B. LES CELLULES DE LEPIDOPTERES ET LE SYSTEME BACULOVIRUS / CELLULES D'INSECTES

Les protéines exprimées dans les cellules d'insectes présentent dans une grande majorité des cas, des activités biologiques semblables à celles de protéines natives : activité enzymatique, antigénicité, immunogénicité, ... De nombreux antigènes viraux sont ainsi produits à partir de baculovirus. A quelques exceptions près, les protéines sont solubles et possèdent une conformation identique à celle des protéines natives, ce qui implique un repliement et la formation de ponts disulfures correctement réalisés (Luckow, 1990).

Les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer les modifications post-traductionnelles semblables à celles des vertébrés. Elles reconnaissent les peptides signaux homologues et hétérologues et les protéines matures sont excrétées dans le milieu de culture. De la même façon, les signaux d'adressage aux différents compartiments cellulaires sont reconnus tels que les adressages nucléaire, cytoplasmique ou membranaire. Les protéines produites sont phosphorylées, myristilées, palmitylées, farnesylées, carboxyméthylées, amidées ou acétylées correctement. Les assemblages et la formation de ponts disulfures se font de manière correcte dans les cellules de lépidoptères (Devauchelle et Cerutti, 1993).

Un des points importants concerne la glycosylation des cellules d'insectes et particulière-

ment celle des lignées cellulaires de lépidoptères pouvant être infectées par le baculovirus. Différentes stratégies ont été mises en oeuvre afin de mieux connaître le potentiel de *N*- et de *O*-glycosylations des lignées d'insectes, (i) une première approche consiste à analyser la structure des *N*- et *O*-glycannes portés par les glycoprotéines recombinantes produites dans le système baculovirus / cellules d'insectes, on possède alors toutes les informations sur le produit final formé, (ii) toutefois il peut paraître plus judicieux d'étudier les glycannes et des activités glycosyltransférasiques propres aux cellules de lépidoptères, en dehors de tout «stress» provoqué par l'infection virale et la surproduction tardive d'une protéine à glycosyler.

1. La *N*-glycosylation

De nombreuses études ont tenté d'élucider la structure des *N*-glycannes portés par des glycoprotéines exprimées dans différentes cellules d'insectes, principalement *Spodoptera frugiperda* 9, en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression. Les *N*-glycannes retrouvés sont essentiellement de type oligomannosidique ($\text{Man}_{9-5}\text{GlcNAc}_2$), et sont identiques aux structures décrites dans le RER des cellules de mammifères (Figure 9, page 39). D'autres structures sont également observées, ces dernières provenant probablement du catabolisme de glycannes dont la maturation s'est poursuivie dans l'appareil de Golgi. Elles forment une famille de petites structures tronquées, fréquemment porteuses d'un résidu de fucose lié en $\alpha 1,6$ sur le résidu de *N*-acétylglucosamine impliqué dans la liaison *N*-glycosidique ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$) (Kuroda *et al.*, 1986a; Jarvis and Summers, 1989; Kuroda *et al.*, 1989; Kuroda *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Wathen *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991; Noteborn *et al.*, 1992; Veit *et al.*, 1993; Voss *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1993; Manneberg *et al.*, 1994; Ponimaskin *et al.*, 1994). De plus, une petite proportion de structures hybrides contenant un unique résidu de *N*-acétylglucosamine en position terminale a été mis en évidence sur l'interleukine-3 murine exprimée dans des larves de *Bombix mori* (Hogeland et

Deinzer, 1994) et récemment, une analyse par spectrométrie de masse à désorption laser (MALD-MS) des *N*-glycopeptides issus de l'interféron γ humain produit dans la lignée cellulaire d'insecte *Estigmaena acrea* a permis de mettre en évidence des *N*-glycannes de type hybride et de type *N*-acétyllactosaminique possédant des résidus de *N*-acétylglucosamine et de galactose en position terminale non réductrice (Ogonah *et al.*, 1996). En revanche, un seul groupe a montré que le plasminogène humain recombinant produit dans les lignées de lépidoptères *Spodoptera frugiperda* 21 et *Mamestra brassicae* en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression, pouvait être porteur de glycannes de type *N*-acétyllactosaminique bi, tri- et tétra-antennés avec des résidus d'acide sialique en position terminale (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a et 1991b). Cette même équipe explique en partie ces résultats surprenants par le fait que l'infection par le baculovirus commanderait dans ces cellules la maturation des structures oligomannosidiques en structures de type *N*-acétyllactosaminique en se basant sur le fait que le baculovirus activerait l' α -mannosidase II qui est une enzyme clef dans la transformation des *N*-glycannes de type oligomannosidique en forme hybride (Davidson *et al.*, 1991). Néanmoins, ces résultats sont fortement controversés, d'autres travaux ayant montré que l'infection par le baculovirus n'influence pas qualitativement la voie de biosynthèse des *N*-glycannes chez *Spodoptera frugiperda* 9 et par conséquent n'induit, pas la synthèse de *N*-glycannes de type *N*-acétyllactosaminique (Kretzschmar *et al.*, 1994).

L'étude des glycoprotéines endogènes d'insectes prouve que ces dernières sont totalement dépourvues de glycannes de type *N*-acétyllactosaminique (Butters and Hughes, 1981; Hsieh and Robbins, 1984; Williams *et al.*, 1991) mais peuvent porter des oligosaccharides possédant des résidus de *N*-acétylglucosamine ou de *N*-acétylgalactosamine en position terminale non réductrice (Hard *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994). Une autre façon d'aborder la question du potentiel de glycosylation des lignées cellulaires de lépidoptères est de

s'intéresser aux différentes activités glycosyltransférasiques exprimées dans ces cellules. Des travaux ont donc porté sur la mesure des activités enzymatiques charnières qui catalysent la transformation des *N*-glycannes de type oligomannosidique en structures hybrides : la *N*-acétylglucosaminyltransférase I, la α -mannosidase II et la *N*-acétylglucosaminyltransférase II. Il s'est effectivement avéré que les lignées *Bombix mori*, *Mamestra brassicae* et *Spodoptera frugiperda* 21 et 9, possèdent une faible activité β 1,2-*N*-acétylglucosaminyltransférase I (Altmann *et al.*, 1993a; Velardo *et al.*, 1993) et une activité α -mannosidase II (Altmann and März, 1995). Quant à l'activité β 1,2-*N*-acétylglucosaminyltransférase II indispensable à la formation de structures de type *N*-acétyllactosaminique, son activité chez les cellules d'insectes s'est révélée trop faible pour être prise en compte. Toutefois, des phénomènes de maturation des *N*-glycannes existent chez les insectes. Ainsi, un nouvel enzyme a été mis en évidence au sein des lignées *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda* et *Mamestra brassicae*. Cette β 1,4-*N*-acétylgalactosaminyltransférase catalyse le transfert d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine sur les *N*-glycannes hybrides, porteurs à leur extrémité d'un résidu de *N*-acétylglucosamine (Van Die *et al.*, 1996). De plus, il est intéressant de signaler que les lignées *Bombix mori* et *Spodoptera frugiperda* 9 sont capables de transférer du fucose en α 1,6 sur le résidu de *N*-acétylglucosamine du point d'attache des *N*-glycannes et, que la lignée *Mamestra brassicae* exprime deux activités α 1,6- et α 1,3-fucosyltransférasiques (Staudacher *et al.*, 1992b). Ceci explique la présence de courtes structures mono (α 1,6 ou α 1,3) et difucosylées (α 1,6 et α 1,3) sur les *N*-glycannes endogènes de la lignée *Mamestra brassicae*, alors que l'analyse des structures présentes chez *Bombix mori* et *Spodoptera frugiperda* 21 révèle uniquement des structures mono-fucosylées en α 1,6 (Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994). Des résidus de fucose liés en α 1,3 ont déjà été retrouvés aussi bien dans les *N*-glycannes de plantes que dans les *N*-glycannes de la phospholipase A₂ du miel d'abeille (Staudacher *et al.*,

1992a). Toutefois, les *N*-glycannes porteurs d'un résidu de fucose α 1,3-lié à la *N*-acétylglucosamine du point d'attache n'existent pas chez l'homme. Ils pourraient provoquer une réponse immunitaire des patients traités par des protéines porteuses de ces épitopes.

2. La *O*-glycosylation

L'attention des groupes impliqués dans l'élucidation des capacités de glycosylation du système baculovirus / cellules d'insectes a été principalement attirée par l'étude de la *N*-glycosylation des lignées de lépidoptères. Cela explique le fait que peu d'investigations aient été menées sur la *O*-glycosylation de ces lignées. Ce relatif désintérêt est probablement dû au fait que les *O*-glycannes d'insectes identifiés à ce jour sont essentiellement des structures simples, réduites au noyau (GalNAc ou *core* 1), sans squelette ni sucre périphérique. Une des premières approches a consisté en la comparaison des *O*-glycannes portés par une glycoprotéine recombinante, la gp50, qui est une protéine de l'enveloppe du *pseudorabies virus*, produite simultanément par la lignée d'insecte *Spodoptera frugiperda* 9, et par deux lignées de mammifères Vero et CHO. Les sites de *O*-glycosylation des gp50 exprimées dans les cellules de mammifères sont exclusivement substitués par le disaccharide Gal β 1-3GalNAc porteur de un ou deux résidus d'acide sialique. En revanche, les sites de *O*-glycosylation de la gp50 exprimée dans le système baculovirus-*Spodoptera frugiperda* 9 sont essentiellement occupés par un unique résidu de *N*-acétylgalactosamine (antigène-Tn) et pour une très faible partie par le disaccharide Gal β 1-3GalNAc. De plus, il faut noter que les *O*-glycannes de la gp50 exprimée chez l'insecte ne sont jamais porteurs de résidus d'acide sialique (Thomsen *et al.*, 1990). Depuis lors, l'observation selon laquelle les antigènes Tn et T sont les deux seuls *O*-glycannes synthétisés par les insectes a été confirmée par d'autres travaux, comme par exemple l'analyse des *O*-glycannes portés par la *chimeric respiratory syncytial virus protein* exprimée

chez *Spodoptera frugiperda* 9 (Wathen *et al.*, 1991), ou encore ceux présents sur l'interleukine 2 humaine porteuse de deux sites artificiels de *O*-glycosylation et produite par *Spodoptera frugiperda* 21 (Grabenhorst *et al.*, 1993).

La comparaison entre le potentiel de *O*-glycosylation des lignées cellulaires de mammifères Vero et CHO, et celui de la lignée de lépidoptère *Spodoptera frugiperda* 9 ne s'est pas limitée à l'étude des structures glycaniques formées par ces systèmes respectifs. En effet, Thomsen *et al.* (1990) ont mesuré dans les trois lignées cellulaires les activités enzymatiques successives responsables de la synthèse des antigènes Tn et T : la peptidyl *N*-acétylgalactosaminyltransférase et la β 1,3-galactosyltransférase. Ainsi, les auteurs ont constaté que l'activité polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférase était similaire dans les trois lignées, mais comme l'analyse structurale le laissait supposer, l'activité β 1,3-galactosyltransférase était extrêmement faible dans les cellules de lépidoptère.

3. Les tentatives de correction de la glycosylation des insectes

L'absence au sein des lignées d'insectes de glycosyltransférases essentielles pour la maturation des *N*-glycannes ou pour l'élongation des structures *O*-glycaniques est responsable des glycosylations aberrantes présentes sur les glycoprotéines recombinantes produites chez l'insecte, ce qui risque de limiter leur utilisation en thérapie humaine. En effet, injectées dans la circulation sanguine, ces molécules auraient très probablement (i) un temps de demi-vie court ce qui, tout en diminuant leur activité *in vivo*, augmenterait le coût du traitement et, (ii) il est à craindre que ces mêmes molécules provoqueraient une réponse immunitaire chez le patient, induite par des épitopes peptidiques normalement masqués par les glycannes naturellement présents, ou encore par des glycannes d'insecte qui pourraient se révéler immunogènes.

De nombreuses glycosyltransférases intervenant dans la maturation des *N*-glycannes ayant été clonées chez les mammifères, des tentatives pour compléter l'équipement enzymatique de la lignée *Spodoptera frugiperda* ont été conduites en utilisant le baculovirus comme vecteur de transfert. Ainsi, la transfection de cellules de *Spodoptera frugiperda* 9 avec un baculovirus vecteur de l'expression de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I humaine a permis de tripler son activité dans cette lignée. De plus, la cotransfection au sein de la lignée *Spodoptera frugiperda* 9 d'un baculovirus vecteur de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I humaine avec un second virus porteur du gène d'une *N*-glycoprotéine HA (*fowl plague virus hemagglutinin*) a permis de quadrupler la quantité de résidus de *N*-acétylglucosamine en position terminale présents sur la HA recombinante. Cette augmentation est due à une plus grande quantité de structures hybrides (GlcNAcMan₃GlcNAc₂) présentes sur la molécule (Wagner, 1996). Ces travaux prouvent ainsi qu'une glycosyltransférase humaine peut être active chez l'insecte, et faire évoluer les glycannes portés par les glycoprotéines recombinantes produites dans ce système d'expression.

L'ensemble des *N*-glycosyltransférases dites terminales étant absentes dans les cellules d'insectes, une récente publication a traité des conséquences de l'expression directe dans la lignée *Spodoptera frugiperda* 9 de la β 1,4-galactosyltransférase bovine, et ceci sans avoir préalablement induit une surproduction des structures acceptrices par la coexpression des gènes de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I ou II (Jarvis et Finn, 1996). Cette tentative de modifier la voie de biosynthèse des *N*-glycannes d'insectes a débuté par la construction d'un nouveau baculovirus capable d'exprimer un gène hétérologue en phase précoce de l'infection, sous le contrôle du promoteur du gène *ie1* (Jarvis *et al.*, 1996). Ce vecteur permet donc l'expression d'enzymes de maturation dès le début de l'infection. Ces glycosyltransférases terminales pourraient ainsi contribuer au processus de maturation des glycannes portés par la glycoprotéine d'intérêt dont le gène n'est exprimé qu'en phase tardive de l'infection. Pour

vérifier cette hypothèse, l'ADNc de la β 1,4-galactosyltransférase bovine a été cloné en aval du promoteur ie1, et des cellules de *Spodoptera frugiperda* 9 ont alors été infectées avec cette nouvelle espèce de baculovirus recombinant. L'activité de la β 1,4-galactosyltransférase a été détectée 4 heures après l'infection et augmente pour atteindre un plateau 12 heures après l'infection. 24 heures après l'infection par le baculovirus exprimant une glycoprotéine d'enveloppe la gp64, la nature des glycanes substituant cette glycoprotéine virale a été déterminée sur la base de leurs interactions avec un ensemble de lectines végétales. C'est ainsi que les auteurs ont démontré que l'expression préalable de la β 1,4-galactosyltransférase dans la cellule d'insecte était responsable de la fixation, sur les glycanes de la gp64, de la lectine RCA spécifique du galactose en position terminale. Ce résultat démontre dans ce cas, que des glycanes de la gp64 sont substitués par des résidus de galactose.

Ces résultats obtenus après l'expression dans les cellules d'insectes de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I ou de la β 1,4-galactosyltransférase, laissent entrevoir une possible maîtrise de la *N*-glycosylation dans les cellules d'insectes.

IV. SUJET DU PRESENT TRAVAIL

A. AVANT PROPOS

L'étude du potentiel de glycosylation des cellules d'insectes a réuni la société *PROTEINE PERFORMANCE* et la Station de Pathologie Comparée *INRA / URA* du *CNRS n° 1184* (S^t Christol-les-Alès), toutes deux spécialisées dans l'expression de protéines recombinantes en cellules d'insectes utilisant la technologie développée par le Professeur Gérard DEVAUCHELLE, et le Laboratoire de Chimie Biologique de l'*Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR du CNRS n°111* dirigé par le Professeur André VERBERT.

Ce projet a bénéficié depuis le 1 juillet 1993 jusqu'au 30 juin 1996 du soutien de l'*Association Nationale de la Recherche Technique* au travers d'une convention *CIFRE* (n°64/93).

B. EXPOSE DE LA PROBLEMATIQUE

Comme nous venons de le voir dans la partie d'introduction, et malgré les travaux récents effectués sur ce sujet (travaux qui n'étaient pas publiés au début de notre étude), la *N*-glycosylation chez les insectes demeure encore mal connue, mais les différents éléments structuraux qui ont été décrits, montrent la prédominance de glycanes de type oligomannosidique.

Peu de travaux ont tenté à ce jour de déterminer les capacités de *O*-glycosylation des cellules d'insectes. Cela est sûrement dû au fait que les premières investigations menées sur la lignée cellulaire *Spodoptera frugiperda* 9 montrent que leur potentiel de *O*-glycosylation est très déficient par rapport à la grande diversité structurale des *O*-glycanes de mammifères. En effet, la *O*-glycosylation chez *Spodoptera frugiperda* 9 se résume à la synthèse de deux petites structures : (i) un unique résidu de *N*-acétylgalactosamine (antigène-Tn) et, (ii) dans une

moindre mesure au disaccharide Gal β 1-3GalNAc (antigène-T).

Au cours de nos travaux, nous nous sommes attachés à définir les potentiels de glycosylation des lignées cellulaires d'insectes détenues par la société *PROTEINE PERFORMANCE* et la Station de Pathologie Comparée *INRA / URA* du *CNRS n° 1184* (S^t Christol-les-Alès).

La réponse à cette question est essentielle pour maîtriser l'expression hétérologue des glycoprotéines en cellules d'insectes, en particulier dans le cas de glycoprotéines d'intérêt thérapeutique.

Pour cela, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur des cellules saines, non infectées par le baculovirus, cultivées dans un milieu sans sérum de veau foetal (milieu BM-25) et de déterminer la nature des glycannes substituant les glycoprotéines cellulaires sur la base de leurs interactions avec un ensemble de lectines végétales de spécificité définie (Tableau II, page 54). La fixation de ces lectines a été déterminée après séparation électrophorétique des glycoprotéines cellulaires et transfert sur membrane de nitrocellulose.

Nous avons donc analysé plus de vingt clones cellulaires de *Spodoptera frugiperda* 9, de *Mamestra brassicae*, de *Spodoptera littoralis*, de *Spodoptera littura* et de *Trichoplusia ni* cultivés dans un milieu sans sérum de veau foetal développé par la société *PROTEINE PERFORMANCE* (milieu BM-25). Cette approche nous a permis de sélectionner trois clones présentant les meilleurs potentiels de glycosylation. En particulier, nous avons pu mettre en évidence que les oligosaccharides portés par certaines glycoprotéines de *Mamestra brassicae* sont substitués par des résidus de galactose en position terminale. D'autre part, les clones *Spodoptera frugiperda* 9 et *Trichoplusia ni*, expriment des *O*-glycosylprotéines substituées par des glycannes du type 1 : Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr. Signalons que jamais nous n'avons observé de liaisons entre des glycoprotéines d'insecte et les lectines spécifiques des résidus d'acide sialique (SNA, MAA).

Tableau II. Spécificité des lectines utilisées pour la caractérisation des glycanes substituant les glycoprotéines endogènes des lignées cellulaires d'insectes.

Nom	Origine	Spécificité (séquence terminale)	Référence
GNA	<i>Galantus nivalis</i>	Man α 1-3Man > Man α 1-6Man > Man α 1-2Man	Shibuya <i>et al.</i> , 1988
DSA	<i>Datura stramonium</i>	Gal β 1-4GlcNAc ; GlcNAc(β 1-4GlcNAc) ₂	Crowley <i>et al.</i> , 1984
RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i>	β -Gal > α -Gal	Olsnes <i>et al.</i> , 1974.
SBA	<i>Glycine max</i>	α/β -GalNAc	Lotan <i>et al.</i> , 1974
AAA	<i>Aleuria aurantia</i>	L-Fuc α 1-6GlcNAc	Debray et Montreuil 1989
PNA	<i>Arachis hypogaeae</i>	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser	Lotan <i>et al.</i> , 1975
BSI-B ₄	<i>Bandeiaerea simplicifolia</i>	Gal α 1-3/4Gal	Hayes <i>et al.</i> , 1974
	lectin I isolectin B ₄		Murphy et Goldstein, 1977
			Wu <i>et al.</i> , 1995
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	NeuAc α 2-3Gal	Wang et Cummings, 1988
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuAc α 2-6Gal/GalNAc	Shibuya <i>et al.</i> , 1987

Au vu de ces résultats préliminaires, le fil conducteur de nos investigations a été l'identification des *N*- et *O*-oligosaccharides pouvant contenir des résidus de galactose principalement au sein de la lignée *Mamestra brassicae*.

Premièrement, nous nous sommes intéressés aux structures *N*-glycanniques portées par une glycoprotéine modèle : la lactoferrine bovine produite dans *Mamestra brassicae* en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression. En second lieu, nous avons porté notre attention sur la *O*-glycosylation des lignées d'insectes saines, *Spodoptera frugiperda* 9, *Mamestra brassicae* et *Trichoplusia ni*. Les lignées n'ont pas été infectées par le baculovirus afin d'éviter toutes les interférences que pourraient provoquer l'infection virale et la forte production de protéine recombinante sur le potentiel de glycosylation des lignées cellulaires d'insectes. L'évaluation

du potentiel de *O*-glycosylation de ces trois lignées de lépidoptères cultivées chacune dans deux milieux sans sérum de veau foetal (BM 25 et EX-CELL 401™) a été réalisée (i) en observant la fixation de lectines spécifiques et, (ii) par la mesure des activités *O*-glycosyltransférasiques impliquées dans la synthèse des structures *O*-glycanniques décrites à ce jour chez les lépidoptères. De plus, nous avons également observé que la composition du milieu de culture influence le potentiel de glycosylation des lignées cultivées.

Finalement, l'étude de la *O*-glycosylation nous a conduit à caractériser une nouvelle activité α 1,4-galactosyltransférasique. Ce nouvel enzyme a fait l'objet d'une étude détaillée de sa spécificité d'action et de l'analyse structurale de l'oligosaccharide formé.

RESULTATS

I - LE POTENTIEL DE N-GLYCOSYLATION DE NOS LIGNEES

Suite à une première analyse des glycanes, basée sur la fixation spécifique de lectines sur les glycoprotéines cellulaires des différentes lignées de lépidoptères détenues par *PROTEINE PERFORMANCE* et l'*INRA* de St Christol-les-Alès, la lignée *Mamestra brassicae* nous a semblé présenter une capacité de glycosylation supérieure à celle des autres lignées cellulaires. En effet, *Mamestra brassicae* et tout particulièrement le clone SPCMb-92-C6 possède des glycoprotéines endogènes dont les glycanes fixent les lectines RCA et BSI-B₄, spécifiques respectivement des résidus de β -galactose en position terminale et des disaccharides Gal α 1-3/4Gal (Tableau II page 54).

Ces structures galactosylées en position terminale non-réductrice étant généralement décrites sur les *N*-glycanes de type *N*-acétyllactosaminique des mammifères, nous nous sommes intéressés aux *N*-glycanes portés par la lactoferrine bovine recombinante produite par *Mamestra brassicae* en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression.

Le choix de la lactoferrine bovine, glycoprotéine sécrétée de 689 acides aminés (\approx 80kDa), a été conditionné par la parfaite connaissance des glycanes substituant la glycoprotéine naturelle. En effet, les travaux menés par l'équipe du Professeur Geneviève Spik (Coddeville *et al.*, 1992; Spik *et al.*, 1993) ont montré que dans la lactoferrine naturelle, les sites Asn₂₃₃ et Asn₅₄₅ renferment spécifiquement des glycanes de type oligomannosidique, alors que le site Asn₄₇₆ porte exclusivement des oligosaccharides de type de type *N*-acétyllactosaminique.

Quant aux conditions de culture choisies pour l'expression de la lactoferrine bovine dans le clone SPCMb-92-C6, nous avons opté pour celles habituellement utilisées en production par la société *PROTEINE PERFORMANCE*, afin de juger des potentialités de glycosylation de l'ensemble du système développé à St Christol-les-Alès. Par conséquent, la production de la lactoferrine bovine recombinante a été effectuée à 28°C en milieu agité, les cellules étant en suspension

dans 15 litres de milieu BM-25 (milieu sans sérum mis au point à l'INRA de S^t Christol-les-Alès par J.M. Quiot). L'infection par le baculovirus recombinant a été réalisée à une densité cellulaire de 0.75×10^6 cellules par ml, avec une multiplicité d'infection (MOI) égale à 5.

Après purification d'environ 100 mg de lactoferrine bovine recombinante produite dans *Mamestra brassicae*, nous avons mis en oeuvre différentes techniques de spectrométrie de masse (CG-MS, MALD, ES-MS, ES-MS-MS) combinées à la RMN du proton afin de déterminer la microhétérogénéité des *N*-glycannes présents sur les sites de glycosylation Asn₂₃₃, Asn₅₄₅ et Asn₄₇₆. Cette étude vous est détaillée dans la publication qui suit, intitulée : *Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in Mamestra brassicae cells.*

**MICROHETEROGENEITY OF THE OLIGOSACCHARIDES CARRIED BY
THE RECOMBINANT BOVINE LACTOFERRIN EXPRESSED
IN *MAMESTRA BRASSICAE* CELLS**

Michel Lopez^{1,2}, Bernadette Coddeville¹, James Langridge³, Yves Plancke¹, Pierre Sautière⁴, Hassan Chaabihi², Frédéric Chirat¹, Anne Harduin-Lepers¹, Martine Cerutti⁵, André Verbert¹ and Philippe Delannoy^{1*}.

¹*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

²*Société Protéine-Performance, route d'Alès, F-30380 Saint Christol-les-Alès, France*

³*Micromass UK Limited, 3 Tudor Road, Altrincham, Cheshire, WA14 5RZ, United Kingdom.*

⁴*Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1309, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille, France.*

⁵*Station de Pathologie Comparée INRA / Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1184, route d'Alès, F-30380 Saint Christol-les-Alès, France.*

* To whom all correspondence should be addressed at: Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Telephone number: (33).03.20.43.69.23; Fax number: (33).03.20.43.65.55; e-Mail address: delannoy@pop.univ-lille.fr

Running title: *N*-glycosylation of bLF expressed in *Mamestra brassicae* cells.

Keywords: Baculovirus vector / Bovine lactoferrin / Insect cell / *Mamestra brassicae* / *N*-glycosylation.

Abstract

The development of therapeutic glycoprotein production using the baculovirus expression system is depending on the ability of insect cell lines to reproduce site specific mammalian-like *N*-glycans. A combination of $^1\text{H-NMR}$ and mass spectrometry techniques (MALD-MS, ES-MS and CID-MS-MS) allowed us to elucidate the *N*-linked oligosaccharides microheterogeneity on three different *N*-glycosylation sites Asn_{233} , Asn_{476} and Asn_{545} of a baculovirus-expressed recombinant bovine lactoferrin produced in *Mamestra brassicae*. Two families of *N*-glycan structures have been found: first, oligomannosidic glycans ($\text{Man}_9\text{-}_5\text{GlcNAc}_2$) and secondly, short truncated partially fucosylated glycans ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$). These results indicate that *Mamestra brassicae* cell line is not able to synthesize complex *N*-glycans, even if an $\alpha 1,6$ -linked fucose residue is frequently present onto the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine residue of short truncated structures. Nevertheless, we have shown that *Mamestra brassicae* ensures the same *N*-glycosylation pattern as found onto natural bovine lactoferrin showing the same distribution between complex and high-mannose type glycans on the different glycosylation sites. Sites which are naturally occupied by high-mannose glycans (Asn_{233} and Asn_{545}) are substituted essentially by the same type of *N*-glycans in the recombinant counterpart, and the site Asn_{476} which carries sialylated complex type chains in the natural glycoprotein, is substituted by short truncated partially fucosylated chains in *Mamestra brassicae*-expressed bovine lactoferrin. These various results lead us to the conclusion that bovine lactoferrin is an interesting model to determine the potential of glycosylation of the baculovirus / insect cell expression systems.

Abbreviations

bLF, bovine Lactoferrin; CID-MS-MS, Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry; 1D, one Dimensional; 2D, two Dimensional; Dol, Dolichol; ES-MS, Electrospray Mass Spectrometry; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GC, Gas Chromatography; GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Hex, Hexose; HexNAc, Hexosamine; ¹H-NMR, Proton Nuclear Magnetic Resonance; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; MALD-MS, Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry; Man, Mannose; *Mb*, *Mamestra brassicae*; nbLF, natural bovine Lactoferrin; pFU, plaque Forming Units; PNGase F, Peptide:*N*-Glycosidase F; rbLF, recombinant bovine Lactoferrin; RER, Rough Endoplasmic Reticulum.

Introduction

In recent years, the development of the therapeutic glycoprotein production using the baculovirus expression system in insect cells (for reviews see: Kang, 1988; Luckow and Summers, 1988; Miller, 1988; O'Reilly *et al.*, 1994) has stimulated concerns to determine the post-translational modifications capacity and in particular the glycosylation potential, of insect cells. In fact, it is now well established that protein bound carbohydrate side chains play important roles on the physico-chemical properties and functions of glycoproteins such as antigenicity, proper folding, solubility and biological half life (Klenk, 1990; Takeuchi and Kobata, 1991; Munk *et al.*, 1992). Oligosaccharides play also a role in biological recognition processes such as secretion, targeting of glycoproteins to different subcellular compartments, cell-cell adhesion, tissue targeting and tissue organization (Olden *et al.*, 1982; Elbein, 1987; Rademacher *et al.*, 1988; Branley *et al.*, 1990; Jarvis *et al.*, 1990; Springer and Lasley, 1991; Kobata, 1992; Lis and Sharon, 1993; Varki, 1993; Wojczyk *et al.*, 1995).

Nowadays, the *N*-glycans biosynthesis pathway in mammalian cells is well defined (Kornfeld and Kornfeld 1985; Schachter, 1991). The biosynthesis of *N*-linked oligosaccharides begins with the synthesis of a lipid linked oligosaccharide moiety (Glc₃Man₉GlcNAc₂PPDo1) that is transferred onto the nascent polypeptide chain in the rough endoplasmic reticulum (RER). The oligosaccharidic chain is transferred onto an asparagine residue at the tripeptide recognition sequence Asn-X-Ser/Thr. A series of trimming reactions is then catalyzed by glucosidases and mannosidases in the RER and in the Golgi apparatus that generate *N*-glycans of high mannose type (Man₉₋₅GlcNAc₂). The *N*-glycan biosynthesis proceeds in the Golgi apparatus with the action of glycosyltransferases (*N*-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, galactosyl-, sialyltransferases) producing *N*-glycans of hybrid and complex types. Number of glycoproteins which contain more than one *N*-glycan site, carry different *N*-glycan structures at each recognition sequence.

In addition to the glycoprotein heterogeneity, it often appears a microheterogeneity of the oligosaccharide structures attached to each glycosylation site which depends mainly on the origin of the cell line (Rademacher *et al.*, 1988; Goochee *et al.*, 1991; Furukawa and Kobata, 1992; Lis and Sharon, 1993; Jenkins, 1995)

Compared to the informations available on the structure and biosynthesis of mammalian *N*-glycans, our knowledge on those from insect cells appears somewhat fragmentary. Studies of *N*-oligosaccharide structures of recombinant glycoproteins expressed by lepidopteran cells using baculovirus vector have revealed that the *N*-linked oligosaccharides found are essentially of high-mannose type and short truncated structures frequently with a fucose residue α 1,6-linked to the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine residue (Kuroda *et al.*, 1986; Jarvis and Summers, 1989; Kuroda *et al.*, 1989, Kuroda *et al.* 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Wathen *et al.*, 1991, Williams *et al.*, 1991; Noteborn *et al.*, 1992; Grabenhorst *et al.*, 1993; Veit *et al.*, 1993; Voss *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1993; Manneberg *et al.*, 1994; Ponimaskin *et al.*, 1994). However, a small proportion of hybrid structures with one terminal *N*-acetylglucosamine residue has been found in mouse recombinant interleukin-3 produced in *Bombix mori* larva (Hogeland and Deinzer, 1994) and recent data have even suggested that an insect cell line *Estigmene acrea* is able to synthesize hybrid or complex *N*-glycans with *N*-acetylglucosamine and galactose residues at the *N*-oligosaccharidic sites of the recombinant human interferon γ (Ogonah *et al.*, 1996). In contrast, only one group has reported that recombinant human plasminogen carries complex type *N*-glycans with terminal sialic acid residues when expressed by a baculovirus vector in *Spodoptera frugiperda* 21 or *Mamestra brassicae* (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a and 1991b).

Endogenous *N*-glycan structures found in insect cell glycoproteins have no complex type glycans (Butters and Hughes, 1981; Hsieh and Robbins, 1984; Williams *et al.*, 1991) but small

amount of oligosaccharides have terminal *N*-acetylglucosamine or *N*-acetylgalactosamine residues (Hard *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.* 1994). Moreover, it has been possible to detect low level of β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I activity (Altmann *et al.*, 1993; Verdalo *et al.*, 1993) and α -mannosidase II activities (Altmann and März, 1995) in *Bombix mori*, *Mamestra brassicae* and *Spodoptera frugiperda* 21 and 9, and recently, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda* and *Mamestra brassicae* were shown to have a β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase enzymatic activity catalyzing the transfer of GalNAc residues to oligosaccharides carrying a terminal β -linked GlcNAc residue (Van Die *et al.*, 1996). *N*-glycans from honeybee phospholipase A₂, as well as membrane bound glycoproteins of *Spodoptera frugiperda* 21, *Mamestra brassicae* and *Bombix mori* were shown to contain fucose residues α 1,6- or α 1,3-linked to the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine residue. In addition, some of these glycans are difucosylated in α 1,6- and α 1,3-linkages onto the same asparagine-bound *N*-acetylglucosamine residue. Remarkably, glycoproteins isolated from *Mamestra brassicae* cells contain α 1,3-fucosylated glycans, predominantly in difucosylated form (Staudacher *et al.*, 1992a, Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994). Finally, data have revealed distinct fucosylation potentials in the three different cell lines: *Mamestra brassicae* is able to transfer fucose into α 1,6- and α 1,3-linkages whereas *Bombix mori* and *Spodoptera frugiperda* 9 transfer fucose residues only in α 1,6-linkage (Staudacher *et al.*, 1992b).

In summary, insect cell lines are able to carry out *N*-glycosylation of recombinant glycoproteins but *N*-glycan structures found at each glycosylation site are often different from those occurring in the corresponding natural glycoprotein. These data raise several questions: (i) Do insect cell lines synthesize complex *N*-glycans, as it has been shown by Davidson *et al.* on recombinant human plasminogen expressed in *Spodoptera frugiperda*-9 and *Mamestra brassicae*? (ii) Where is the *N*-glycosylation pathway aborted during the expression of the

recombinant glycoprotein? (iii) How does an insect cell line process the differently *N*-glycosylation sites of the same recombinant glycoprotein? In order to answer these questions, we have determined the nature of the *N*-glycans chains occurring at each glycosylation site of the recombinant bovine Lactoferrin (rbLF) produced in the lepidopteran cell *Mamestra brassicae*. The natural bLF (nbLF), which has been extensively studied in our laboratory, has five potential sites of *N*-glycosylation but no *O*-glycosylation site. Among the potential *N*-glycosylation sites, only four are occupied by *N*-glycans. The consensus sites at Asn₂₃₃ and Asn₅₄₅ are substituted exclusively by high-mannose type oligosaccharides, while Asn₄₇₆ carries predominantly complex type glycans and the site Asn₃₆₈ is occupied by both types of structure (Coddeville *et al.*, 1992; Spik *et al.*, 1993). Therefore, a simple site by site microheterogeneity comparison between both nbLF and rbLF, allowed us to know whether (iv) the *Mamestra brassicae* cell line was able to reproduce on the rbLF, the *N*-glycosylation pattern found in nbLF, or not.

As a first step, we have studied the *N*-linked chains of the complete rbLF by analyzing the monosaccharides composition and molar ratios using Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

Secondly, glycopeptides obtained by enzymatic digestion of rbLF* were purified by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the primary structure of oligosaccharides linked to Asn₂₃₃, Asn₄₇₆ and Asn₅₄₅ has been determined using two methods of mass spectrometry desorption: Matrix Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry (MALD-MS) and ElectroSpray Mass Spectrometry (ES-MS). Moreover, we have confirmed our results by Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry (CID-MS-MS).

* The V8 protease digestion of native BLF allows to isolate only three of four glycosylated sites (Asn₂₃₃, Asn₄₇₆ and Asn₅₄₅) (Pr. G. Spik, unpublished data).

Finally, oligosaccharides released by hydrazinolysis from rbLF were submitted to 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy in order to determine the linkage of the fucose residues.

Materials and methods

Insect cells culture

The *Mamestra brassicae* clone SPCMb-92-C6 was established by J.M. Quiot at the « Station de Pathologie Comparée INRA / CNRS URA 1184 » (unpublished data). The cell line was adapted, maintained and cultivated at 28°C in a serum free medium (BM-25) developed by J.M. Quiot at the « Station de Pathologie des Invertébrés INRA / CNRS URA 1184 » (unpublished data).

Recombinant Baculovirus construction

cDNA sequence encoding the bLF (Pierce *et al.*, 1991) was recovered from pBSK-bLF plasmid as a Not-I fragment containing the cDNA including the whole upstream leader sequence. The bLF was inserted in the p10 locus of a baculovirus transfer vector termed pGm16 plasmid (Blanc *et al.*, 1993) initially modified by insertion of a Not-I adapter at the original Bgl-II site located downstream of the p10 promoter. *Spodoptera frugiperda* 9 cells (ATCC CRL 1711) were cotransfected with pGm16-bLF and genomic DNA of AcSLP10 baculovirus (Chaabihi *et al.*, 1993). AcSLP10 is a modified baculovirus which has only one strong late promoter p10, with the polyhedrin coding sequence inserted downstream of this promoter. The lipofection method (Felgner and Ringold, 1989) was used for this cotransfection, using the DOTAP reagent (Boehringer Mannheim, Germany). Screening and purification of recombinant baculoviruses were carried out by plaque assay as described by Summers and Smith (1987). A selected recombinant virus expressing the bLF gene under the control of p10 promoter termed

AcSLP10-bLF was then amplified (5×10^7 pFU/ml) in *Mamestra brassicae* cell lines cultivated in the serum free medium developed by J.M. Quiot.

Expression of rbLF

Mamestra brassicae cells were cultivated in 15 liters of BM-25 medium at 28°C using a BIOLAFITTE bioreactor. When cell density reached 0.75×10^6 cells per ml, infection with AcSLP10-bLF was performed at a multiplicity of infection equal to 5. Cell viability was estimated to be 96 % by trypan blue exclusion method prior infection. The 5 days post-infection supernatant containing the rbLF was clarified by a 10 min centrifugation at 3,000 g and stored at 4 °C.

Purification of rbLF

Isolation of the rbLF from the culture supernatant was performed by anion exchange chromatography onto a SP-Sephadex C-50 column as described by Chéron *et al.* (1977). During the purification procedure, rbLF was monitored by 8 % SDS-PAGE (Laemmly, 1970), Western blotting and immunodetection using a specific polyclonal antibody anti-bLF obtained in our laboratory after immunization of a rabbit by nbLF. The purity of the final rbLF pool was assessed by reversed-phase HPLC on C₁₈ stationary phase and by 8% SDS-PAGE stained by Coomassie blue. The molecular weights were estimated according to high range prestained SDS-PAGE standard (Bio-Rad laboratories, USA).

Enzymatic digestions

PNGase F deglycosylation - 20 µg of rbLF and nbLF were digested with 4000 units of recombinant peptide: *N*-glycosidase F (PNGase F) according to the manufacturer's procedure (Biolabs, USA). The PNGase F cleaves between the innermost *N*-acetylglucosamine and as-

paragine residues of oligomannosidic, hybrid and complex oligosaccharides from glycopeptides. In addition, the PNGase F cleavage transforms the asparagine-glycan-linked residues on aspartic residues.

V8 protease digestion - 15 mg of rbLF were reduced with dithiothreitol in 8 M urea and alkylated with iodoacetamide (Crestfield *et al.*, 1963), desalted on Biogel P2 column (1.2 cm x 50 cm) equilibrated in 50 mM ammonium acetate, pH 4 buffer and concentrated to 1 ml by using a Centriprep-30 concentrator containing an Amicon YM membrane (molecular weight cut-off 30 kDa). Under such buffer conditions, the endoproteinase Glu-C from *Staphylococcus aureus* V8 (V8 protease, Boehringer Mannheim, Germany) is known to hydrolyse only Glu-Xaa bonds (Houmard and Drapeau, 1972). Then, protein solution was digested at 37°C for 24 h by addition of 0.15 mg of V8 protease at $t = 0$ and at $t = 12$ h giving a final protease/rbLF ratio of 1/50 (w/w). Protease digestion was stopped by storing the hydrolysate at -20°C.

HPLC separation of proteolytic digests and peptide sequence analysis

Peptides generated from V8-digested rbLF were separated by reversed-phase HPLC on a Beckman C₁₈ ultrasphere ODS 5 μ m (4.6 x 250 mm) column eluted with a linear gradient of acetonitrile from 0 to 100% of 80% acetonitrile in 0.1% TFA for 120 min at a flow rate of 1 ml/min. Elution was monitored at 215 nm and peaks were collected, lyophilized and stored at -20°C.

Sequencing of peptides was carried out on the gas-phase sequencer (Applied Biosystems 470A) using the 03RPTH program. Phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified with an on-line phenylthiohydantoin amino acid analyzer (Applied Biosystems 120A).

Methanolysis and trimethylsilylation

2 nmol of nbLF, rbLF and each purified glycopeptides were lyophilized in a screw-cap glass tube, rapidly solubilized in 500 μ l of 0.5 M HCl in anhydrous methanol and heated at 80°C for 24 h. After cooling, the solution was neutralized by addition of Ag₂CO₃ until pH 6-7 and the mixture was *N*-reacetylated for one night at room temperature after addition of 10 μ l of acetic anhydride (Zanetta *et al.*, 1972). Then, the supernatant was dried under nitrogen flow, and the monosaccharides were derivatized using 20 μ l of bis(methylsilyl)-trifluoroacetamide in the presence of 20 μ l of pyridine for 2 h at room temperature (Kamerling *et al.*, 1975). Methyl trimethylsilylglycosides were analyzed by GC and GC-MS.

Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

GC separation of pertrimethylsilylated methyl sugars was performed on a fused silica capillary column from SGE (0.32 mm x 25 m) using helium as carrier gas at pressure of 0.5 bar with the following temperature program (120-240°C at 2°C/min). A Varian 3400 gas chromatograph was equipped with a flame-ionisation detector, while for the GC-MS analyses a Delsi DI 700 gas chromatograph was coupled with a Nermag R10-10 mass spectrometer (Rueil Malmaison, France). MS analyses were carried out in chemical ionization (Ci) mode using ammonia as reactant gas.

Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry (MALD-MS)

MALDI mass spectra were measured on a reflectron-type Vision 2000 time-of-flight Mass Spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany). Samples were mounted on an x,y moveable stage allowing irradiation of selected sample areas. A nitrogen laser with an emission wavelength of 337 nm and 3 ns pulse duration was used. Spectra were recorded in the posi-

tive-ion mode and accelerated to an energy of 5 KeV before entering the flight tube. Ions were post-accelerated for detection to an energy of 5 KeV.

Samples were prepared by mixing directly on the target 1 μ l of the glycopeptide solution (typically 20 pmoles) and 1 μ l of a 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix solution (12 mg/ml in CH₃OH/H₂O, 70:30). The samples were allowed to dry for 3-4 min at room temperature. 20 to 40 shots were accumulated for each mass spectrum.

Electrospray Mass Spectrometry (ES-MS and by CID-MS-MS)

Electrospray mass spectra were acquired on Micromass Quattro II triple quadrupole mass spectrometer operating with an API ion source in positive ion electrospray mode. Glycopeptides samples were diluted into acetonitrile/0.2 % formic acid (1:1, by vol.), to a concentration of 20 pmoles/ μ l and infused at 8 μ l/min.

Mass spectra were acquired by scanning MS1 over the appropriate mass range, whilst MS-MS analyses were performed by transmitting the appropriate precursor ion through MS1 to the collision cell. The collision gas used was argon at a pressure of 4.9×10^{-3} mbar with an appropriate collision energy (between 25 eV and 45 eV). Product ions were scanned with MS2.

¹H-NMR spectroscopy

Oligosaccharides released and isolated from 31 mg of rbLF, according to Parekh *et al.* (1990) and Patel *et al.* (1993), were submitted to ¹H-NMR. Spectra of the oligosaccharide pool solution (pD = 7) in D₂O (99.95 % atom D; from C.E.A., Saclay, France) (Vliegthart, 1983) were recorded on a Brüker ASX-400-WB spectrometer operating in the pulsed Fourier-transform mode and equipped with a Brüker Aspect 3000 computer at a probe temperature of 300

°K. All the data are given relative to internal acetone ($\delta = 2.225$ ppm) with an accuracy of 0.002 ppm. The two-dimensional (2D) homonuclear COSY experiments were performed with the standard Bruker pulse sequence.

Results

Expression of rbLF and comparison of the electrophoretic profiles of nbLF and rbLF

The expression of rbLF in *Mamestra brassicae* cells has been detailed in materials and methods section. The rbLF was purified by ion exchange chromatography from 14 liters of culture supernatant containing 10 $\mu\text{g/ml}$ of the recombinant glycoprotein. The yield of the purification process was estimated to be 75 %. Purification steps of rbLF was followed by immunodetection after Western blotting using a polyclonal Ab anti-bLF (data not shown). The purity of rbLF was assessed by HPLC on C_{18} stationary phase (data not shown) and by 8 % SDS-PAGE analysis (Figure 1 - lane 2) which showed one band at approximately 80 kDa, slightly lower than the nbLF (Figure 1 - lane 1). To check if this variation in the migration of both bLFs could be due to changes in glycosylation, both bLFs were digested with PNGase F. As shown in Figure 1 (lanes 4 and 5), both deglycosylated bLFs run similarly with an apparent molecular weight of 73 kDa. Taken together, these data indicate that the rbLF was less glycosylated than its natural counterpart.

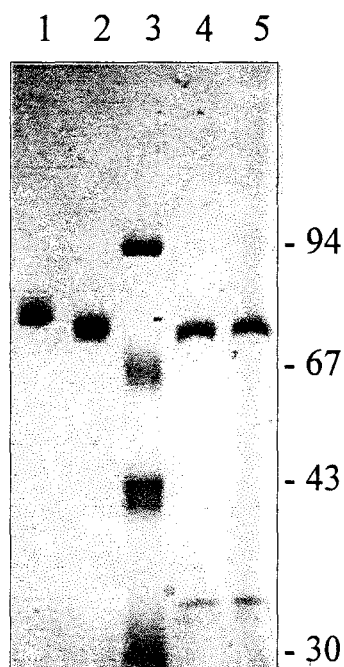


Figure 1: SDS-PAGE analysis of nbLF and rbLF expressed in *Mb* and visualized by Coomassie blue staining. lane 1: reduced nbLF. lane 2: reduced rbLF. lane 3: prestained SDS-PAGE molecular weight standards. lane 4: nbLF after PNGase F digestion. lane 5: rbLF after PNGase F digestion. The molecular weights of the standards are indicated (in kDa) on the right side of the figure.

Purification and characterization of glycopeptides

In order to compare the glycopeptide sites of natural and recombinant bLF, both were digested by the V8 protease, and the peptides and glycopeptides obtained were subsequently fractionated by reversed-phase-HPLC. More than thirty fractions were separated as shown in the HPLC-C18 profile of the V8 protease digestion of the rbLF (Figure 2). The different fractions were then analyzed by MALD-MS and three peaks containing glycopeptides (named peaks I, II and III respectively in Figure 2) were detected in the rbLF as well as in the nbLF digestion.

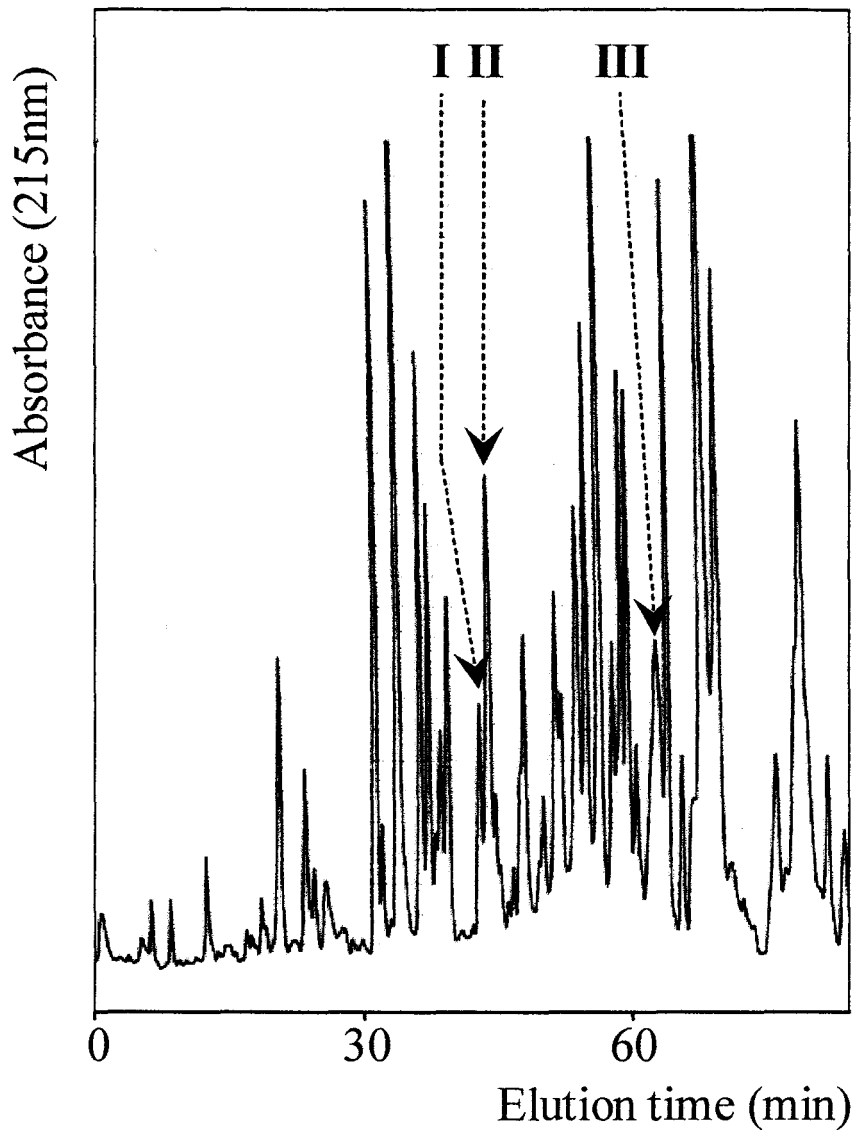


Figure 2: HPLC-C18 profile of the V8 protease digestion of the rbLF expressed in *Mb*. The glycopeptides containing peaks I, II and III are indicated by arrows.

To identify the different glycosylation sites, Edman degradation was carried out for each glycopeptides and the molecular mass of each PNGase F deglycosylated peptides was determined by MALD-MS. Data obtained for each glycopeptide (Table I) indicate that the peaks I, II and III, correspond respectively to Asn₂₃₃, Asn₅₄₅ and Asn₄₇₆ sites. From the

MALD-MS and amino-acid sequence data, the Asn₅₄₅ glycosylation site (peak II) appears to be contaminated by glycoforms of the Asn₂₃₃ glycosylation site.

Table I. Amino acid sequence of the glycopeptides present in the peaks I, II and III from the V8 protease digestion of the rLFL expressed in *Mb* and, determination of the molecular mass by MALD-MS analysis of each peptide backbone present in the PNGase F deglycosylated peaks I, II and III. The *N*-glycosylation site of each peptide is indicated in bold characters.

Peak	Inclusive Numbers	Amino Acid Sequence	Calculated Peptide Mass* (average) [M]	Observed Peptide Mass by MALD-MS** [M+H] ⁺	Corresponding Glycosylation Site
I	229-244	LLCL NNS RAPVDAFKE	1847.1	1849.0	Asn ₂₃₃
II	536-550	DVGDVAFV KNDT WWE	1693.8	1696.0	Asn ₅₄₅
	229-244	LLCL NNS RAPVDAFKE	1847.1	1849.0	Asn ₂₃₃
III	445-485	GLTWNSLKDKK SCHT AVDRTAGWNIPMGLIV NQT GSCAFDE	4580.1	4582.0	Asn ₄₇₆

* The cysteine residues have been alkylated by the iodoacetamide.

** The PNGase F cleavage transforms the asparagine glycan linked residue on aspartic residue.

Monosaccharides composition

The results of the GC analysis of the trimethylsilylated monosaccharides obtained from nbLFL, rLFL, and V8 protease digestions of peaks I, II and III, are summarized in Table II and have been confirmed by GC-MS (data not shown). As previously observed on the electrophoretic profile, shown in Figure 1, the native rLFL is less glycosylated (5.0 %) than its natural counterpart (9.0 %). The presence of *N*-acetylglucosamine and mannose residues, which are the two major monosaccharides, indicates that all the oligosaccharidic chains of rLFL are *N*-glycosidically linked to the protein backbone and their molar ratio show that glycans belong mainly to the oligomannosidic family. The presence of fucose and of a trace of galactose

residues on the native rbLF and in peaks I, II and III indicates that some oligosaccharidic chains have been partially processed via the complex type chains pathway. *N*-acetylgalactosamine residues were observed in both nbLF and rbLF, but not in glycopeptides generated from rbLF, whereas sialic acid residues were observed only on nbLF.

Table II. GC analysis of the nbLF, rbLF and of peaks I, II and III from the V8 protease digestion of the rbLF expressed in *Mb*.

	Fucose	Mannose	Galactose	GalNAc	GlcNAc ¹	Sialic Acid	Glycan (%)
nbLF	trace	4.1	0.3	0.2	2.0	0.2	9.0
rbLF	0.2	4.7	trace	trace	2.0	n.d. ²	5.0
peak I	n.d.	7.7	trace	n.d.	2.0	n.d.	
peak II	0.6	6.3	trace	n.d.	2.0	n.d.	
peak III	0.4	3.3	trace	n.d.	2.0	n.d.	

¹ The molar ratio have been calculated on the basis of 2 GlcNAc residues. This value takes into account the lost of the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine residue during the methanolysis.

² Not detected.

Mass Spectrometry analysis of glycan structures

V8 glycopeptide peak I - From the glycan mass analysis (Figure 3 and Table III) and the molar carbohydrate composition (Table II), it can be inferred that Asn₂₃₃ linked-glycans are of high mannose type (from Man₉GlcNAc₂ to Man₆GlcNAc₂). Centered spectrum shows that Asn₂₃₃ is predominantly glycosylated by Man₈GlcNAc₂ (39 %) and Man₇GlcNAc₂ (44 %). To confirm the oligosaccharidic glycan structures, CID-MS-MS analysis was carried out on selected predominant glycoforms (Figure 6 - A).

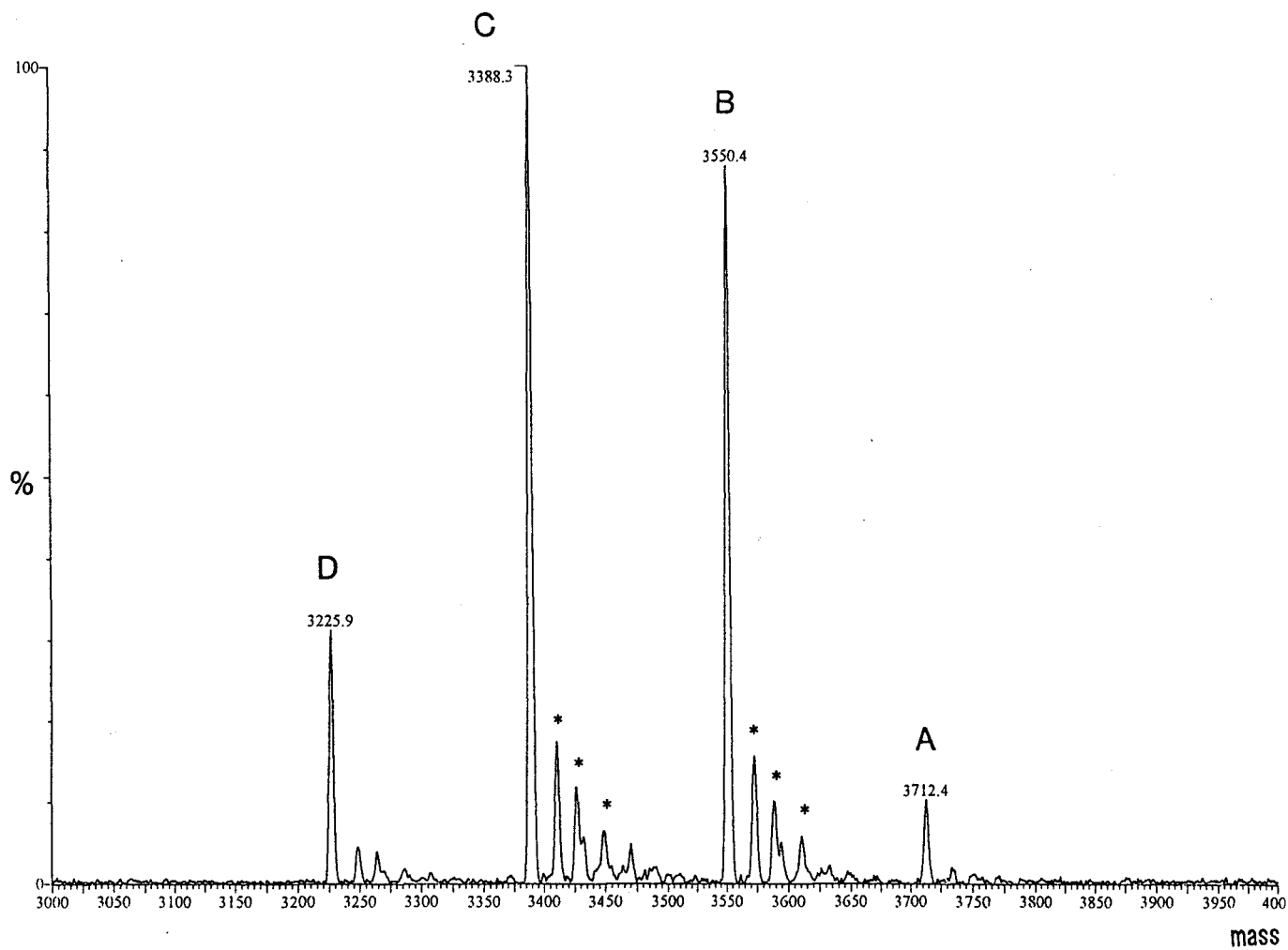


Figure 3: Deconvoluted ES-MS spectrum of the peak I isolated from the V8 protease digestion of the rbLF expressed in *Mb*. The characteristics of the different Asn₂₃₃ glycoforms A, B, C, and D are summarized in Table III.

* Recalculated mass of corresponding $M+Na^+$, $M+K^+$ or $M+Na^++K^+$ ion.

Table III. Analysis of ES-MS spectrum presented in Figure 3 of the peak I isolated from the V8 protease digestion of the rbLF expressed in *Mb*.

Glycosylation Site and Calculated Peptide Mass ($M_{cal.}$)	Glycoform	Calculated Mass (average)	Observed Mass	% ¹	Glycan Mass ²	Glycan Assignment
Asn ₂₃₃ ($M_{cal.}$ 1847,1)	A	3712.6	3712.4	4	1866.3	Hex ₉ HexNAc ₂
	B	3550.5	3550.4	39	1704.3	Hex ₈ HexNAc ₂
	C	3388.3	3388.3	44	1542.2	Hex ₇ HexNAc ₂
	D	3226.2	3225.9	13	1379.8	Hex ₆ HexNAc ₂

¹ Percentage of Asn₂₃₃ glycoforms present in the peak I.

² Glycan mass = glycopeptide mass observed - (peptide mass - 1)

V8 glycopeptide peak II - Assignment of the glycoforms was made difficult due to the mixture of glycopeptides belonging to both Asn₅₄₅ and Asn₂₃₃ glycosylation sites (Figure 4 and Table IV). To overcome this problem, CID-MS-MS analysis was performed. This mass spectrometry technique allows selection of a precursor ion of a given molecular mass $[M+H]^+$ in the first mass spectrometer. This parent ion is then fragmented by a collision gas in a second step and the different product ions are scanned in a third stage. By choosing an appropriate collision energy it is possible to fragment the glycopeptide only at its glycan moiety. The sequential release of the monosaccharides allows firstly to verify the glycan assignment of the selected glycoform and, secondly to identify the glycan containing peptide. Thus considering a selected glycoform, it is possible to discriminate between a mixture of glycopeptides belonging to different glycosylation sites. The Asn₅₄₅ linked-glycans are of high-mannose type (from Man₉GlcNAc₂ to Man₆GlcNAc₂), being predominantly Man₈GlcNAc₂ (49 %) and Man₇GlcNAc₂ (27 %), as proven by CID-MS-MS (Figure 6 - B). Moreover, glycoform J (Figure 4 and Table IV) could be of the hybrid type Man₄GlcNAc₃ (9 %), but this assumption has not been confirmed by CID-MS-MS.

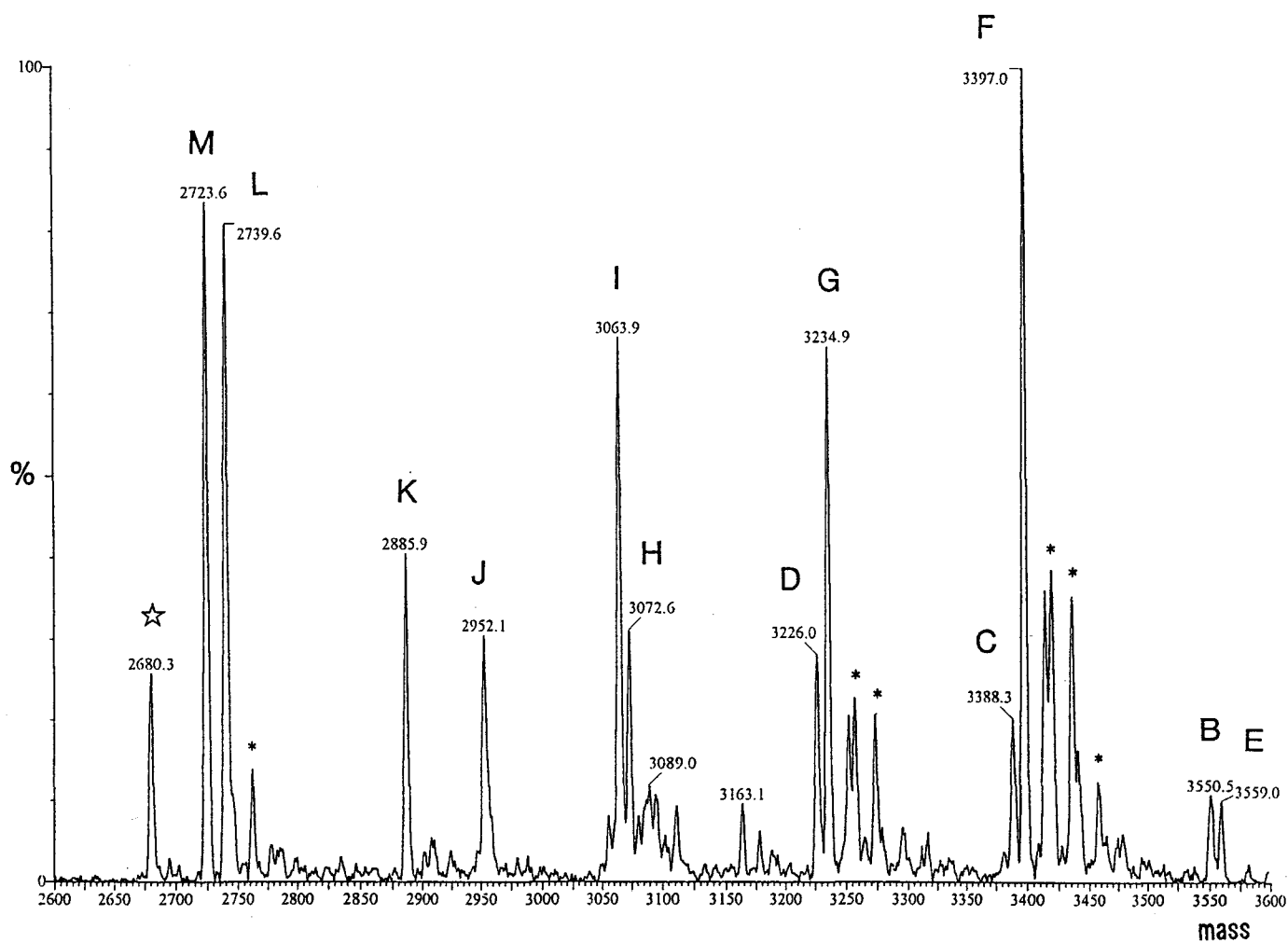


Figure 4: Deconvoluted ES-MS spectrum of the peak II isolated from the V8 protease digestion of the rbLF expressed in *Mb*. The characteristics of the different glycoforms from Asn₂₃₃ (B, C, D, I, K, L, M, and N) and from Asn₅₄₅ (E, F, G, H, and J) are summarized in Table IV.

* Recalculated mass of corresponding M+Na⁺, M+K⁺ or M+Na⁺+K⁺ ion. ☆ Contaminant peptide resulting from the V8 protease digestion of rbLF.

Table IV. Analysis of ES-MS spectrum presented in Figure 4 of the peak II isolated from the V8 protease digestion of the rL_F expressed in *Mb*.

Glycosylation Site and Calculated Peptide Mass ($M_{cal.}$)	Glycoform	Calculated Mass (average)	Observed Mass	% ¹	Glycan Mass ²	Glycan Assignment
Asn ₂₃₃ ($M_{cal.}$ 1847.1)	B	3550.5	3550.5	C.I ³	1704.4	Hex ₈ HexNAc ₂
	C	3388.3	3388.3	C.I	1542.2	Hex ₇ HexNAc ₂
	D	3226.2	3226.0	9	1379.8	Hex ₆ HexNAc ₂
	I	3064.1	3063.9	24	1217.8	Hex ₅ HexNAc ₂
	K	2885.9	2885.9	13	1039.8	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₂
	L	2739.8	2739.6	28	893.5	Hex ₃ HexNAc ₂
	M	2723.8	2723.6	26	877.5	Fuc ₁ Hex ₂ HexNAc ₂
Asn ₅₄₅ ($M_{cal.}$ 1693.8)	E	3559.6	3559.0	3	1866.2	Hex ₉ HexNAc ₂
	F	3397.5	3397.0	49	1704.2	Hex ₈ HexNAc ₂
	G	3235.3	3234.9	27	1542.1	Hex ₇ HexNAc ₂
	H	3073.2	3072.6	12	1379.8	Hex ₆ HexNAc ₂
	J	2952.1	2952.1	9	1259.3	Hex ₄ HexNAc ₃

¹ Percentage of Asn₂₃₃ and Asn₅₄₅ glycoforms present in the peak II.

² Glycan mass = glycopeptide mass observed - (peptide mass - 1)

³ Contaminating glycoforms from the peak I.

The Asn₂₃₃ glycopeptides, that co-elute with Asn₅₄₅ glycopeptides in peak II (Figure 4 and Table IV), are substituted by Man₅GlcNAc₂ (24 %), short truncated partially fucosylated glycans Man₃[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂ (fucosylated 13 %, non fucosylated 28 %) and a more degraded structure Man₂[Fuc]GlcNAc₂ (26 %). The presence of fucose residues is confirmed by the carbohydrate composition presented in Table II. H¹-NMR data further indicate that the fucose residue is α -1,6 linked to the GlcNAc-1 residue (Table VI). We also observe on the ES-MS spectrum the presence of three smaller peaks (B, C, D) corresponding to the glycoforms previously described in peak I (Figure 3 and Table III).

V8 glycopeptide peak III - Putative *N*-glycan structures of the Asn₄₇₆ site inferred from mass spectrometry data (Figure 5 and Table V) are in agreement with the monosaccharides content which indicates the presence of *N*-acetylglucosamine, mannose and fucose in a molar ratio 2.0/3.3/0.4 (see Table II). Asn₄₇₆ linked-*N*-glycans are constituted by the partially fucosylated trimannosyl core Man₃[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂ (fucosylated 13 %, non fucosylated 41 %) and, by more degraded structures Man₂[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂ (fucosylated 19 %, non fucosylated 21 %), as shown in the CID-MS-MS profile (Figure 7 - C and D). In addition, the glycoform N could be of the hybrid type Man₃GlcNAc₃ (6 %), although this assumption has not been confirmed by CID-MS-MS.

Table V. Analysis of ES-MS spectrum presented in Figure 5 of the peak III isolated from the V8 protease digestion of the rLbF expressed in *Mb*.

Glycosylation Site and Calculated Peptide Mass (M _{cal.})	Glycoform	Calculated Mass (average)	Observed Mass	% ¹	Glycan Mass ²	Glycan Assignment
Asn ₄₇₆ (M _{cal.} 4580,1)	N	5676.0	5676.1	6	1097.0	Hex ₃ HexNAc ₃
	O	5619.0	5619.0	13	1039.9	Fuc ₁ Hex ₃ HexNAc ₂
	P	5472.8	5472.6	41	893.5	Hex ₃ HexNAc ₂
	Q	5456.8	5456.6	19	877.5	Fuc ₁ Hex ₂ HexNAc ₂
	R	5310.7	5310.8	21	731.7	Hex ₂ HexNAc ₂

¹ Percentage of Asn₄₇₆ glycoforms present in the peak III.

² Glycan mass = glycopeptide mass observed - (peptide mass - 1)

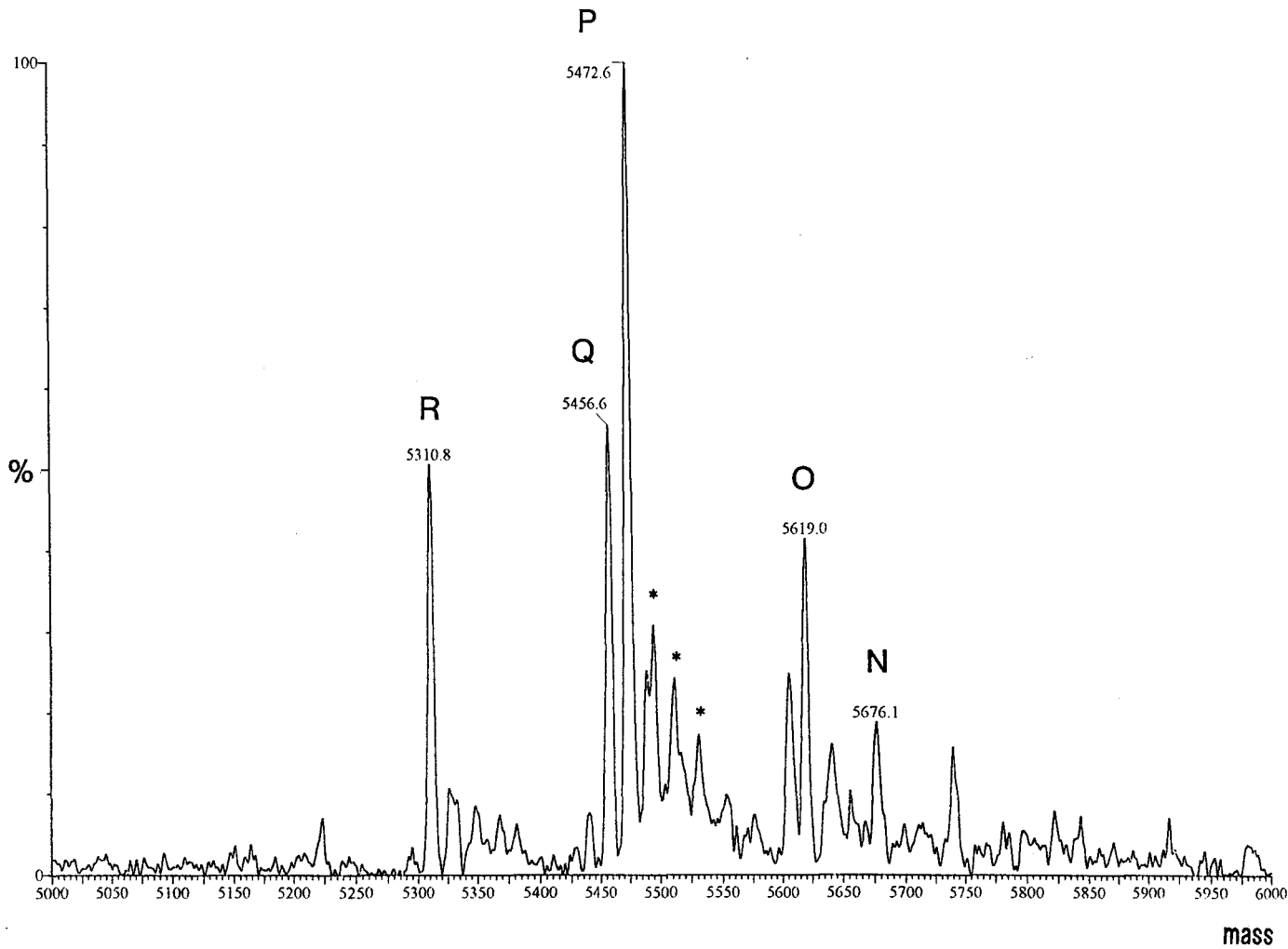


Figure 5: Deconvoluted ES-MS spectrum of the peak III from the V8 protease digestion of the rbLF expressed in *Mb*. The characteristics of the different Asn₅₄₅ glycoforms N, O, P, Q and R are summarized in Table V.

* Recalculated mass of corresponding $M+Na^+$, $M+K^+$ or $M+Na^++K^+$ ion

Figure 6: Full-scan CID-MS-MS spectra of glycopeptides from the V8 protease digestion of the rbLF. (A) CID-MS-MS spectrum of the triply charged precursor ion at m/z 1184 for the Asn₂₃₃ glycopeptide of 3550.4 Da (peak I / glycoform B); (B) CID-MS-MS spectrum of the doubly charged precursor ion at m/z 1699 for the Asn₅₄₅ glycopeptide of 3397.0 Da (peak II / glycoform F).

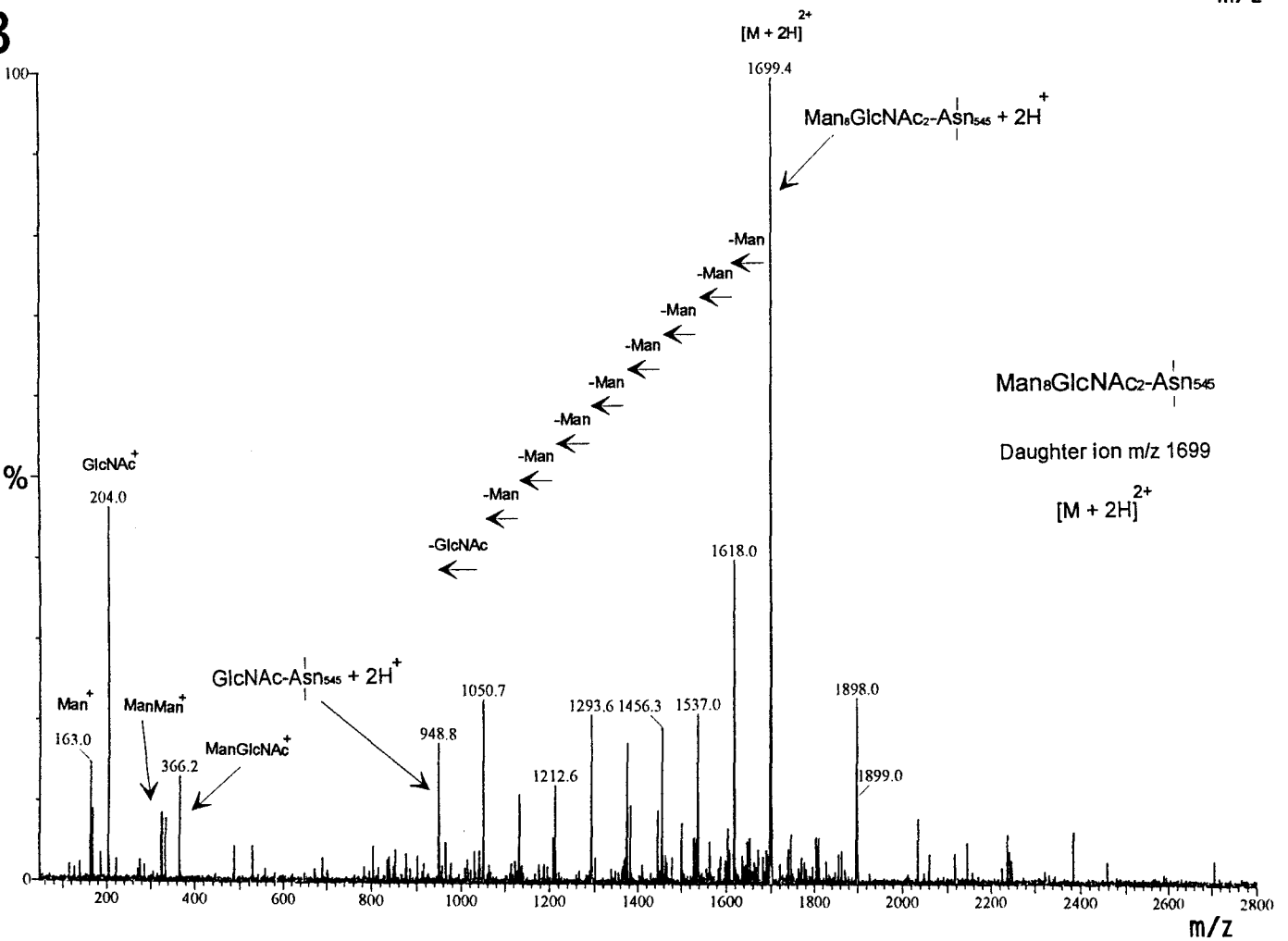
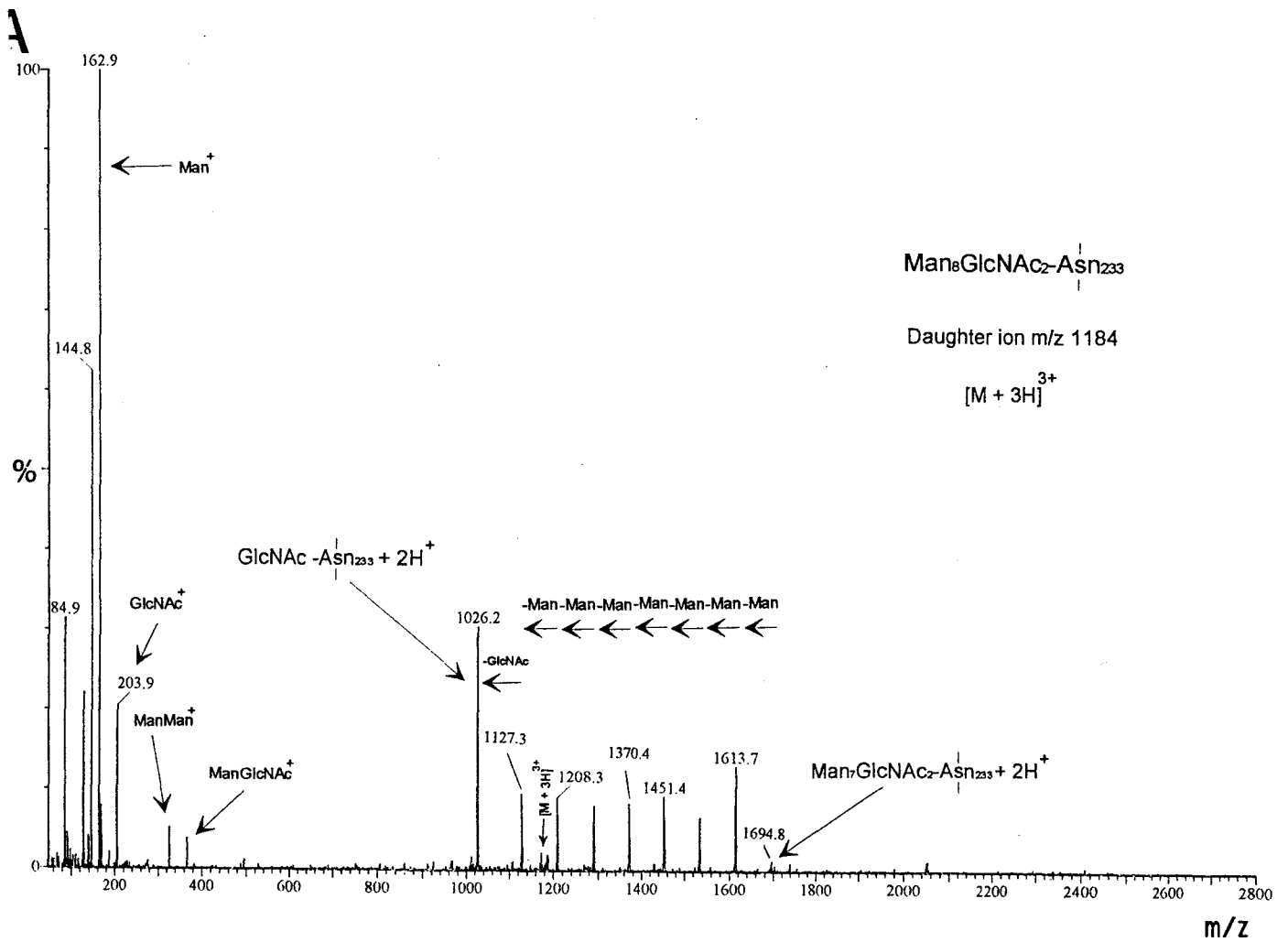
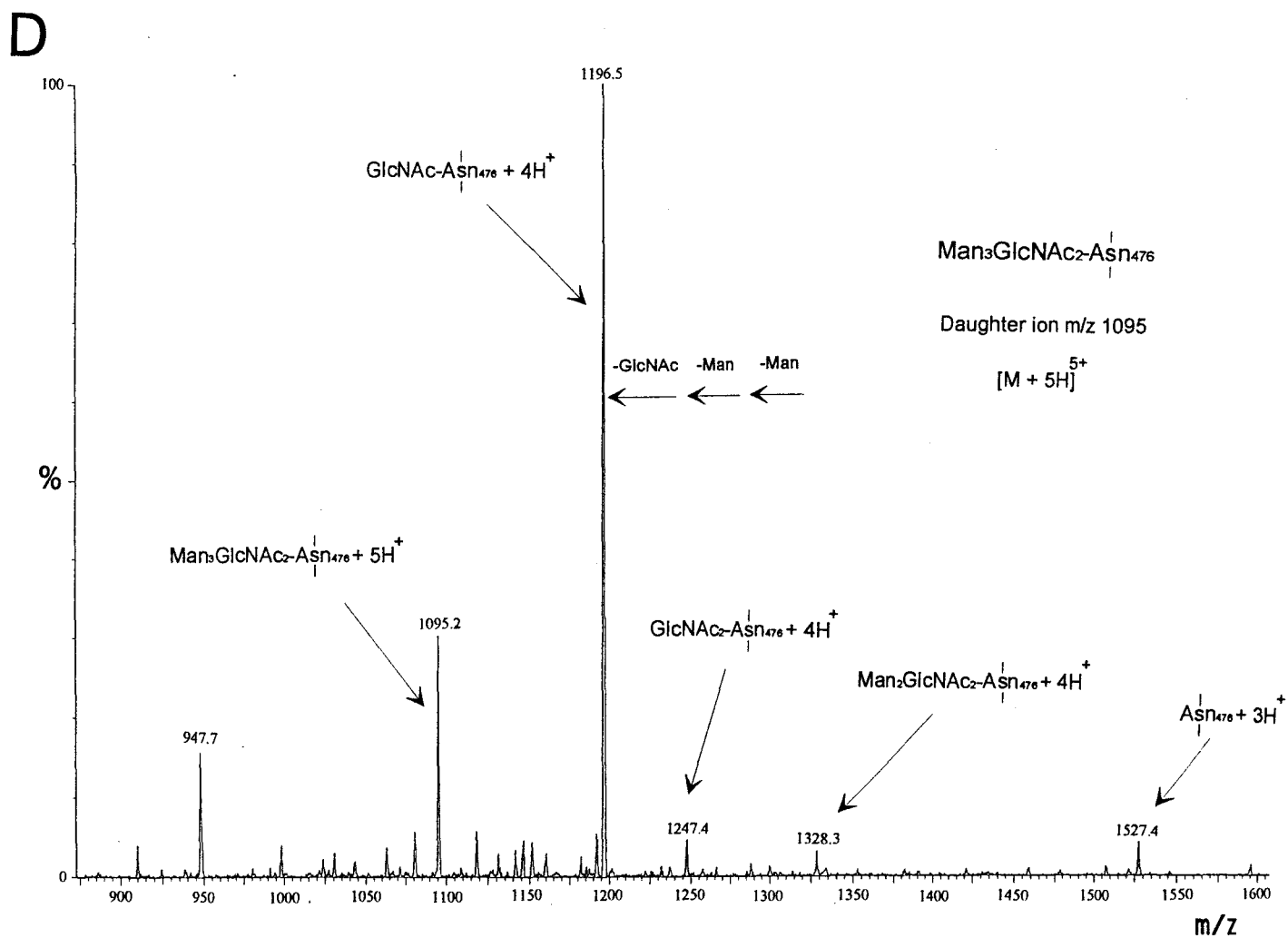
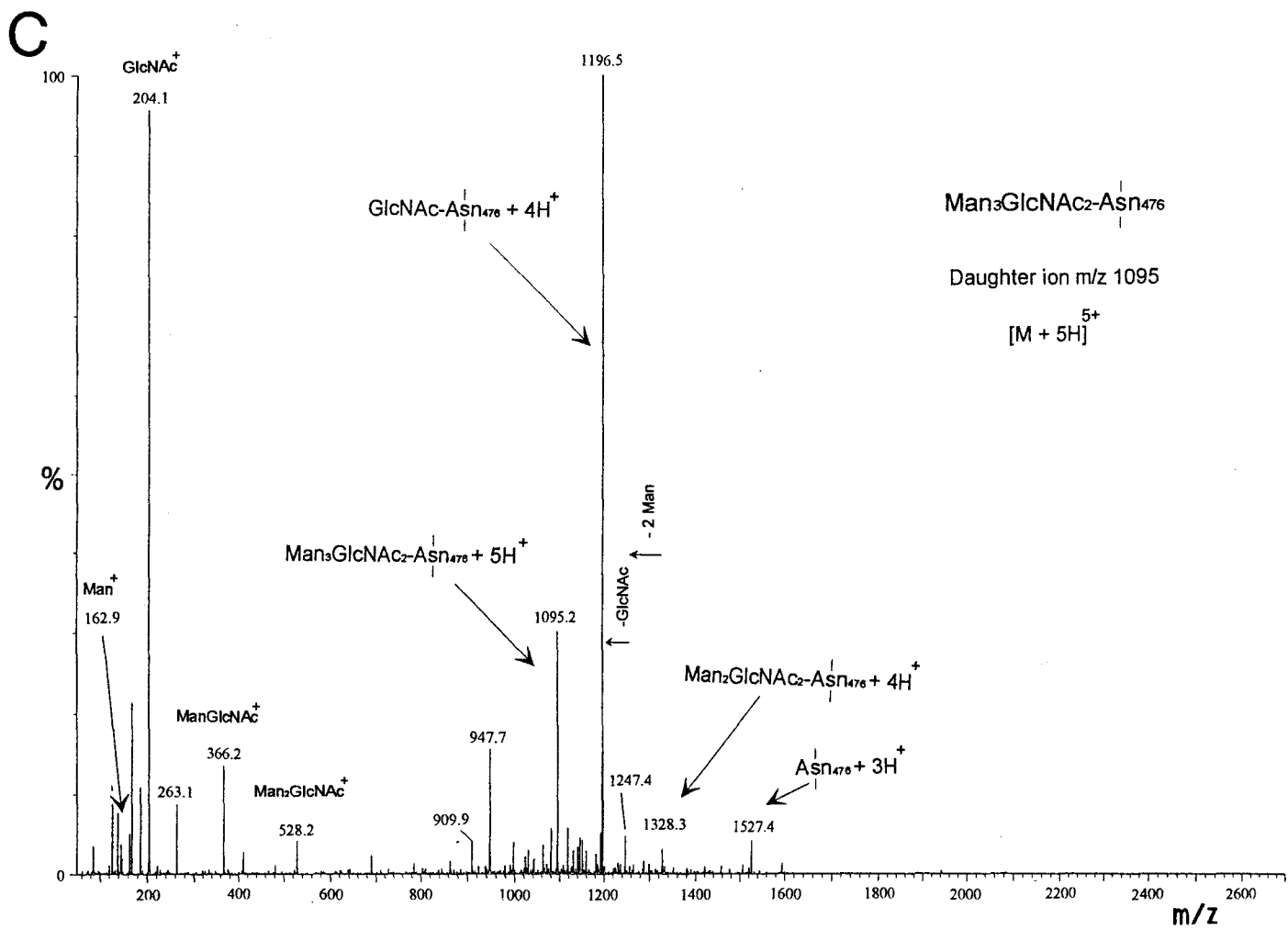


Figure 7: CID-MS-MS spectra of glycopeptides from the V8 protease digestion of the rbLF. for the Asn₄₇₆ glycopeptide of 5472.6 Da (peak III / glycoform Q); (C) Full-scan CID-MS-MS spectrum of the fifthly charged precursor ion at m / z 1095; (D) Enlargement of the previous CID-MS-MS spectrum around the region of m/z 1196.5 that corresponds to GlcNAc-Asn + 4H⁺.



¹H-NMR spectroscopic analysis of the pool of oligosaccharides.

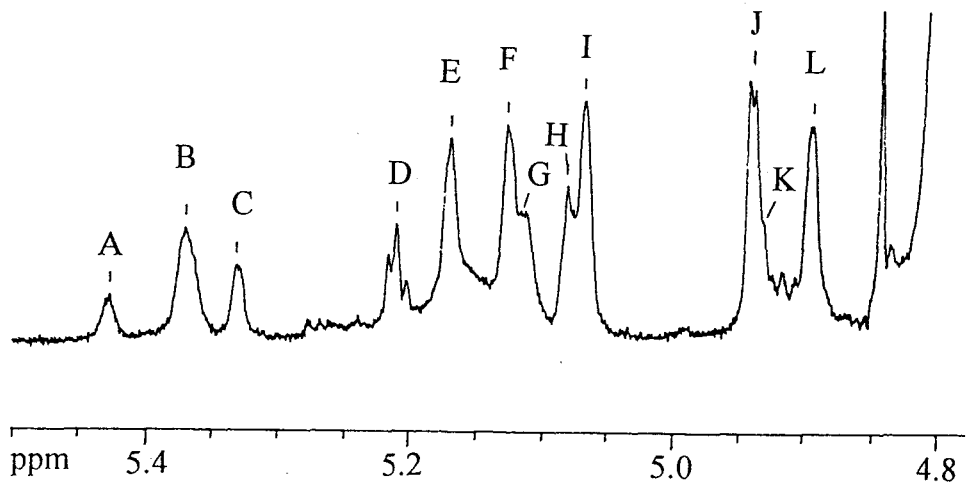
The oligosaccharides from rbLF released by hydrazinolysis were submitted to 400 MHz ¹H-NMR spectroscopy. The 1D and 2D ¹H-NMR spectra are shown in Figure 8 and spectrum data are summarized in Table VI. The isolated glycans correspond to a mixture of oligomannosidic type oligosaccharides.

It may be inferred from ¹H-NMR data that oligosaccharides have in common, at least in part, Man residues 3, 4, 4', A, B, and the di-*N*-acetylchitobiose unit (the monosaccharide nomenclature used to describe the glycan structures is according to Vliegthart *et al.* (1983)). Thus ¹H-NMR signals reflect the heterogeneity of the oligosaccharide moiety. The anomeric proton of the GlcNAc-1 (δ H-1 α) gives rise to two doublets at δ 5.190 and 5.186 ppm, assessing the completeness of the hydrazinolysis reaction (Van Halbeek *et al.*, 1993). The *N*-acetyl signals of GlcNAc-1 (δ 2.026 and δ 2.007 ppm) and GlcNAc-2 (δ 2.053 and δ 2.064 ppm) are both split into two singlets. The chemical shifts of the *N*-acetyl signal of GlcNAc-2 (δ 2.053 and δ 2.064 ppm) are typical of the extension of the pentasaccharide core with Man residues. Moreover, each H-1 atom of mannose residues gives two signals, both of them being a singlet representing the addition of each characteristic doublet.

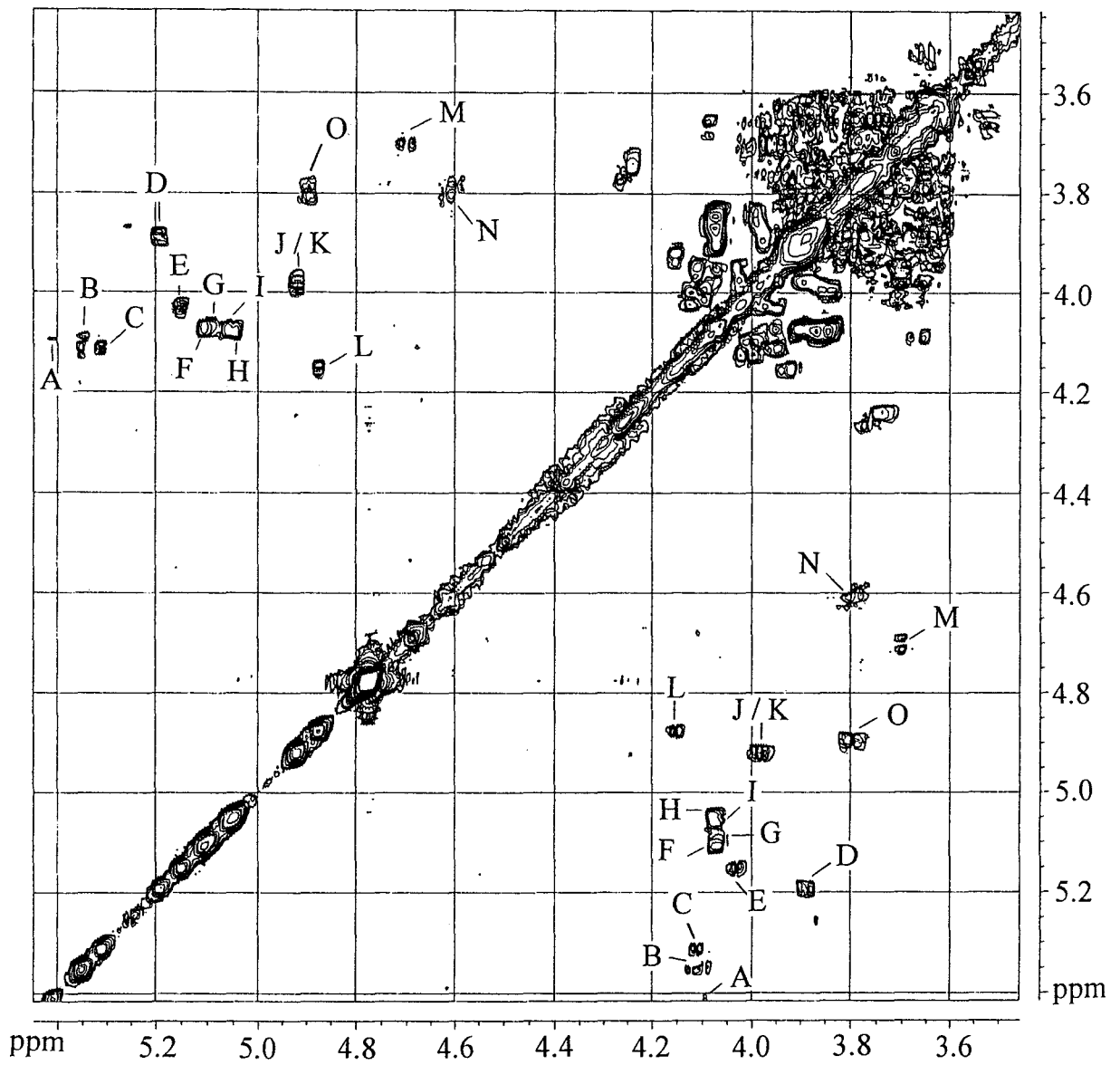
The set of chemical shifts of the correlated H-1 and H-2 atoms of Man-4' gives two signals. The coordinates of the first signal, H-1 δ 4.868 and H-2 δ 4.152 ppm, are indicative of a disubstitution of Man-4' at *O*-3 and *O*-6 by Man-A and Man-B, whereas the second signal, H-1 δ 4.915 and H-2 δ 3.983 ppm, corresponds to a Man-4' in a terminal position.

Figure 8: ^1H -NMR spectra of the oligosaccharides released by hydrazinolysis from rbLF. (A) 1D spectrum focusing on the anomeric zone (4.8-5.4 ppm); (B) COSY spectrum (3.5 x 5.4 ppm); (C) COSY spectrum (1.0 x 1.5 - 1.0 x 5.5 ppm).

A



B



C

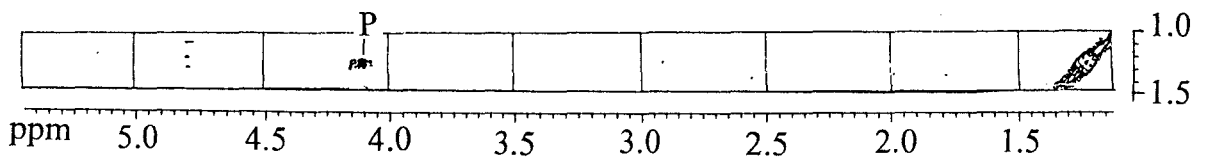


Table VI. ¹H-NMR chemical shifts in structural reporter-group of constituent monosaccharides of oligosaccharides released by hydrazinolysis from rbLF.

Reporter group	Residue	Chemical shifts (ppm)			Relative Signal ² Intensity
		Observed	Literature data ¹		
H-1	A non terminal	Man-A	5.402	5.401	*
	B non terminal	Man-4	5.346	5.345	**
	C non terminal	Man-C	5.306	5.304 / 5.308	**
	E non terminal	Man-B	5.144	5.143 / 5.145	***
	F terminal	Man-4	5.102	5.102	***
	G terminal	Man-A	5.092	5.09	**
	H terminal	Man-D ₂ / C	5.056	5.059	**
	I terminal	Man-D ₁ / D ₃	5.042	5.042	***
	J terminal	Man-4'	4.915	4.915	***
	K terminal	Man-B	4.907	4.908	*
	L non terminal	Man-4'	4.868	4.868	***
	D	GlcNAc-1 α	5.190	n.a. ³	*
				5.186	
	M		β	4.700	n.a.
	N non terminal	GlcNAc-2	4.625	4.615 / 4.621	
			4.607	4.608	
O linked to GlcNAc-1	α 1-6 Fuc	4.894	4.893 / 4.895	*	
H-2	A non terminal	Man-A	4.09/10	4.10	
	B non terminal	Man-4	4.106	4.10	
	C non terminal	Man-C	4.11	4.10	
	E non terminal	Man-B	4.030	4.02	
	F terminal	Man-4	4.077	4.077	
	G terminal	Man-A	4.07	4.07	
	H terminal	Man-D ₂ / C	4.07	4.07	
	I terminal	Man-D ₁ / D ₃	4.07	4.07	
	J/ terminal	Man-4' / B	3.983	3.968 / 3.988	
	K				
	L non terminal	Man-4'	4.152	4.15	
	D	GlcNAc-1 α	3.884	n.a.	
	M		β	3.698	n.a.
	N	GlcNAc-2	3.805	n.a.	
				3.787	3.79
O linked to GlcNAc-1	α 1-6 Fuc	3.792	n.a.		
H-5	P linked to GlcNAc-1	α 1-6 Fuc α^4	4.099	4.096 / 4.101	
H-6	P linked to GlcNAc-1	α 1-6 Fuc α^d	1.210	1.210	
		β^d	1.220	1.220	
NAc	α Fuc(1-6) linked to GlcNAc-1	GlcNAc-1	2.007	2.007	***
		GlcNAc-1	2.026	2.023	***
		GlcNAc-2	2.053	2.054	***
		GlcNAc-2	2.064	2.066	**
	α Fuc(1-6) linked to GlcNAc-1	GlcNAc-2	2.092	2.094	*

¹ Vliegthart *et al.*, 1983.

² Relative Signal Intensity: * low; ** medium; *** strong.

³ Non available.

⁴ Anomerisation effect.

The H-1 and H-2 atoms of Man-B give rise also two signals. At first the signal H-1 δ 4.907 and H-2 δ 3.983 ppm, corresponds to a Man-B at terminal position in the oligomannosidic chain. Secondly the signal H-1 δ 5.144 and H-2 δ 4.030 ppm, indicates a substitution of the Man-B residue with an α 1,2-linked Man-D₃ (δ H-1 5.042 ppm).

The H-1 and H-2 atoms of Man-A give also two signals. The signal at H-1 δ 5.092 and H-2 δ 4.07 ppm resonates in an area that is characteristic of a terminal non reducing position of Man-A. The signal at H-1 δ 5.402 and H-2 δ 4.10 ppm indicates that Man-A residue is substituted with an α 1,2-linked Man-D₂ (H-1 δ 5.056 ppm).

For H-1 and H-2 atoms of Man-4 in the upper branch, two signals are observed: at H-1 δ 5.102 and H-2 δ 4.077 ppm, when Man-4 occupies a terminal position, and at H-1 δ 5.346 and H-2 δ 4.106 ppm indicative of the presence of an α 1,2-Man-C linked to the Man-4 residue. One signal at δ 5.306 ppm assigned to the H-1 of Man-C, shows that Man-C can have a *O*-2 substituted Man-D₁ (δ 5.042 ppm added with Man-D₃). Dealing with the signal of the non substituted Man-C, the H-1 and H-2 resonances are found theoretically in the same area of the respective signals of the Man-D₂, then, it is impossible to distinguish between Man-D₂ and the non substituted Man-C signals.

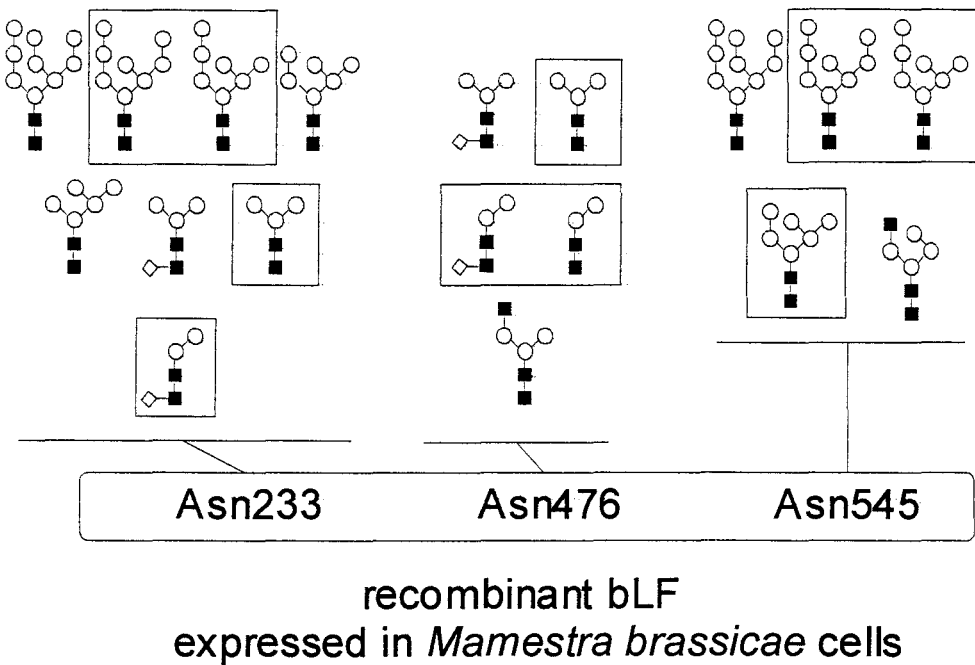
The α 1,6-fucose linked to GlcNAc-1 is evidenced for the structural reported group signals H-1 δ 4.894; H-2 δ 3.792; H5 δ 4.099; H-6 δ 1.210 and 1.220 ppm. Two *N*-acetyl signals are specific for the fucosylated di-*N*-acetylchitobiose unit, one singlet for GlcNAc-1 at δ 2.026 ppm, and an other at δ 2.092 ppm for GlcNAc-2. In summary, MS studies have demonstrated the presence of short *N*-glycan fucosylated structures, and ¹H-NMR data have proven that the fucose residues were linked to the reducing terminal *N*-acetylglucosamine *via* an α 1,6-linkage.

No $^1\text{H-NMR}$ signal has been observed for the H-1 atom of the Gal or GalNAc residue probably due to the low quantity of these two monosaccharides in the glycan sample. No signal at δ 2.074 ppm, that is usually observed when the fucosylated GlcNAc-1 belongs to an hybrid or a complex type oligosaccharide is detected.

Discussion

This present report details the *N*-glycosylation pattern of the recombinant bLF glycoprotein expressed in the lepidopteran cell line *Mamestra brassicae* using the baculovirus as an expression vector. Preliminary studies on the native rbLF, using GC and GC-MS, allowed us to establish its monosaccharide composition. Two main monosaccharides are present on the glycoprotein: mannose and *N*-acetylglucosamine, associated with little amount of fucose (Table II). $^1\text{H-NMR}$ data obtained with oligosaccharides released from rbLF (Table VI), as well as monosaccharide ratio, have confirmed the presence of a mixture of various oligomannosidic structures. Furthermore, we have determined the microheterogeneity of the three isolated *N*-glycosylation sites Asn₂₃₃, Asn₄₇₆ and Asn₅₄₅ by MS analysis (MALD-MS, ES-MS and CID-MS-MS). The Asn₂₃₃ site presents the greatest microheterogeneity since it carries 8 different *N*-glycan structures (Table III) grouped into two families of oligomannosidic type and short-truncated *N*-glycans partially fucosylated ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$). Both Asn₅₄₅ and Asn₄₇₆ sites are substituted by 5 different glycoforms (Table IV and V). The glycosylated Asn₅₄₅ site is predominantly substituted by 4 oligomannosidic structures ($\text{Man}_{9-6}\text{GlcNAc}_2$) and one unique hybrid structure ($\text{Man}_4\text{GlcNAc}_3$). Besides, the Asn₄₇₆ site carries almost exclusively short-truncated partially fucosylated *N*-glycans ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$), and a small proportion of one hybrid structure ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$) (see Figure 9).

A



B

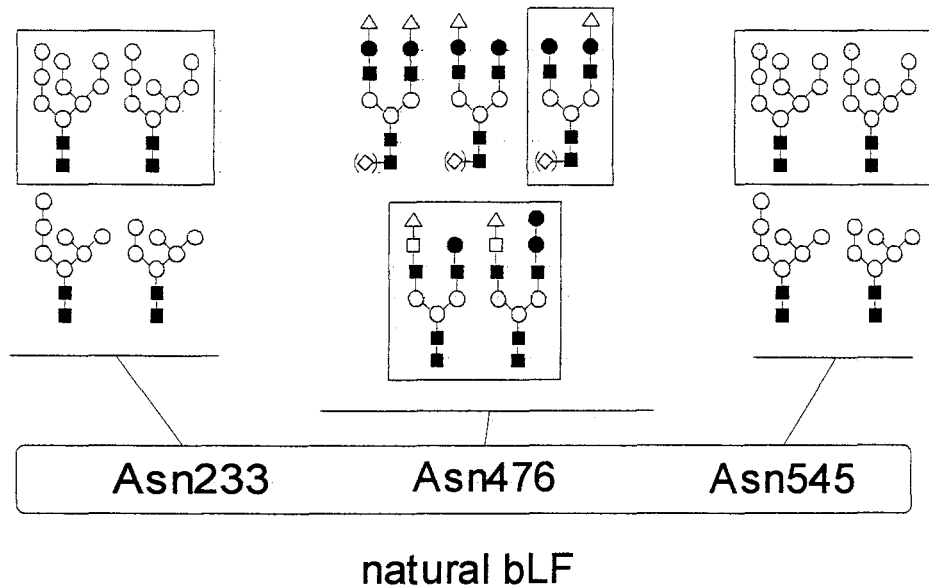


Figure 9: Schematic representation of the main oligosaccharide structures associated with Asn₂₃₃, Asn₄₇₆ and Asn₂₃₃ glycosylation sites of (A) rbLF expressed in *Mamestra brassicae* cell line, and (B) nbLF (data compiled from Coddeville *et al.*, 1992 and Spik *et al.*, 1993).

■ GlcNAc □ GalNAc ○ Man ● Gal ◇ Fuc ▲ NeuAc

The monosaccharide nomenclature used for glycan structures is according to Vliegenthart *et al.* (1983). The most represented oligosaccharide structures are squared.

The choice of bLF as a recombinant glycoprotein model to determine the glycosylation potential in *Mamestra brassicae* cells was due to the fact that the nbLF *N*-glycosylation sites have been extensively studied in our laboratory (Coddeville *et al.*, 1992, Spik *et al.*, 1993). On the nbLF, the two sites Asn₂₃₃ and Asn₅₄₅ carry exclusively oligomannosidic glycans ranging from Man₉GlcNAc₂ to Man₆GlcNAc₂ with Man₉GlcNAc₂ and Man₈GlcNAc₂ as major glycoforms (Figure 9). Like in nbLF, both rbLF Asn₂₃₃ and Asn₅₄₅ sites are substituted by oligomannosidic glycans with predominantly Man₈GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ glycoforms. In addition, we found, associated with oligomannosidic type glycans of the recombinant Asn₂₃₃ site, short-truncated partially fucosylated *N*-glycans (Man₃₋₂[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂). The third *N*-glycosylation site Asn₄₇₆, which carries partially sialylated complex *N*-glycans in the nbLF, is on the rbLF predominantly substituted by short-truncated partially fucosylated glycans. Moreover, the microheterogeneity is less important in the recombinant Asn₄₇₆ site than in its natural counterpart.

In summary, each glycosylation site of rbLF produced by *Mamestra brassicae* cells is differently substituted, and it appears that this insect cell line reproduces the differences observed on the nbLF. Firstly, the site Asn₅₄₅ appears to be processed identically in both recombinant and natural bLF. Secondly, the site Asn₂₃₃ is substituted by oligomannosidic sugar chains as in the nbLF, but also by short truncated fucosylated structures.

Despite previous reports showing by ion exchange chromatography that the human plasminogen expressed in *Spodoptera frugiperda* 21 or *Mamestra brassicae* contained complex oligosaccharides with terminal neuraminic acid (Davidson 1990; Davidson and Castellino, 1991a and 1991b), we found no evidence for sialylation of the *N*-glycans carried by the rbLF expressed in *Mamestra brassicae*. Our results show that *N*-glycosylation in *Mamestra brassicae* cell line aborts at different oligomannosidic stages. Although the *N*-glycan sites of

rbLF are substituted predominantly by high mannose type oligosaccharides and short-truncated partially fucosylated *N*-glycans, some data lead us to think that insect cells would be able to build complex *N*-glycan oligosaccharides. Firstly, a significant amount of hybrid type structures $\text{Man}_{4-3}\text{GlcNAc}_3$ have been found. In vertebrate cells, the addition of an *N*-acetylglucosamine residue by the *N*-acetylglucosaminyltransferase I is the key step in the pathway leading to complex type glycans. Presence of hybrid *N*-glycans is in agreement with previous published work showing that insect cells contain *N*-acetylglucosaminyltransferase I activity (Altmann *et al.*, 1993; Velardo *et al.*, 1993). Secondly, monosaccharide residues such as galactose, galactosamine and fucose residues, that are usually associated to complex carbohydrates have been identified by CG and CG-MS.

Fucosylated glycan structures in rbLF are exclusively short truncated structures ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$), mainly found on the Asn_{476} site which shows complex *N*-glycans in nbLF (Figure 9). $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy data conducted onto rbLF fucosylated structures, have demonstrated that the fucose residue is $\alpha 1,6$ -linked to the reducing terminal *N*-acetylglucosamine. In mammalian cells, the $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase acceptor substrate is a complex *N*-glycan with two terminal *N*-acetylglucosamine residues resulting from the action of *N*-acetylglucosaminyltransferases I and II at the non reducing end of the oligosaccharidic chain (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Assuming that the *N*-glycosylation pathway in insect cells is identical to the mammalian pathway and that the insect $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase exhibits the same acceptor substrate specificity, the insect short truncated fucosylated structures would originate also from complex *N*-glycans, at least $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3[\text{Fuc}_1]\text{GlcNAc}_2$, whose terminal residues would have been removed by hexosaminidases and α -mannosidases. Accordingly, the recombinant Asn_{476} site would be substituted by complex glycans, like in the natural protein, but in the insect cell these complex structures would be degraded. Several reports support this

hypothesis: (i) the presence of different hexoglycosidases and, particularly, of β -*N*-acetylglucosaminidase in insect cell lines (Licari *et al.*, 1993; Altmann *et al.*, 1995b) and, (ii) the presence in *Mamestra brassicae* cells of both α 1,3- and α 1,6-fucosyltransferase activities which used $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ as acceptor substrate (Staudacher *et al.*, 1992b).

Additional structural informations on the insect glycans can be deduced from the $^1\text{H-NMR}$ data in conjunction with the MS data. Considering that the ES-MS glycopeptide signal is mainly due to the peptide fraction (Table III, IV, V), we have correlated for each glycosylation site the height of each centered ES-MS signal with the relative proportion of the corresponding glycoform. In addition, it was possible to establish a correlation between the relative intensity of the 1D H-1 signals of each monosaccharide residue and their molar ratio. Our $^1\text{H-NMR}$ data show that the most represented oligosaccharides possess substituted Man-B or terminal Man-D₁ and Man-D₃, but also that most of them have terminal Man-4 or Man-4'. Thus, these two approaches allowed us to determine the most represented isomers among the two glycan families: high-mannose type and short truncated glycans (Figure 10). Concerning the high-mannose type family, there is a small proportion of the unique possible isomer of $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Figure 10, #1), the predominant high-mannose glycans being of the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ type. Among the three possible isomers of $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, the main form has a non substituted Man-A (Figure 10, #3). The presence of this $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ isomer, which arises from the *N*-glycan biosynthesis pathway in mammalian cells (Kornfeld and Kornfeld, 1985), is in accordance with the $^1\text{H-NMR}$ data showing that the associated signal of the Man-D₁ and Man-D₃ is stronger than the Man-D₂ signal. However, the occurrence of the two other isomers $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Figure 10, #2 and #4) can not be completely excluded.

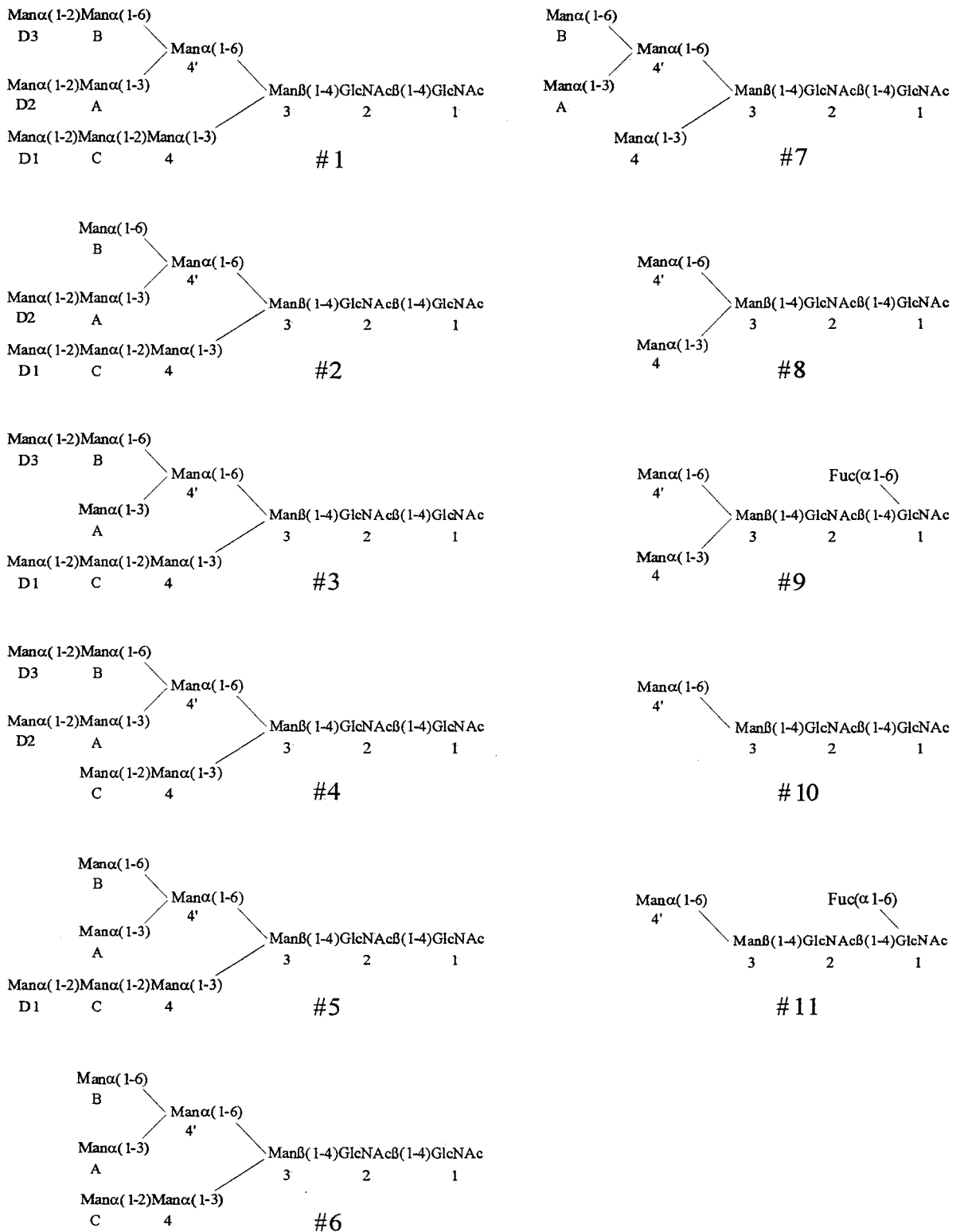


Figure 10: Proposed structures for the oligosaccharides released by hydrazinolysis from rblF as deduced from the $^1\text{H-NMR}$ data.

The monosaccharide nomenclature used for glycan structures is according to Vliegthart *et al.* (1983).

The signal of the non substituted Man-B is in favor of the presence of the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ isomer (Figure 10, #2), which arises from the lysosomal catabolism of oligomannosidic oligosaccharides (see for review: Michalski, 1996). In contrast, among the six different possible isomers of the $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ structure, no predominant form is found. Since terminal Man-A and Man-B give a weak signal in $^1\text{H-NMR}$, the $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ isomer lacking Man-D₂ and Man-D₃ is present in the mixture (Figure 10, #5), although the five other isomers may be present (not represented in Figure 10). Finally, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ and $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ structures (Figure 10, #6 and #7) could originate from the *N*-glycan biosynthesis pathway but also to a lesser extend from the lysosomal catabolism pathway.

The pool of short truncated glycans $\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$ seems to arise from the catabolism of the *N*-glycans (Michalski, 1996). The non-fucosylated trimannosyl core $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ comes from the catabolism of high-mannose type structures, as well as from the catabolism of complex type glycans. However, the presence of a fucose residue in fucosylated structures $\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}]\text{GlcNAc}_2$ shows that these structures proceed from the lysosomal catabolism of complex oligosaccharides. The presence of trimannosidic structures $\text{Man}_3[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$ (Figure 10, #8 and #9) are responsible for the terminal Man-4' and Man-4 $^1\text{H-NMR}$ strong signals. According to the fact that the Man-4' signal is stronger than the Man-4 signal, we can propose that the $\text{Man}_2[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$ (Figure 10, #10 and #11) derived from a classical catabolism pathway (Haeuw *et al.*, 1994). However, the normal lysosomal catabolytic pathway of glycoproteins is initiated with the segregation of the intact glycan and the polypeptide moiety through the action of two endoglycosidases (Michalski, 1996). The presence of short truncated $\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$ structures in rbLF seems to indicate that insect cell glycosidases are able to degradate the glycan moiety of recombinant glycoproteins without the previous liberation of the oligosaccharides.

The baculovirus expression system takes advantage of the insect cell glycosylation machinery and thus, the glycosylation patterns of the expressed glycoproteins are determined to a large extent by the host. It appears that the insect glycosylation machinery can be disturbed after the baculovirus infection by the late and very high level of production of the recombinant protein under control of the p10 promoter in the insect/baculovirus system. In fact, such an overproduction causes the saturation of the secretory pathway and/or the overstepping of the catalytic activities of the different glycosyltransferases. Moreover, the lysis phenomena occurring in the insect/baculovirus system could be responsible for a decrease of the microheterogeneity of « complex » oligosaccharide structures, and for an increase of the microheterogeneity of the *N*-glycosylation sites substituted by high-mannose structures, both phenomena are due to the release in the culture medium of glycosidases (Licari, 1993). During the production of a recombinant glycoprotein in insect/baculovirus system there is a balance between *N*-glycan biosynthesis pathway and the lysosomal catabolism of these oligosaccharides. From this point of view, the present work focused on the potential of glycosylation of a baculovirus infected insect cell line rather than on the potential of glycosylation of the *Mamestra brassicae* cells itself.

Acknowledgements

The authors are grateful to the « société Protéine-Performance »'s staff: Dr. Michel Kaczorek and Dr. Francois-Xavier Deramoudt for their support; Sylvie Juliant, Maud Gazon and Catherine Cêtre, for their technical assistance in the recombinant baculovirus construction and the production of the rbLF. We also sincerely acknowledge Pr. Gérard Devauchelle, « Station de Pathologie des Invertébrés INRA / Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1184 », for his constant interest and support and the members of the « Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111 »: Dr A. Pierce for providing the bLF gene cloned in the pBSK-bLF plasmid; Jean-Pierre Decottignies for his assistance in the V8 protease digestion of the rbLF; Yves Leroy and Dr. Guy Ricart (Université des Sciences et Technologies de Lille) for their assistance in the MS experiments; Pr. Jean Montreuil, Pr. Geneviève Spik, Pr. Bruno Domon, Dr. Jérôme Lemoine, Dr. Jean-Claude Michalski and Dr. Gérard Strecker, for helpful discussions. This work has been supported by the french « Association Nationale de la Recherche Technique » and by the M.E.N.E.S.R.: « Actions Concertées Coordonnées des Sciences du Vivant, ACC-SV14 n° 9514111, Réseau G-Trec ».

References

- Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E. and Glössl, J. (1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. *N*-Acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology*, **3**, 619-625.
- Altmann, F. and März, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II. *Glycoconjugate J.*, **12**, 150-155.
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glössl, J. and März, L. (1995b) Insect cells contain an unusual, membrane-bound β -*N*-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein *N*-glycans. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17344-17349.
- Blanc, S., Cerutti, M., Chaabihi, H., Louis, C., Devauchelle, G. and Hull, R. (1993) Gene II product of an aphid-nontransmissible isolate of cauliflower mosaic virus expressed in a baculovirus system possesses phid transmission factor activity. *Virology*, **192**, 651-654.
- Branley, B.K., Sweidler, S.J. and Robbins, P.W. (1990) Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell*, **63**, 861-863.
- Butters, T.D. and Hughes, RC. (1981) Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 655-671.
- Chaabihi, H., Ogliastro, M-H, Martin, M., Giraud, C., Devauchelle, G. and Cerutti, M. (1993) Competition between baculovirus polyhedrin and p10 gene expression during infection of insect cells. *Journal of Virology*, **67**, 2664-2671.
- Chen, W., Shen, Q. and Bahl, O.P. (1991) Carbohydrate variant of the recombinant β -subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4081-4087.
- Chéron, A., Mazurier, J. et Fournet, B. (1977) Fractionnement chromatographique et études sur la microhétérogénéité de la lactotransferrine de vache préparée par un procédé original. *C. R. Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci.*, **284**, 585-588.
- Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Vliegenthart, J.F.G., Van Halbeek, H., Peter-Katalinic, J., Egge, H. and Spik, G. (1992) Heterogeneity of bovine lactoferrin glycans. Characterization of α -D-Gal- and α -NeuAc-(2-6)- β -D-GalpNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc-substituted *N*-linked glycans. *Carbohydrate Research*, **236**, 145-164.
- Crestfield, A.M., Moore, S. and Stein, W.H. (1963) The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **238**, 622-627.

- Davidson, D.J., Fraser, M.J. and Castellino, F.J. (1990) Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochemistry*, **29**, 5584-5590.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991a) Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503) *Biochemistry*, **30**, 6689-6696.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b) Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf-21AE) cells. *Biochemistry*, **30**, 6167-6174.
- Elbein, A.D. (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of *N*-linked oligosaccharide chains. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 497-534.
- Felgner, P.L. and Ringold, G.M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, **337**, 387-388.
- Furukawa, K. and Kobata, A. (1992) Protein glycosylation. *Current Opinion in Biotechnology*, **3**, 554-559.
- Goochee, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. and Rasmussen, J.R. (1991) The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/Technology*, **9**, 1347-1355.
- Grabenhorst, E., Hofler, B., Nimtz, M, Jager, V and Conrad, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin-2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf-21 cells. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189-197.
- Haeuw, J.F., Grard, T., Alonso, C., Strecker, G. and Michalski, J.C. (1994) The core-specific lysosomal $\alpha(1-6)$ -mannosidase activity depends on aspartamidohydrolase activity. *Biochem. J*, **294**, 463-466.
- Hard, K., Van Doorn, J.M., Thomas-Oates, J.E., Kamerling, J.P. and Van Der Horst, D.J. (1993) Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein III from the insect *Locusta migratoria*. Carbohydrate-linked 2-Aminoethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein. *Biochemistry*, **32**, 766-775.
- Hogeland Jr, K.E. and Deinzer, M.L. (1994) Mass spectrometric studies on the *N*-linked oligosaccharides of baculovirus expressed mouse interleukine-3. *Biological Mass Spectrometry*, **23**, 218-224.
- Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972) Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3506-3509.

- Hsieh, P. and Robbins, P.W. (1984) Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing: Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2375-2382.
- Jarvis, D.L. and Summers, M.D. (1989) Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 214-223.
- Jarvis, D.L., Oker-Blom, C. and Summers, M.D. (1990) Role of glycosylation in the transport of recombinant glycoproteins through the secretory pathway of lepidopteran insect cells. *J. Cell Biochem.*, **42**, 181-191.
- Jenkins, N. (1995) Glycosylation of proteins. Monitoring and control of recombinant glycoprotein heterogeneity in animal cell cultures. *Biochemical Society Transactions*, **23**, 171-175.
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G. and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of permethylsilyl methyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.*, **151**, 491-495.
- Kang, C.Y. (1988) Baculovirus vectors for expression of foreign genes. *Adv. Virus Res.*, **35**, 177-192.
- Klenk, H.-D. (1990) Influence of glycosylation on antigenicity of viral proteins, In: van Regenmortel, M.H.V and Neurath, A.R. (eds), *Immunochemistry of Viruses, II. The Basis of Serodiagnosis and Vaccines*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 25-37.
- Kobata, A. (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 483-501
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 631-664.
- Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, F.G. (1993) Primary structure of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1193-1204.
- Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and März, L. (1994) Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (*Sf-21*, *IZD-Mb-0503*, *Bm-N*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 148-157.
- Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D. and Doerfler, W. (1986) Expression of the influenza virus hemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.*, **5**, 1359-1365.

- Kuroda, K., Gröner, A., Frese, K., Drenckhahn, D., Hauser, C., Rott, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae. *J. Virol.*, **63**, 1677-1685
- Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector *Virology*, **174**, 418-429.
- Kuroda, K., Veit, M. and Klenk, H.-D. (1991) Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology*, **180**, 159-165.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Licari, P.J., Jarvis, D.L. and Bailey, J.E. (1993) Insect cell hosts for baculovirus expression vectors contain endogenous exoglycosidase activity. *Biotechnol. Prog.*, **9**, 146-152.
- Lis, H. and Sharon, N. (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 1-27.
- Luckow, V.A and Summers. M.D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, **6**, 47-55.
- Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H.-W. and Fountoulakis M. (1994) Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of the soluble human interferon receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Protein Science*, **3**, 30-38.
- Michalski, J.C. (1996) Chapter 1b: Normal and pathological catabolism of glycoproteins, In: J.Montreuil, J.F.G. Vliegenthart and H. Schachter (Eds), *Glycoproteins and Disease*, Elsevier Science B.V., 55-97
- Miller, L. K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177-199.
- Munk, K., Pritzer, E., Kretzschmar, E., Gutte, B., Garten, W. and Klenk, H.-D. (1992) Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus hemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*, **2**, 233-240.
- Noteborn, M.H.M., Kant, A., Eijdem, E.W.H.M., De Boer, GF, Van Der Eb, A.J. and Koch, G. (1992) Immunogenic properties of avian leukosis virus env-proteins synthesized with a baculovirus expression vector. In Vlak, J.M., Schlaeger, E.-J. and Bernard, A.R. (eds), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes* Editiones Roche, Basel, Switzerland, 92-97.

Ogonah, W.O., Freedman, R.B., Jenkins, N., Patel, K. and Rooney, B.C. (1996) Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex *N*-linked glycosylation on recombinant proteins. *Bio/Technology*, **14**, 197-202.

Olden, K., Parent, J.B. and White, S.L. (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins. A reevaluation of their function. *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 209-232.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. (1994) Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. Oxford University Press, New York.

Parekh, R.B., Warren, C.E., Merry, A. and Bruce, J. (1990) Refined chemical techniques for the quantitative recovery of intact *N*- and *O*-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Glycoconjugate J.*, **7**, 382-383.

Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jacques, A. and Parekh, R.B. (1993) Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both *N*- and *O*-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry*, **32**, 679-693.

Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactoferrin. *Eur. J. Biochem.*, **196**, 177-184.

Ponimaskin, E., Veit, M. and Schmidt, M.F.G. (1994) Expression of the Sendai virus fusion protein in insect cells and characterization of its posttranslational modifications. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1163-1167.

Rademacher, T.W., Parekh, R.B. and Dwek, R.A. (1988) Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 785-838.

Schachter, H. (1991) The 'yellow brick road' to branched complex *N*-glycans. *Glycobiology*, **1**, 453-461.

Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., Montreuil, J., Pierce, A., Rochard, E.. New Perspectives in infant nutrition, Symposium Antwerp 1992, Edited by B. Renner & G. Sawatzki, 1993, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Springer, T.A. and Lasley, L.A. (1991) Sticky sugars for selectins. *Nature*, **349**, 196-197.

Staudacher, E., Altmann, F., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1992a) α -6(α -3)-Difucosylation of the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A₂. *Glycoconjugate J.*, **9**, 82-85.

Staudacher, E., Kubelka, V. and März, L. (1992b) Distinct *N*-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 987-993.

Summers M.D. and Smith G.E. (1987) a manual methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, 1555. Texas Agricultural Experiment Station, College Station, Texas.

Takeuchi, M. and Kobata, A. (1991) Structures and fonction roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*, **349**, 196-197.

Van Die, I., Van Tetering, A., Bakker, H., Van den Eijnden, D.H. and Joziasse, D.H (1996) Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a β 1-4-*N*-acetylgalactosyl-transferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, **6**, 157-164.

Van Halbeek, H. (1993) in: Methods in Molecular Biology, vol. 17 (Jones, C., Mulloy, B. and Thomas, A.H. Eds), pp. 115-148, Humana Press Inc., Totowa, USA.

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130

Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.

Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N. and Castellino, F.J (1993) The presence of UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-*Sf*-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17902-17907.

Vliegthart, J.F.G., Dorland L. and Van Halbeek (1983) High-resolution, ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **41**, 209-374.

Voss, T., Ergülen, E., Ahorn, H., Kubelka, V., Sugiyama, K., Maurer-Fogy, I. and Glössl, J. (1993) Expression of human interferon ω 1 in *Sf*-9 cells. No evidence for complex-type *N*-linked glycosylation or sialylation. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 913-919.

Wathen, M.W., Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1991) Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line *Sf*-9. *Biochemistry*, **30**, 2863-2868.

Williams, P.J., Wormald, M.R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Parker, G.F. and Roberts, D.R. (1991) Characterization of oligosaccharides from *Drosophila melanogaster* glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1075**, 146-153.

Wojczyk, B., Shakin-Eshleman, S.H., Doms, R.W., Xiang, Z.Q., Ertl, H.C.J., Wunner, W.H. and Spitalnik, S.L. (1995) Stable secretion of a soluble oligomeric form of rabies virus glycoprotein: influence of *N*-glycan. Processing on secretion. *Biochemistry*, 1995, **34**, 2599-2609.

Yeh, J., Seals, J.R., Murphy, C.I., van Halbeek, H. and Cummings, R.D. (1993) Site-specific *N*-glycosylation and oligosaccharide structures of recombinant HIV-1 gp120 derived from a baculovirus expression system. *Biochemistry*, **32**, 11087-11099.

Zannetta, J.-P, Breckenridge, S.C. and Vincendon, G. (1972) Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the *O*-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.*, **69**, 291-304.

II. LE POTENTIEL DE O-GLYCOSYLATION DE NOS LIGNEES

Les *N*-glycannes de type oligomannosidique *lourds* ($\text{Man}_{9-5}\text{GlcNAc}_2$) et *légers* ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$), substituant la lactoferrine bovine exprimée chez *Mamestra brassicae* ne semblent pas être responsables de la fixation sur les glycoprotéines endogènes de ce lépidoptère des lectines RCA et BSI-B₄ spécifiques des résidus de α/β -Gal en position terminale. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons recherché ces structures galactosylées au sein des *O*-glycannes formés par trois lignées de lépidoptères : *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae* et *Trichoplusia ni*.

Dans une première étape, nous avons évalué le potentiel de *O*-glycosylation des lignées cellulaires d'insectes saines, chacune cultivées dans deux milieux de culture sans sérum de veau foetal (BM 25 et EXCELL 401™). Pour cela, nous avons comparé la fixation des lectines SBA, PNA et BSI-B₄ sur les glycoprotéines endogènes des lignées sélectionnées, ainsi que les différentes activités glycosyltransférasiques responsables de la synthèse des *O*-glycannes dans ces cellules. Ces travaux sont présentés dans la deuxième publication intitulée : *Synthesis potentials of Tn-, T-, and Gal α 1-4-substituted T-antigens onto endogenous O-glycoproteins in three lepidopteran cell lines*, complétée par une annexe pages 140 à 143.

L'étude de la *O*-glycosylation chez les lépidoptères nous a permis de caractériser dans la lignée *Mamestra brassicae* une nouvelle activité UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase responsable de la synthèse de la structure *O*-glycannique Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc reconnue par la BSI-B₄.

Dans un premier temps, nous avons consacré nos efforts à déterminer la spécificité de substrat de cette nouvelle galactosyltransférase et à l'analyse structurale du produit formé. L'ensemble de cette étude fait l'objet de la troisième publication intitulée : *Characterization of an UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase in Mamestra brassicae cell line*.

**EXPRESSION OF T_n, T AND Gal α 1-4-substituted T ANTIGENS ON ENDOGENOUS
O-GLYCOPROTEINS IN THREE LEPIDOPTERAN CELL LINES**

Michel Lopez¹, Daniel Tetaert², Sylvie Julian³, Maud Gazon³, Martine Cerutti³, André Verbert¹
and Philippe Delannoy^{1*}

¹ *Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

² *Laboratoire de Biologie et Physiopathologie des Cellules Mucipares, Unité INSERM n° 377, place de Verdun, F-59045 Lille, France.*

³ *Station de Pathologie Comparée INRA / Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1184, route d'Alès, F-30380 Saint Christol-les-Alès, France.*

* To whom correspondence should be addressed at: Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Telephone number: (33).03.20.43.69.23; Fax number: (33).03.20.43.65.55; e-Mail address: delannoy@pop.univ-lille.fr

Running title: Short O-glycan structures in lepidopteran cells.

Keywords: Capillary electrophoresis / Glycosyltransferases / Insect cells / O-glycosylation; Lectins.

Abstract

The activities of *O*-glycosylation have been studied for three insect cell lines, *Spodoptera frugiperda* (Sf-9), *Mamestra brassicae* (Mb) and *Trichoplusia ni* (Tn) cultivated in two serum-free media. The investigations concerning the structural features of the *O*-glycoproteins in the insect cells have been conducted using (i) a panel of lectins, and (ii) the measurement of the glycosyltransferase activities involved in insect *O*-glycan biosynthesis (i.e. UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase, UDP-Gal : core-1 β 1,3-galactosyltransferase, CMP-NeuAc : Gal β 1-3GalNAc α 1,3-sialyltransferase and UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase activities). First, we showed that the potential of glycosylation was dependent of the cell type. The three lepidopteran cell lines expressed Tn-antigen which is recognized by Soy Bean agglutinin (SBA) and correlated to a high UDP-GalNAc : polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase activity. The studies by capillary electrophoresis and mass spectrometry methods suggested the presence of, at least, two different UDP-GalNAc : polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase in these insect cells. Only part of *O*-linked GalNAc residues was further processed by the addition of β 1,3-linked Gal residues to form T-antigen as shown by the binding of peanut agglutinin (PNA). This was correlated to the weak activity of the UDP-Gal : core-1 β 1,3-galactosyltransferase in insect cells compared to this observed in mammalian control cells. In addition, we have shown a strong binding of *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄ (BSI-B₄) on *Mamestra brassicae* endogenous glycoproteins, testifying the high activity of an UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase in the corresponding cells and which could explain the absence of PNA binding to *Mamestra brassicae* glycoproteins, meanwhile the UDP-Gal : core-1 β 1,3-galactosyltransferase activity was 4-fold more active in *Mamestra brassicae* than in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. Our results argued also undoubtedly for the absence of terminal

sialic acid, and that no sialyltransferase activity occurred in these cell lines. Finally, we reported that the culture medium strongly influenced the *O*-glycosylation potential of each cell line. The binding of the different lectins and the corresponding glycosyltransferase activities were shown to be increased when the cells were cultivated in semi-defined medium (EX-CELL 401™) compared to those adapted in a minimum culture medium (BM-25).

Abbreviations

Ac, acetyl; α 1,4-Gal-T, UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase; α Me-Gal, Gal α 1-*O*-methyl; core-1 β 1,3-Gal-T, UDP-Gal : core-1 β 1,3-galactosyltransferase; bn, benzyl; BSI-B₄, *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄; DAB, 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride; dig, digoxigenin; E64, trans-epoxysuccinyl-leucylamino-(4-guanido)-butane; Gal, Gal; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Fuc, fucose; MALD-MS, matrix-assisted laser desorption mass spectrometry; Man, mannose; *Mb*, *Mamestra brassicae* clone SPCMb-92-C6; Me, methyl; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; MS, mass spectrometry; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; per, peroxydase; PMSF, phenyl-methane sulfonyl-fluoride; PNA, peanut agglutinin; pp α GalNAc-T, UDP-GalNAc : polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase; PT-antigen, Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -*O*-Ser/Thr; SBA, Soy Bean agglutinin; *Sf*-9, *Spodoptera frugiperda* clone ATCC CRL 1711; *Sf*-21, *Spodoptera frugiperda* cell line IPLB-*Sf*21-AE; T-antigen, Gal β 1-3GalNAc α -*O*-Ser/Thr; TBS, Tris/HCl 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4 buffer; *Tn*, *Trichoplusia ni* clone *Tn*-5-B14; Tn-antigen, GalNAc α -*O*-Ser/Thr.

Introduction

The lepidopteran cell lines deriving from *Sf-9* and, to a lesser extent, *Mb* and *Tn*, have been largely used as hosts for the expression of therapeutic glycoproteins in the baculovirus / insect cell system (for reviews: Kang, 1988; Luckow and Summers, 1988; Miller, 1988; O'Reilly *et al.*, 1994). This development has stimulated interest to determine post-translational modification processes and, mainly, the glycosylation potential of the lepidopteran cells. At present, it is well established that carbohydrate moiety in glycoproteins play crucial roles on their physico-chemical properties and functions, such as antigenicity, immunogenicity and metabolic clearance (Klenk, 1990; Takeuchi and Kobata, 1991; Munk *et al.*, 1992; Thotakura and Blithe, 1995). The glycans insure also in biological recognition processes such as in secretion, targeting of glycoproteins to different subcellular compartments, cell-cell adhesion, tissue organization (Olden *et al.*, 1982; Elbein, 1987; Rademacher *et al.*, 1988; Branley *et al.*, 1990; Jarvis *et al.*, 1990; Springer and Lasley, 1991; Kobata, 1992; Lis and Sharon, 1993; Varki, 1993; Wojczyk *et al.*, 1995)

Studies of *N*-glycan structures of recombinant glycoproteins expressed by lepidopteran cells using baculovirus vector have revealed that the *N*-linked oligosaccharides are essentially high-mannose type ($\text{Man}_{9-5}\text{GlcNAc}_2$) and short truncated structures ($\text{Man}_{3-2}[\text{Fuc}_{0-1}]\text{GlcNAc}_2$) frequently with a fucose residue α 1,6-linked to the asparagine-bound GlcNAc residue (Kuroda *et al.*, 1986; Jarvis and Summers, 1989; Kuroda *et al.*, 1989; Kuroda *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Wathen *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991; Noteborn *et al.*, 1992; Grabenhorst *et al.*, 1993; Veit *et al.*, 1993; Voss *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1993; Manneberg *et al.*, 1994; Ponimaskin *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1997). Few studies described in insect cells complex *N*-linked glycans (Ogonah *et al.*, 1996), and the presence of *N*-glycans with terminal

sialic acid residues was uncommonly reported (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a and 1991b).

As found on recombinant glycoproteins expressed in the baculovirus / insect cell system, endogenous *N*-glycan structures identified in lepidopteran cell glycoproteins have no complex type glycans (Butters and Hughes, 1981; Hsieh and Robbins, 1984; Williams *et al.*, 1991; Staudacher *et al.*, 1992a), but small amount of oligosaccharide chains have terminal GlcNAc or GalNAc residues (Hard *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994). The measurements of activity for the several glycosyltransferases implicated in terminal glycosylation of *N*-linked oligosaccharides, have demonstrated that the lepidopteran cells contained (i) α 1,6- and α 1,3-fucosyltransferases (Staudacher *et al.*, 1992b); (ii) β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase activity catalyzing the transfer of GalNAc residues onto oligosaccharides carrying a terminal β -linked GlcNAc residues (Van Die *et al.*, 1996); (iii) low level of β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I (Altmann *et al.*, 1993; Velardo *et al.*, 1993); (iv) but lack β 1,4-galactosyltransferase and sialyltransferase activities.

Compared to the information available on the structure and biosynthesis of lepidopteran *N*-glycans, our knowledge about the synthesis of *O*-linked oligosaccharides remains rather poor. A comparison of *O*-glycans on recombinant pseudorabies virus envelope protein gp50 expressed in *Sf*-9, *Vero* and *Chinese Hamster Ovary* cells, has shown that the protein synthesized by both mammalian cell lines contained exclusively the core 1 disaccharide Gal β 1-3GalNAc (T-antigen) mainly substituted by one or two sialic acid residues. On the contrary, the main part of *O*-glycosylation sites of insect-produced protein were only substituted by a GalNAc residue (Tn-antigen). The *Sf*-9 cell line also synthesized Gal β 1-3GalNAc but in very low amount and, none of these *O*-glycans are substituted by sialic acid residues (Thomsen *et al.*, 1990). A characterization of the *O*-linked oligosaccharidic structures on a chimeric

respiratory syncytial virus protein as well as on a human interleukin 2 with artificially introduced *O*-glycosylation sites, expressed respectively in *Sf-9* and *Sf-21* cells, yielded to similar results : only GalNAc and Gal β 1-3GalNAc were found (Wathen *et al.*, 1991 ; Grabenhorst *et al.*, 1993).

The measurement of the two relevant *O*-glycosyltransferase activities performed in *Sf-9*, *Vero* and *Chinese Hamster Ovary* cells has revealed that, even if the three cell lines expressed comparable level of pp α GalNAc-T activity, there were high variations in core-1 β 1,3-Gal-T activity, with *Sf-9* cells containing the lowest level (Thomsen *et al.*, 1990). Recently, we have shown the binding of *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄ (BSI-B₄) which is specific for Gal β 1-3/4Gal sequences, to insect cells endogenous glycoproteins and, we characterized a new α 1,4-Gal-T activity specific to Gal β 1-3GalNAc in *Mb* cells*.

Considering the great diversity of *O*-glycan structures displayed in mammalian cells *O*-glycoproteins when compared to the short *O*-glycans observed in insect cell lines (Tn- and T-antigens which are rarely expressed in human normal adult cells), and the possible expression of new epitopes such as Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr (PT-antigen) which has never been described in mammalian tissues, we can presume that such changes in *O*-glycosylation could limit the development of the therapeutic glycoprotein production using the baculovirus expression system in lepidopteran cells. Indeed, this aberrant glycosylation pattern can cause a half life decrease after blood injection of the recombinant glycoprotein (Wright and Morrison 1994; Thotakura and Blithe, 1995), or can induce an immunogen response against normally cryptic peptide epitopes (Burchell *et al.*, 1989; Jerome *et al.*, 1991 ; Kotera *et al.*, 1994), as

* voir l'article n°3, page 144

well as against glycan epitopes normally absent in human (Galili *et al.*, 1984, 1985, 1987 and 1988; Castronovo *et al.*, 1987; Towbin *et al.*, 1987; Rother and Squinto, 1996).

To date, a better understanding of the biosynthesis of *O*-glycans is required in order to evaluate the suitability of insect cells as expression system and to plan strategies to modify their glycosylation capacity towards mammalian-like structures. Therefore, in order to shed lights on that biosynthetic pathway, we compared the potential of *O*-glycosylation of three non-infected lepidopteran cell lines, *Sf-9*, *Mb*, and *Tn*, cultivated in two different serum-free media used in pharmaceutical production processes (BM-25 and EX-CELL 401™) by using lectin's binding and glycosyltransferase assays.

Materials and methods

Lectins and reagents for revelation of Western blots.

Peroxydase-labeled lectins: *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄ (BSI-B₄-per), Soybean (*glycine max*) agglutinin (SBA-per), and DAB Tablets insoluble peroxidase substrate were from Sigma (St Louis, MO, USA). Digoxigenin-labeled lectins : *Maackia amurensis* agglutinin (MAA-dig), peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin (PNA-dig), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-dig), anti-digoxigenin Fab fragments conjugated with alkaline phosphatase, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (X-phosphate) and 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) were from Boehringer Mannheim (Germany). Gal, lactose (Galβ1-4Glc), αMe-Gal, Triton X-100 and sialidase from *Clostridium perfringens* were purchased from Sigma. Nitrocellulose membrane BioTrace NT was from Gelman Sciences (Ann Arbor, MI, USA).

Substrates and reagents for glycosyltransferase assays.

The radiolabeled nucleotide sugars : UDP-[1-³H]-GalNAc (888 Gbq / mmol) from New England Nuclear Chemicals (Dupont de Nemours, France), UDP-[6-³H]-Gal (650 Gbq / mmol) and CMP-[¹⁴C]-NeuAc (9 Gbq / mmol) from Amersham (France) were used after dilution with the corresponding cold nucleotide sugar from Sigma. The octapeptides TTSAPTTS and GTTPSPVP (in one letter code) both deduced from human MUC5AC tandem repeat sequences were custom synthesized by Neosystem (France). GalNAc α -O-bn, Gal β 1-3GalNAc α -O-bn, MES, PMSF, AMP, ATP, E64, angiotensin I and Triton X-100 were from Sigma. Dowex AG1 x 8 (100-200 mesh, Cl⁻ form) was purchased from BioRad, (France). Sep-Pak C₁₈ cartridges were from Waters Corp. (Milford, MA, USA).

Insect cells culture

The *Spodoptera frugiperda* clone Sf-9 of IPLB-Sf-21-AE cells (Vaughn *et al.*, 1977) was obtained from ATCC (CRL 1711) and the *Trichoplusia ni* clone Tn-5-B14 was kindly provided by Dr. A. Bernard (Glaxo Institute). The *Mamestra brassicae* clone SPCMb-92-C6 were established by J. M. Quiot at the *Station de Pathologie Comparée INRA / CNRS URA n° 1184* (unpublished data). The three cell lines were adapted, maintained and cultivated at 28°C in BM-25, a serum-free medium developed by J. M. Quiot (unpublished data) and in EX-CELL 401™ (Sera-Lab, UK), a semi-defined medium for the serum-free culture of lepidopteran insect cells. For positive control, human HT-29 MTX cells were used at day 21 and prepared for subsequent experiments as described by Huet *et al.* (1995).

Crude cellular homogenates and microsomal Preparations

For SDS-PAGE, 3 x 10⁷ cells were harvested at confluence and cell homogenates were prepared by lysing the cells at 0°C with 10 mM sodium cacodylate buffer pH 6.5, containing 1

% Triton X-100, 20 % glycerol, 0.5 mM dithiotreitol, and 5 mM MnCl₂ (1 ml per 2.5 x 10⁷ cells). After a 10 min incubation under continuous stirring, cell homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 15 min and the supernatants stored at -80°C until used. For enzymatic assays, 2 x 10⁸ cells were lysed by ultrasonication, 5 s pulsed at 0°C in 10 ml 0.25 M sucrose / 0.2 M NaCl solution. Microsomal suspensions were prepared by ultracentrifugation as previously described (Tetaert *et al.*, 1994) and stored at -80°C in NaCl / sucrose. Protein concentration was determined according to Peterson (1977) using bovine serum albumin as standard.

Electrophoresis and Western blotting

SDS-PAGE were performed under reducing conditions on 4 % - 20 % gradient polyacrylamide gels (Laemmli, 1970) using 40 µg of proteins per lane. After migration, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes as described by Vaessen *et al.* (1981). Each blot was then separated in two parts and treated with polyvinylpyrrolidone (2 % in TBS) prior to the incubation in TBS containing 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ with the following labeled-lectins : SBA-per (2 µg / ml), PNA-dig (2 µg / ml), BSI-B₄-per (2 µg / ml), SNA-dig (2 µg / ml), and MAA-dig (5 µg / ml). Incubations were performed with and without sugar competitors, by adding 0.5 M Gal to SBA-per, 0.2 M lactose to PNA-dig, 0.5 M αMe-Gal to BSI-B₄-per, or by treatment with 50 mU / ml of sialidase from *Clostridium perfringens* (in 50 mM citrate buffer pH 6.0, 0.9 % NaCl, 0.1 % CaCl₂) for 16 h at 37°C prior incubation with SNA-dig or MAA-dig. After washing, labeled glycoproteins with peroxydase-labeled lectins were revealed according to Sigma *Fast staining protocol* using DAB and Urea / H₂O₂. For digoxigenin-labeled lectins, the blots were incubated for 1 h with anti-digoxigenin alkaline phosphatase-labeled Fab fragments (1 µg / ml in TBS) and labeled glycoproteins were revealed by NBT / X-phosphate staining according to Boehringer *Glycan Detection Kit* protocol with minor modifications (Strub *et al.*, 1996).

Enzymatic assays

Assays were performed at least in duplicate. The incorporation of radioactive sugar residues was determined by subtraction of the radioactivity measured in the absence of exogenous acceptors and the results were expressed as average values as nmol of monosaccharide residues transferred per h and per mg of protein ($\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). The rates of all reactions were linear with time, at least for 2 h.

UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity - pp α GalNAc-T activity was measured in a total volume of 42 μl containing 0.125 M MES buffer pH 7.0, 12.5 mM MnCl_2 , 0.2 % Triton X-100, 1 mM E 64, 1.25 mM AMP, 1 mM PMSF, 1 mM UDP-[1- ^3H]-GalNAc (0.597 GBq / mmol; 25.1 kBq / 42 μl), 3 mM of the peptide substrate (TTSAPPTS or GTTPSPVP), and 5 μl microsomal preparations (35-50 μg of protein). Samples were incubated for 2 h at 37°C. Assay mixtures were diluted to 0.5 ml with 1 mM EDTA / borate buffer pH 9.1 to stop the reaction. Isolation of *O*-glycosylated peptides was performed by ion-exchange chromatography on 1 ml AG1 x 8 column (Cl⁻-form, 100-200 mesh) equilibrated in water as described previously (Tetaert *et al.*, 1994) for further analysis by capillary electrophoresis and MALD-MS.

UDP-Gal : core-1 β 1,3-galactosyltransferase activity - core-1 β 1,3-Gal-T activity was measured according to Brockhausen *et al.* (1995), in a total volume of 50 μl containing 0.125 M MES buffer pH 7.0, 12.5 mM MnCl_2 , 0.15 % Triton X-100, 5 mM γ -galactonolactone, 10 mM ATP, 1 mM UDP-[6- ^3H]-Gal (0.235 GBq / mmol; 11.75 kBq / 50 μl), 4 mM of GalNAc α 1-*O*-bn and 5 μl microsomal preparations (35-50 μg of protein). Samples were incubated for 1 h at 37°C. The reactions were stopped by adding 1 volume of ethanol, samples were centrifuged at 3,000 x g for 5 min and supernatants were applied to a Sep-Pak C₁₈

cartridge. After washing with 5 ml of water, elution was performed with 5 ml of 30 % acetonitrile in water.

UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase activity - The assay procedure for α 1,4-Gal-T was identical to that described above for core-1 β 1,3-Gal-T with the exception of the acceptor substrate (4 mM Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn).

CMP-NeuAc : Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase activity - Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase activities were measured according to Vandamme *et al.* (1992), in a total volume of 50 μ l containing 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 6.5, 12.5 mM MnCl₂, 0.15% Triton X-100, 4 mM Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn, 5 μ l microsomal fraction (35-50 μ g of protein) and 53 μ M CMP-[¹⁴C]-NeuAc (262 mCi / mmole 9.61 GBq / mmol; 36.7 kBq / 50 μ l). In order to increase the sensitivity of the assay CMP-[¹⁴C]-NeuAc was used without addition of non-radioactive compound. Samples were incubated for 4 h at 37°C and product was estimated by Sep-Pak C₁₈ cartridge assays.

Analysis of the O-glycosylated peptide products by Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry (MALD-MS).

The molecular weight of the products obtained by pp α GalNAc-T reaction using TTSAPTTS or GTTPSPVP as acceptor substrate was measured by MALD-MS on a Vision 2000 time-of-flight Mass Spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. The mass spectra were acquired in reflectron mode under 6 kV acceleration voltage and positive detection. The samples was prepared by mixing directly onto the target 1 μ l of the analyze solution (typically 50 pmol) and 1 μ l of a 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix solution (12 mg/ml in CH₃OH/H₂O, 70:30, vol./vol.), then allowed to crystallize at

room temperature. External calibration was performed using angiotensin I standard (MW : 1296.7). 10 shots were accumulated for the mass spectrum.

Separation of the O-glycosylated peptide products by Capillary Electrophoresis.

The capillary electrophoresis experiments were performed on a P/ACE system model 5000 (Beckman, Fullerton, CA, USA). Capillaries were fused silica from Beckman with an inner diameter of 75 μm and for a total length of 57 cm (effective length 50 cm) and the cartridges were cooled at 23°C for all runs. The samples were introduced at the positive electrode by pressure nitrogen at the concentration of 2 mg/ml (500 μg in 250 μl) using formic acid 2 M and, UV detection was made at 200 nm. Regeneration sequence by applying NaOH 0.1 M during 2 min and pure water during 2 min, was done between each run to obtain a good migration time reproducibility. The data collections and analyses were made with a Gold System software (version 810) from Beckman.

Results

Lectin analysis of cell homogenates

Homogenates from non-infected *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cells were fractionated by SDS-PAGE, Western blotted on nitrocellulose and incubated with a panel of lectins, with specificity listed in Table I. In order to be sure that no mammalian glycoproteins could contaminate insect cell homogenates, the cells were cultivated in two different serum-free media BM-25 and EX-CELL 401™.

Table I. Specificities of the lectins used for the characterization of O-glycans moiety of endogenous glycoproteins present onto three insect cell lines. *Sf-9*, *Mb* and *Tn*

lectin	Origin	Specificity (terminal sequence)	Reference
SBA	<i>Glycine max</i>	α/β -GalNAc	Lotan <i>et al.</i> , 1974
PNA	<i>Arachis hypogaeae</i>	Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser	Lotan <i>et al.</i> , 1975
BSI-B ₄	<i>Bandeiraea Simplicifolia</i> lectin I isolectin B ₄	Gal α 1-3/4Gal	Hayes <i>et al.</i> , 1974 Murphy <i>et al.</i> , 1977 Wu <i>et al.</i> , 1995
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	NeuAc α 2-3Gal	Wang and Cummings, 1988
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	NeuAc α 2-6Gal/GalNAc	Shibuya <i>et al.</i> , 1987

To control the lectin specific binding on the insect glycoproteins, incubations were performed in duplicate with or without the presence of competitor sugar. The specificity of the binding was proven by the total absence of staining observed when the lectin was incubated in the presence of the competitor sugar (data not shown)*. Before to go into details, we observed that the binding of the lectins revealed mainly high molecular weight 90-120 kDa bands with higher intensity when the cells were cultivated in EX-CELL 401™, whatever the cell lines and the lectins (Figure 1).

Affino-lectin blot with SBA - SBA bound strongly to the *Sf-9*, *Mb* and *Tn* glycoproteins with apparent molecular weights of 90-100 kDa for *Sf-9* homogenate, 100-110 kDa band and a weak 90 kDa signal for *Mb* cell, and 90-120 kDa wide band for *Tn* cell (Figure 1-A). The maximum intensity of the SBA signal was obtained with *Mb* glycoproteins when the *Mb* cell was cultivated in EX-CELL 401™ medium.

* Ces résultats sont présentés dans l'annexe, Figures 4 à 6, pages 140 à 142.

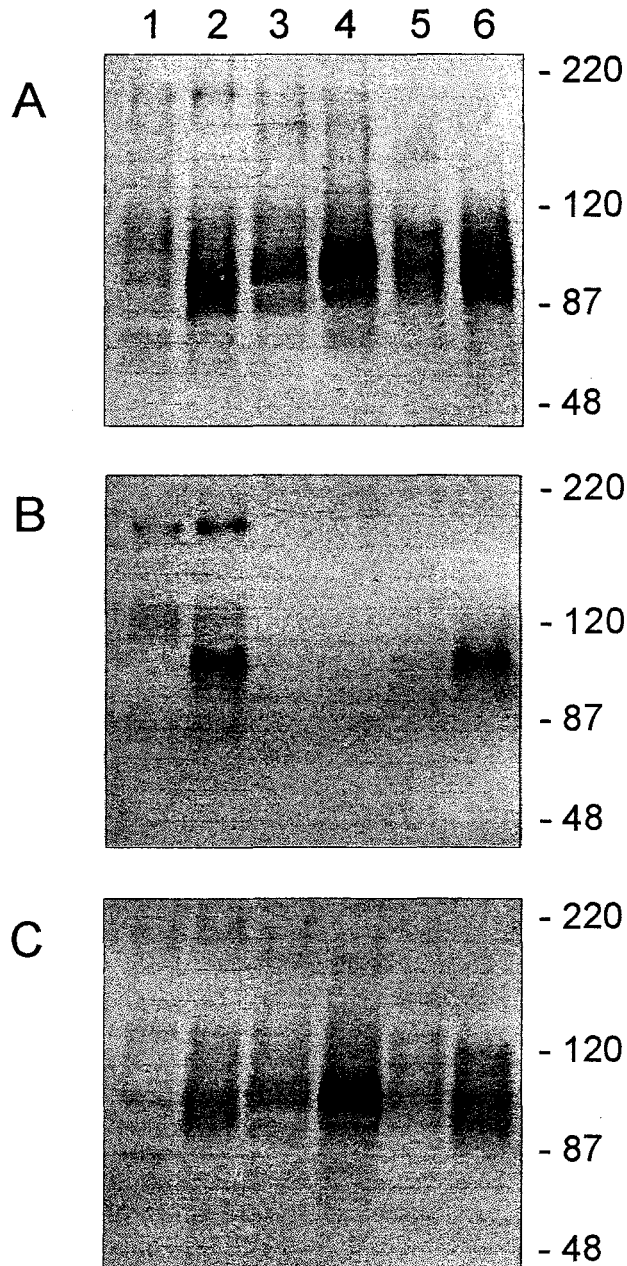


Figure 1: Binding of SBA, PNA and BSI-B₄ on endogenous glycoproteins from *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cell lines. After fractionation on 4-20 % SDS-PAGE gradient gel and Western blotting of the glycoproteins from *Sf-9* cultured in BM-25 (lane 1) or in EX-CELL 401™ (lane 2); *Mb* cultured in BM-25 (lane 3) or in EX-CELL 401™ (lane 4); and *Tn* cultured in BM-25 (lane 5) or in EX-CELL 401™ (lane 6), the endogenous glycoproteins were detected with (A) SBA, (B) PNA and (C) BSI-B₄. The position of the pre-stained molecular weight markers is indicated on the right side of the figure.

Affino-lectin blot with PNA - PNA revealed mainly a 110 kDa band in both *Sf-9* and *Tn* cells adapted in EX-CELL 401™, while only the *Tn* cell cultivated in BM-25 presents a similar 110 kDa band (Figure 1-B). Moreover, PNA recognizes with less intensity other endogenous glycoproteins of *Sf-9* homogenates with apparent molecular weights of 200 kDa, 130 kDa and 90 kDa respectively. Strikingly, no glycoprotein into *Mb* cells was recognized by PNA, whatever the culture medium used.

affino-lectin blot with BSI-B₄ - The three lepidopteran cell lines expressed glycoproteins, which were recognized by the α -Gal specific lectin BSI-B₄ (Figure 1-C). Moreover, the pattern of expression of the revealed bands was depending of the cell line and the highest staining was obtained with *Mb* glycoproteins. In *Mb*, a 100-110 kDa band was strongly revealed by BSI-B₄ compared to *Sf-9* or *Tn*. In *Sf-9*, BSI-B₄ revealed a large 95-105 kDa band with two other weak signals at 85 and 200 kDa. On *Tn* glycoproteins the staining was observed between 95 and 120 kDa with a major signal at 100-110 kDa.

Affino-lectin blots with SNA and MAA - No signal was observed on Western blots revealed by SNA or MAA (data not shown). These results strongly suggested that the endogenous glycoproteins of the different lepidopteran cell lines are deficient in sialic acids. That observation is in contrast with those provided by Davis and Wood (1995) which Western affino-lectin blots were performed with non-infected *Sf-21* and *Tn* cell lines, but cultivated in a 10 % fetal bovine serum supplemented medium.

Glycosyltransferase activities

UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity - The analysis of the *in vitro* incubation reactions using MUC5AC mucin motif peptides as substrate (GTTPSPVP and TTSAPTTS respectively) indicated varying [³H]-GalNAc incorporation rates for the three insect cell lines according to the medium but essentially higher than the control HT-29 MTX

human cell line (Table II). For each insect cell line, the culture medium have a weak effect on the pp α GalNAc-T activity. When using GTTPSPVP, the pp α GalNAc-T activities were 3 to 7-fold higher than when using TTSAPTTS. Finally, the highest incorporation rate was observed when the microsomal fraction of *Mb* cell line cultivated in EX-CELL 401™ was incubated with the peptide GTTPSPVP. In that case, the amount of GalNAc residues transferred appeared to be 2-fold higher than with HT29 MTX microsomal fraction.

Table II. Polypeptide α -GalNAc transferase, core 1 β 3-Gal-transferase and α 4-Gal-transferase activities in *Sf-9*, *Mb* or *Tn* cell lines cultivated in BM-25 or EX-CELL 401™ media. Enzymatic activities are expressed as average values in nmol.h⁻¹.mg⁻¹. Human adenocarcinoma cell line HT-29 MTX are used as control.

Cell / medium	pp α GalNAc-T		core 1 β 3-Gal-T	α 4-Gal-T
	TTSAPTTS ¹	GTTPSPVP		
<i>Sf-9</i> / BM-25	57.7+/-9.4	411.4+/-9.4	0.8+/-0.1	n.d. ²
<i>Mb</i> / BM-25	70.4+/-6.4	330.0+/-13.1	4.2+/-0.0	71.7+/-8.7
<i>Tn</i> / BM-25	125.8+/-9.2	340.2+/-11.6	0.3+/-0.0	0.1+/-0.0
<i>Sf-9</i> / EX-CELL 401™	111.9+/-10.0	460.4+/-25.4	1.7+/-0.1	n.d.
<i>Mb</i> / EX-CELL 401™	76.4+/-7.2	517.0+/-7.2	7.0+/-0.7	103.5+/-7.1
<i>Tn</i> / EX-CELL 401™	116.2+/-13.1	417.5+/-18.4	0.2+/-0.0	0.2+/-0.0
HT-29 MTX	71.0+/-13.8	264.3+/-13.8	25.0+/-0.5	n.d.

¹ pp α GalNAc-T was measured using two octapeptides (GTTPSPVP and TTSAPTTS) as acceptor substrates, both deriving from MUC5AC tandem repeat motif.

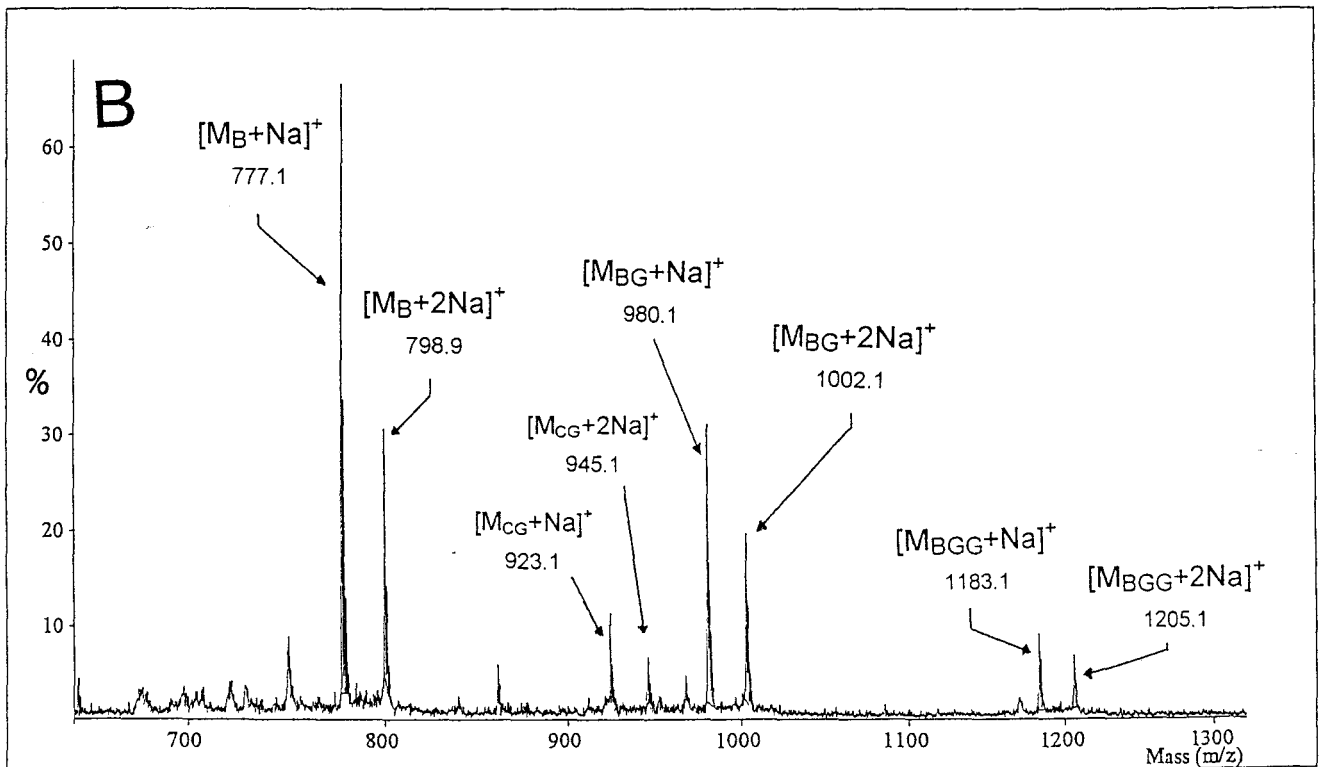
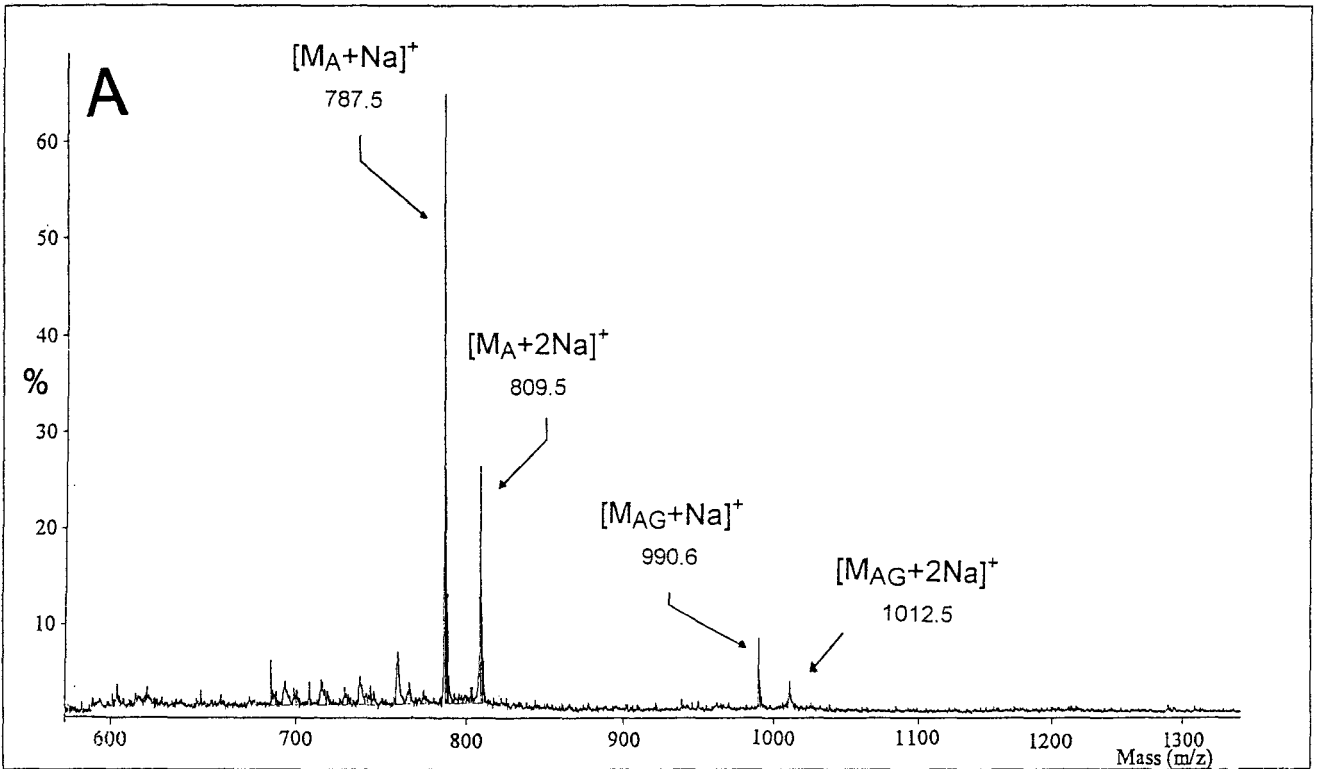
² not detected.

Analysis of O-glycosylated product - The analysis of the glycosylation products of both MUC5AC motif peptides obtained using HT-29 cells homogenate as enzyme source has shown preferential transfer of GalNAc residue to Thr residues: for TTSAPTTS, one-linked Thr 2 position was found; whereas for GTTPSPVP peptide, Thr 2 and 3 were substituted (Hennebicq *et al.*, personal communication). The analysis by MALD-MS confirmed that *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cells formed also one salted mono-glycosylated peptide ($[M_{AG}+Na]^+ = 990.6$ m/z and $[M_{AG}+2Na]^+ = 1012.5$ m/z) using TTSAPTTS ($[M_A+Na]^+ = 787.5$ m/z and $[M_A+2Na]^+ = 809.5$ m/z) as substrate (the data obtained with *Sf-9* adapted in EX-CELL 401™ are shown in Figure 2-A). Using GTTPSPVP peptide ($[M_B+Na]^+ = 777.1$ m/z and $[M_B+2Na]^+ = 798.9$ m/z), mono- ($[M_{BG}+Na]^+ = 980.1$ m/z and $[M_{BG}+2Na]^+ = 1002.1$ m/z) and di-*O*-linked GalNAc peptides ($[M_{BGG}+Na]^+ = 1183.1$ m/z and $[M_{BGG}+2Na]^+ = 1205.1$ m/z) were observed (the data obtained with *Sf-9* adapted in EX-CELL 401™ are shown in Figure 2-B). It has been noted that a mono-*O*-linked GalNAc TTPSPVP peptide was observed ($[M_{CG}+Na]^+ = 923.1$ m/z and $[M_{CG}+2Na]^+ = 945.1$ m/z).

To visualize discrepancies in *O*-glycosylation of GTTPSPVP peptide between the different microsomal preparations, the *O*-glycosylated samples were analyzed by capillary electrophoresis as described previously by Tetaert *et al.* (1994). In agreement with MALD-MS, the capillary electrophoretic profiles at 200 nm revealed that the three insect cell lines, either adapted in EX-CELL 401™ (data not shown) or in BM-25 (Figure 3)*, have ppαGalNAc-T activities which transferred up to two *O*-linked-GalNAc on GTTPSPVP. The areas of the mono- and the di-glycosylated peptide signals from each electrophoretic profiles shown that the GTTPSPVP peptide was predominantly mono-glycosylated in *Sf-9* and *Tn* assays (Figure 3-A and -C).

* Le contrôle négatif de l'électrophorèse capillaire est présenté en annexe, Figure 7, page 143.

Figure 2: MALD-MS spectra of the glycosylation products obtained using Sf-9 (adapted in EX-CELL 401™) microsomal preparation as enzyme source. (A) TTSAPPTS as acceptor peptide: M_A , observed mass of the TTSAPPTS peptide; M_{AG} , observed mass of the mono-O-linked GalNAc peptide; (B) GTTPSPVP as acceptor peptide: M_B , observed mass of the GTTPSPVP peptide; M_{BG} , observed mass of the mono-O-linked GalNAc peptide; M_{BGG} , observed mass of the di-O-linked GalNAc peptide; M_{CG} observed mass of the mono-O-linked GalNAc peptide TTPSPVP.



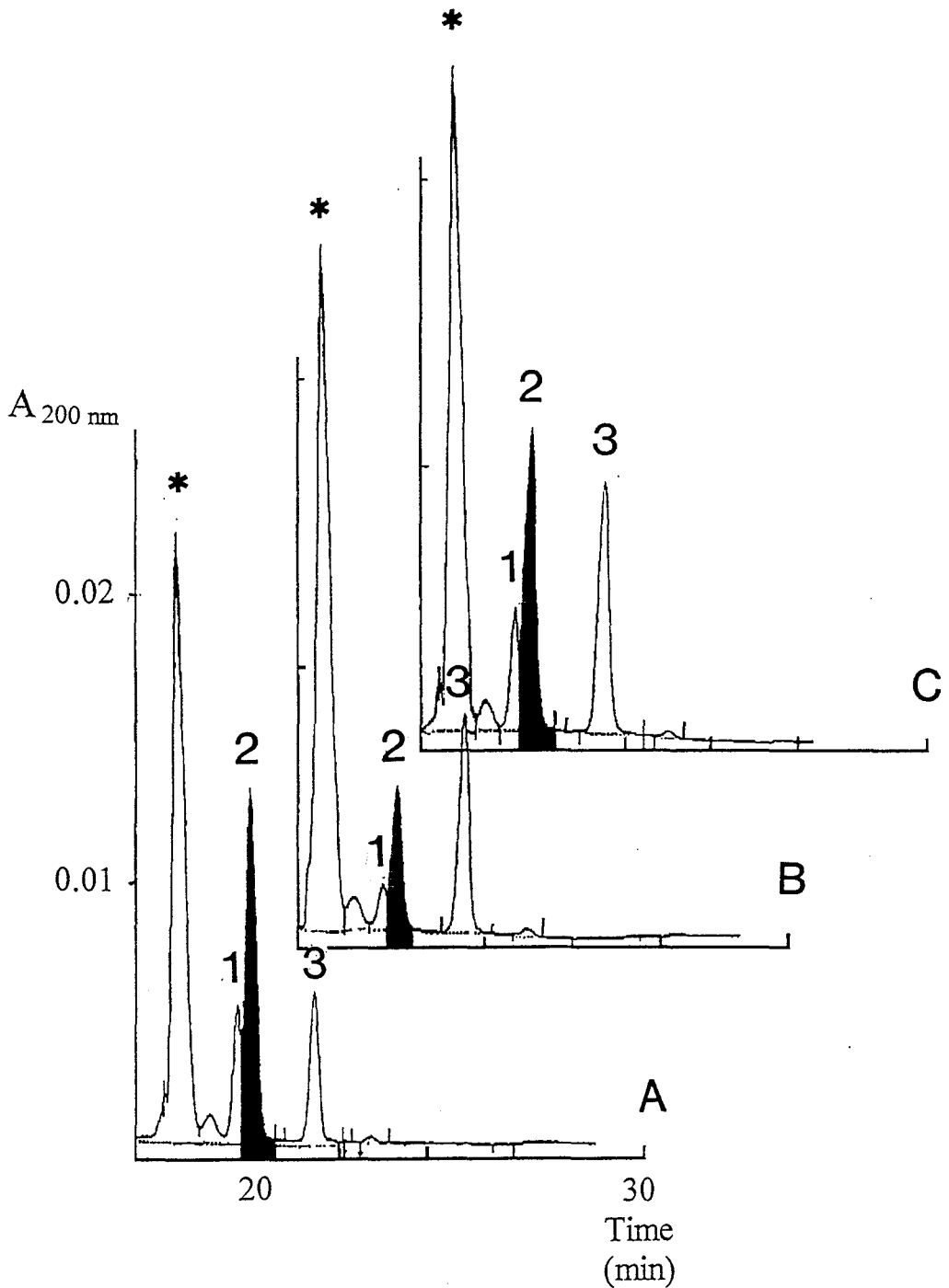


Figure 3: Capillary electrophoresis profiles of the glycosylation products obtained by incubation of GTTPSPVP as peptide substrate and the microsomal preparations of *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cells adapted in BM-25. Analysis of the glycopeptides formed (1) mono-*O*-linked-GalNAc peptides TTPSPVP + 1 GalNAc, (2) mono-*O*-linked-GalNAc peptides GTTPSPVP + 1 GalNAc and (3) di-*O*-linked-GalNAc peptides GTTPSPVP + 2 GalNAc by the pp α GalNAc-T assays using (A) *Sf-9*, (B) *Mb* and (C) *Tn* cells. * GTTPSPVP peptide substrate.

The pp α GalNAc-T experiments performed with *Mb* cells adapted in BM-25 revealed that the ratio between mono- and di-*O*-linked GalNAc peptide fractions was reversed: i.e. area Fraction 3 (di-*O*-linked GalNAc) was larger than the Fraction 2 (one-linked GalNAc) after reaction using the *Mb* microsomal homogenate (Figure 3-B). When *Mb* cells were cultivated in EX-CELL 401™, we observed an equal proportion of mono- and di-*O*-linked-GalNAc peptides.

Core-1 β 1,3-galactosyltransferase activity - Core-1 β 1,3-Gal-T activity in all the lepidopteran cells was 8-10 fold lower than those determined with HT-29 MTX microsomes. Significant differences were noted among the insect cell lines, and the highest transfer of Gal residue on GalNAc α 1-*O*-bn acceptor substrate was obtained with *Mb* cell (4.2 - 7.0 nmol.h⁻¹.mg⁻¹) and, such core-1 β 1,3-Gal-T activity appeared 4-5 fold lower in *Sf*-9 whereas a decrease until 15-35 fold was detected in *Tn* cell line. An increase of the core-1 β 1,3-Gal-T activity was noted when *Sf*-9 or *Mb* cells were cultivated in EX-CELL 401™ medium, while the core-1 β 1,3-Gal-T activity was negligible in *Tn* cell whatever the culture medium used.

UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase activity - In an associated paper, we demonstrated for the first time the occurrence of an α 1,4-Gal-T in *Mb* lepidopteran cell*. In an attempt to detect the α 1,4-Gal-T activity in *Sf*-9 and *Tn* cells, the *Mb* cells were used as positive control (71.7-103.5 nmol.h⁻¹.mg⁻¹). However, it has been observed that *Sf*-9 cells lack the ability to transfer Gal residue on Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn acceptor substrate, while in *Tn* microsomal homogenate only a very weak transfer was measured (0.1-0.2 nmol.h⁻¹.mg⁻¹).

* voir l'article n°3, page 144.

Therefore, *Mb* remains to date the unique cell line which is known to contain an enzyme catalyzing the addition of a Gal residue α -1,4-linked to T-antigen.

It is interesting to point out that both *Mb* core-1 β 1,3-Gal-T and α 1,4-Gal-T activities were culture medium dependent, both increasing when *Mb* cells were grown in EX-CELL 401™ medium. Although among the three insect cell types, *Mb* had the higher core-1 β 1,3-Gal-T activity, this activity was 15-fold lower than the α 1,4-Gal-T activity.

Sialyltransferase assays - No sialyltransferase activity was detected in the three insect cell lines, independently of the nature of the acceptor substrate: Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn and asialo-fetuin for Gal β 1-3GalNAc α 2,3-sialyltransferase activity, or asialo-bovine submaxillary mucin for R-GalNAc α 1-*O*-Ser α 2,6-sialyltransferase activity. On the contrary, the activities of HT-29 MTX cell lines were positive controlled (data not shown)

Discussion

A foremost view of the potential of *O*-glycosylation is presented here for three lepidopteran cell lines : *Sf*-9, *Mb* and *Tn*. These cells are cultivated in two different serum-free media : BM-25 that contains the minimum of compounds necessary to maintain insect cell development and EX-CELL 401™ which is a semi-defined rich medium*. In this report, we showed by affinity lectin blots using SBA, PNA, and BSI-B₄ that the insect cell lines express three short *O*-glycan structures: GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr (Tn-antigen), Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr (T-antigen) and Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr (PT-antigen). Taking into account the expression of these structures, we have also determined the activity of three glycosyltransferases: the

* the exact composition of both free-medium BM-25 and EX-CELL 401™ did not be available.

pp α GalNAc-T, the core-1 β 1,3-Gal-T and the α 1,4-Gal-T newly characterized in *Mb* cells*. These enzymatic activities have been determined using various acceptor substrates, two octapeptides deriving from the structure of MUC5AC apomucin tandem-repeat sequences (TTSAPTTS and GTTPSPVP) for the pp α GalNAc-T activity, GalNAc α 1-*O*-bn for the core-1 β 1,3-Gal-T activity, and Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn for the α 1,4-Gal-T activity (Brockhausen *et al.*, 1995; Tetaert *et al.*, 1994). One of the most predominant and consistent biosynthesis changes in the *O*-glycosylation potential of each cell line was observed when the culture medium was changed from BM-25 to EX-CELL 401™. Indeed, EX-CELL 401™ medium increased the amount of *O*-glycans expressed by lepidopteran cells. That enhancement of the *O*-glycosylation was due, at least in part, to an increase of the corresponding glycosyltransferase activities.

To address the question of the ability of insect cells to catalyze the transfer of sialic acid residues, as it was previously reported (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a and 1991b; Davis and Wood, 1995), the three cell lines were adapted and cultivated in serum-free media to avoid interferences with mammalian glycoproteins. On the basis of the binding of SNA or MAA which respectively recognized NeuAc α 2-6Gal/GalNAc and NeuAc α 2-3Gal terminal sequences, we have clearly shown that *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cells lack sialic acid residue on terminal position of *N*- and *O*-glycans. Moreover, no sialyltransferase activity could be detected whatever the acceptors used.

The three lepidopteran cell lines have in common some characteristics concerning the *O*-glycosylation potential. Firstly, when compared to the great diversity of proteins separated by SDS-PAGE and revealed by Coomassie blue staining (data not shown), the lectin binding

* voir l'article n°3, page 144.

revealed only a limited number of bands in the range of molecular weight from 90 to 120 kDa. Secondly, the different cell lines are characterized by a high activity of the pp α GalNAc-T compared to that usually measured in mammalian cells, as HT-29 MTX cells. In contrast, the core-1 β 1,3-Gal-T activity measured in *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cells appeared very weak compared to control cells. These differences in enzymatic activity could be an explanation for the strong binding of SBA on insect cell glycoproteins. Although a β 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase enzymatic activity catalyzing the transfer of GalNAc residue to oligosaccharide with a terminal β -linked GlcNAc was recently reported in *Sf-9*, *Mb* and *Tn* (Van Die *et al.*, 1996), it is well known that endogenous *N*-glycan structures in insect cell glycoproteins possess a small amount of oligosaccharides with terminal GalNAc residues (Hard *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994). Consequently, the binding of SBA on lepidopteran endogenous glycoproteins seems to be mainly on Tn-antigen.

Going into more details, a good correlation exists between the *O*-glycan structures and the activity of glycosyltransferases in *Mb* and *Sf-9* cells. In *Sf-9* cells, the strong SBA binding is in agreement with a high pp α GalNAc-T activity and, the low binding of PNA fits well with the weak core-1 β 1,3-Gal-T activity that we have measured in these cells and as it has been previously observed (Thomsen *et al.*, 1990). In parallel, no α 1,4-Gal-T activity was measured in *Sf-9* microsomal fraction. Therefore, the binding of BSI-B₄ on *Sf-9* glycoproteins could reflect the presence of Gal α 1-3/4Gal sequences in terminal position of oligosaccharidic structures different from the T-antigen. Concerning *Mb* cells, which expressed the highest pp α GalNAc-T activity, we have also observed a strong binding of SBA, showing that *Mb* cell glycoproteins are substituted by Tn structures. However, although the activity of the core-1 β 1,3-Gal-T measured in these cells was 4-fold higher than in *Sf-9*, no staining was observed with PNA. This observation could be explained by the characterization of a high

galactosyltransferase activity transferring a Gal residue in α 1,4-linkage to the T-antigen. This observation leads us to a better understanding of the biosynthesis of *O*-glycans in *Mb* cells, where three glycosyltransferase activities are responsible for the expression of two *O*-glycans : Tn- and PT-antigens. In contrast, in *Tn* cells it is more difficult to correlate the *O*-glycan structures and the activity of glycosyltransferases. PNA recognized a 110 kDa band, while the core-1 β 1,3-Gal-T activity is almost absent. Such apparent discrepancy could be explained by: (i) the high expression of *O*-GalNAc linked protein substrate, (ii) the absence of later processing steps, or (iii) by the fact that the aryl-glycoside used as substrate prevented the core-1 β 1,3-Gal-T measurement, as most glycopeptides were excellent substrates for core-1 β 1,3-Gal-T compared to GalNAc α 1-*O*-bn (Granovsky *et al.*, 1994). Concerning the binding of BSI-B₄ on *Tn* glycoproteins without significant α 1,4-Gal-T activity, the same hypothesis as for *Sf*-9 cells could be provided.

The insect cell lines having in common to express a large amount of Tn-antigen, we have focused our experiments to better characterize their pp α GalNAc-T activity. The analysis by MALD-MS and capillary electrophoresis of the products of transfer of GalNAc from the different incubation reactions using the octapeptide GTTPSPVP as substrate, have shown that the three insect cell lines expressed a pp α GalNAc-T activity which forms both mono- and di-*O*-linked-GalNAc GTTPSPVP peptides (Figure 2 and 3). The comparison of the areas of the mono- and di-glycosylated peptide signals from each capillary electrophoretic profiles have shown that *Sf*-9 and *Tn* microsomal fractions preferentially transfer one GalNAc residue to GTTPSPVP peptide. In contrast, the mono-*O*-linked-GalNAc peptide seemed to be a better substrate for the *Mb* pp α GalNAc-T activity and therefore, the amount of the di-substituted peptide was equal or higher than the mono-substituted compound. These results clearly indicated that the *Mb* pp α GalNAc-T activity is different from those expressed in *Sf*-9 and *Tn* cells, and argue in favor of the presence among lepidopteran cell lines of at least two different

pp α GalNAc-T activities. Nevertheless, we do not know if the initiation of *O*-glycosylation in each lepidopteran cell line required a family of pp α GalNAc-T, as it was recently reported for mammals (Clausen and Bennett, 1996; Marth, 1996),.

The culture medium highly influences the *O*-glycosylation potential of insect cell lines. The different glycosyltransferase activities were almost 2-fold decreased when the cell lines were adapted in BM-25, in comparison to the same clone cultivated in EX-CELL 401™. The choice of BM-25 medium induced a partial disappearance of the Tn, T or PT-antigens, and that phenomenon could be explained, at least in part, by the decrease of glycosyltransferase activities in lepidopteran cells. This indicated that a change in the composition of the culture medium affect quantitatively the potential of glycosylation of the lepidopteran cells and thus, could modulate the antigenicity of the recombinant glycoproteins expressed in the baculovirus / insect cell system.

The characterization in *Mb* cells of an enzyme able to transfer a Gal residue in α 1-4-linked position to the T-antigen and the high activity of this *Mb* α 1,4-Gal-T allow to consider synthesis of important quantity of the aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn in order to study possible applications of the trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc* .

In conclusion, Tn- and T-antigens, which are the shorter *O*-glycan structures, can be synthesized in both insect and mammalian cells. However, as the insect *O*-glycosylation is less diversified than the one found in mammalian cells, such reduction in the length and complexity of the side chains can cause the exposure of cryptic peptide epitopes on recombinant *O*-glycoproteins expressed in the baculovirus / insect cell system. In addition, the oligosaccharidic

* Voir l'article n°3, page 144.

epitope PT-antigen normally absent in mammalian cells and found in *Mb* cell line, could be strongly antigenic in human. The choice of the most adapted insect cell line is shown to be of importance for the production of recombinant *O*-glycoproteins and, that underlined the fact that the change of the culture medium can cause an increase (in EX-CELL 401™) or decrease (in BM-25) of the *O*-glycosylation capacities of the insect cell lines.

Acknowledgments

We thank C. Richet and D. Demeyez for their helpful technical assistance in capillary electrophoresis separations. The authors are grateful to the Pr. Gérard Devauchelle, « Station de Pathologie des Comparée INRA / Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1184 », for his constant interest and support, to the Pr. Jean Montreuil and Dr. Jean-Claude Michalski « Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111 » for their helpful discussions. This work has been supported by the M.E.N.E.S.R.: « Actions Concertées Coordonnées des Sciences du Vivant, ACC-SV14 n° 9514111, Réseau G-Trec ».

References

- Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E. and Glössl, J. (1993) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. *N*-Acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology*, **3**, 619-625.
- Bock, K., Breimer, M.E., Brignole, A., Hansson, G.C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Leffler, H., Samuelsson, B.E., Strömberg, N., Edén, C.S. and Thurin, J. (1985) Specificity of binding of the strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal α 1-4Gal-containing glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8545-8551.
- Branley, B.K., Sweidler, S.J. and Robbins, P.W. (1990) Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell*, **63**, 861-863.
- Brockhausen, I., Yang, J.M., Burchell, J., Whitehouse, C. and Taylor-Papadimitriou, J. (1995) Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 607-617.
- Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S. and Duhig, T. (1989) A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. Cancer*, **44**, 691-696.
- Butters, T.D. and Hughes, R.C. (1981) Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 655-671.
- Castronovo, V., Foidart, J.M., Li Vecchi, Foidart, J.B., Bracke, M., Mareel, M. and Mahieu, P. (1987) Human anti-galactosyl IgG reduces the lung colonization by murin MO4 cells. *Invasion Metastasis*, **7**, 325-345.
- Chatterjee, S., Klullar, M. and Shi, W.Y. (1995) Digalactosylceramide is the receptor for staphylococcal enterotoxin-B in human kidney proximal tubular cells. *Glycobiology*, **5**, 327-333.
- Chen, W., Shen, Q. and Bahl, O.P. (1991) Carbohydrate variant of the recombinant β -subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4081-4087.
- Clausen, H. and Bennett, E.P. (1996) A family of UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type *O*-linked glycosylation. *Glycobiology*, **6**, 635-646.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991a) Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503) *Biochemistry*, **30**, 6689-6696.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b) Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf-21AE) cells. *Biochemistry*, **30**, 6167-6174

- Davidson, D.J., Fraser, M.J. and Castellino, F.J. (1990) Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochemistry*, **29**, 5584-5590.
- Davis, T.R. and Wood, H.A. (1995) Intrinsic glycosylation potentials of insect cell cultures and insect larvae. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **31**, 659-663.
- Elbein, A.D. (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of *N*-linked oligosaccharide chains. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 497-534.
- Galili, U., Buehler, J., Shoheit, S.B. and Macher, B.A. (1987) The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J. Exp. Med.*, **165**, 693-704.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shoheit, S.B. (1985) Human natural anti- α -galactosyl IgG. II. The specific recognition of $\alpha(1-3)$ -linked galactose residues. *J. Exp. Med.*, **162**, 573-582.
- Galili, U., Rachmilewitz, E.A., Peleg, A. and Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.*, **160**, 1519-1531.
- Galili, U., Shoheit, S.B., Kobrin, E., Stults, C.L.M. and Macher, B.A. (1988) Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cell. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17755-17762.
- Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jäger, V. and Conradt, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus -infected *Sf-21* cells. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189-197.
- Granovsky, M., Bielfeldt, T., Peters, S., Paulson, H., Meldal, M., Brockhausen, J and Brockhausen, I (1994) UDPgalactose : glycoprotein-*N*-acetyl-D-galactosamine-3- β -D-galactosyltransferase activity synthesizing *O*-glycan core 1 is controlled by amino acid sequence and glycosylation of glycopeptide substrates. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 1039-1046.
- Haataja, S., Tikkanen, K., Luikkonen, J. François-Gérard, C. and Finne, J. (1993) Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4311-4317.
- Haataja, S., Tikkanen, K., Nilsson, U., Magnusson, G., Karlsson, K.A. and Finne, J. (1994) Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal α 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27466-27472.
- Hard, K., Van Doorn, J.M., Thomas-Oates, J.E., Kamerling, J.P. and Van Der Horst, D.J. (1993) Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein III from the insect *Locusta migratoria*. Carbohydrate-linked 2-Aminoethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein. *Biochemistry*, **32**, 766-775.
- Hayes, C.E. and Goldstein, I. J. (1974) An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1904-1914.

- Holgersson, J., Jovall, P.A., Samuelsson, B.E. and Breimer, M.E. (1990) Structural characterization of non-acid glycosphingolipids in kidneys of single blood group O and A pigs. *J. Biochem.*, **108**, 766-777.
- Holgersson, J., Jovall, P.A., Samuelsson, B.E. and Breimer, M.E. (1990) Structural characterization of non-acid glycosphingolipids in kidneys of single blood group O and A pigs. *J. Biochem.*, **108**, 766-777.
- Hsieh, P. and Robbins, P.W. (1984) Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing: Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2375-2382.
- Huet, G., Kim, I., De Bolos, C., Lo-Guidice, J.M., Moreau, O., Hemon, B., Richet, C., Delannoy, P., Real, F.X. and Degand, P. (1995) *Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucus-secreting HT-29 cell subpopulation*. *J. Cell Sci.*, **108**, 1275-1285.
- Jarvis, D. L. and Summers, M. D. (1989) Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 214-223.
- Jarvis, D.L., Oker-Blom, C. and Summers, M.D. (1990) Role of glycosylation in the transport of recombinant glycoproteins through the secretory pathway of lepidopteran insect cells. *J. Cell Biochem.*, **42**, 181-191.
- Jerome, K.R., Barnd, D.L., Bendt, K.M., Boyer, C.M., Taylor-Papadimitriou, J., Mc Kenzie, I.F.C. Jr and Finn, O.J. (1991) Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.*, **51**, 2908-2916.
- Kang, C.Y. (1988) Baculovirus vectors for expression of foreign genes. *Adv. Virus Res.*, **35**, 177-192.
- Klenk, H.-D. (1990) Influence of glycosylation on antigenicity of viral proteins, In: van Regenmortel, M.H.V and Neurath, A.R. (eds), *Immunochemistry of Viruses, II. The Basis of Serodiagnosis and Vaccines*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 25-37.
- Kobata, A. (1992) Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 483-501.
- Kotera, Y., Fontenot, J., Pecher, G., Metzgar, R.S. and Finn, O.J. (1994) Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.*, **54**, 2856-2860.
- Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and März, L. (1994) Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (*Sf*-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 148-157.
- Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. (1993) Primary structure of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1193-1204.

Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector *Virology*, **174**, 418-429.

Kuroda, K., Gröner, A., Frese, K., Drenckhahn, D., Hauser, C., Rott, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae. *J. Virol.*, **63**, 1677-1685.

Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D. and Doerfler, W. (1986) Expression of the influenza virus hemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.*, **5**, 1359-1365.

Kuroda, K., Veit, M. and Klenk, H.-D. (1991) Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology*, **180**, 159-165.

Laemmly, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-681.

Lanne, B., Jondal, M. and Karlsson, K.A. (1996) Gal α 1-4Gal-binding antibodies: specificity and use for the mapping of glycolipids of burkitt lymphoma and other human tumors. *Glycobiology*, **6**, 423-431.

Lindberg, A.A., Brown, J.E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J.E. and Karlsson, K.A. (1987) Identification of a carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1779-1785.

Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J. L., De Grandis, S. and Karmali, M. (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8834-8839.

Lis, H. and Sharon, N. (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 1-27.

Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chabihi, H., Chirat, F., Harduin-Lepers, A., Cerutti, M., Verbert, A. and Delannoy, P. (1997) Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in *Mamestra brassicae* cells. *Glycobiology*, **7**, in press.

Lotan, R., Siegelman, H.W., Lis, H. and Sharon, N. (1974) Subunit structure of soybean agglutinin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1219-1224.

Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D. and Sharon, N. (1975) The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from Peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.*, **250**, 8518-8523.

Luckow, V.A and Summers. M.D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, **6**, 47-55.

Lundblad, A., Svensson, S., Löw, B., Messeter, L. and Cedergren, B. (1980) Release of oligosaccharides from human erythrocyte membranes of different blood-group-P phenotypes by trifluoroacetylolysis. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 323-330.

- Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H.-W. and Fountoulakis, M. (1994) Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of the soluble human interferon receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Protein Science*, **3**, 30-38.
- Marth, J.D. (1996) Complexity in *O*-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl-transferases. *Glycobiology*, **6**, 701-705.
- Miller, L.K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177-199.
- Munk, K., Pritzer, E., Kretzschmar, E., Gutte, B., Garten, W. and Klenk, H.-D. (1992) Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus hemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*, **2**, 233-240.
- Murphy, L.A. and Goldstein, I.J. (1977) Five α -D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4739-4742.
- Murphy, L.A. and Goldstein, I.J. (1977) Five α -D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4739-4742.
- Noteborn, M.H.M., Kant, A., Eijdens, E.W.H.M., De Boer, GF, Van Der Eb, A.J. and Koch, G. (1992) Immunogenic properties of avian leukosis virus env-proteins synthesized with a baculovirus expression vector. In Vlak, J.M., Schlaeger, E.-J. and Bernard, A.R. (eds), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes* Editiones Roche, Basel, Switzerland, 92-97.
- Ogonah, W.O., Freedman, R. B., Jenkins, N., Patel, K. and Rooney, B.C. (1996) Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex *N*-linked glycosylation on recombinant proteins. *Bio/Technology*, **14**, 197-202.
- Olden, K., Parent, J.B. and White, S.L. (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins. A reevaluation of their function. *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 209-232.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. (1994) Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. Oxford University Press, New York.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**, 346-356.
- Ponimaskin, E., Veit, M. and Schmidt, M.F.G. (1994) Expression of the Sendai virus fusion protein in insect cells and characterization of its posttranslational modifications. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1163-1167.
- Rademacher, T.W., Parekh, R.B. and Dwek, R.A. (1988) Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 785-838.
- Rother, R.P. and Squinto, P.S. (1996) The α -galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell*, **86**, 185-188.
- Shibuya, N, Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. and Peumans, W.J. (1987) The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark Lectin Recognizes the Neu5Ac(α -6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1596-1601.

- Springer, T.A. and Lasley, L.A. (1991) Sticky sugars for selectins. *Nature*, **349**,196-197.
- Staudacher, E., Altmann, F., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. (1992a) α 1-6(α 1-3)-Difucosylation of the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A₂. *Glycoconjugate J.*, **9**, 82-85
- Staudacher, E., Kubelka, V. and März, L. (1992b) Distinct *N*-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 987-993
- Strub, J. M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C, Lopez, M, Moniatte, M, Van Dorsselaer, A, Aunis, D. and Metz-Boutigue, M. A.. (1996) Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28533-28540.
- Takeuchi, M. and Kobata, A. (1991) Structures and fonction roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*, **349**, 196-197.
- Tetaert, D., Soudan, B., Lo-Guidice, J. M., Richet, C., Degand, P., Boussard, G., Mariller, C. and Spik, G. (1994) Combination of high-performance anion-exchange chromatography and electrospray mass spectrometry for analysis of the in vitro *O*-glycosylated mucin motif peptide. *J. Chromatogr.*, **658**, 31-38.
- Thomsen, D. R., Post, L. E. and Elhammer, A. P. (1990) Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9. *J. Cell. Biochem.*, **43**, 67-79.
- Thotakura, N. R. and Blithe, D. L. (1995) Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotrophins, thyrotrophin and free α subunit. *Glycobiology*, **5**, 3-10.
- Towbin, H., Rosenfelder, G., Wieslander, J., Avila, J.L., Rojas, M., Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H. and Timpl, R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.*, **166**, 419-432.
- Vaessen, R. T., Kreike, J. and Groot, G.S.P. (1981) Protein transfer to nitrocellulose filters. *FEBS Lett.*, **124**, 193-196.
- Van Die, I., Van Tetering, A., Bakker, H., Van den Eijnden, D.H. and Joziassse, D.H (1996) Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a β 1-4-*N*-acetylgalactosyl-transferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, **6**, 157-164
- Vandamme, V., Cazlaris, H., Le Marer, N., Laudet, V., Lagrou, C., Verbert, A. and Delannoy, P. (1992) Comparison of sialyl- and α 1,3-galactosyltransferase activity in NIH3T3 transformed with the *ras* oncogene : increased β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *Biochimie*, **74**, 89-100.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. and McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, **13**, 213-217.

- Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.
- Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N. and Castellino, F.J. (1993) The presence of UDP-*N*-acetylglucosamine:α-3-D-mannoside β1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-*Sf*-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17902-17907.
- Voss, T., Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.
- Wang, W.C. and Cummings, R.D. (1988) The immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α-2,3 to penultimate galactose residues. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4576-4585.
- Wathen, M.W., Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1991) Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line *Sf*-9. *Biochemistry*, **30**, 2863-2868.
- Williams, P.J., Wormald, M. R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Parker, G.F. and Roberts, D.R. (1991) Characterization of oligosaccharides from *Drosophila melanogaster* glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1075**, 146-153.
- Wojczyk, B., Shakin-Eshleman, S.H., Doms, R.W., Xiang, Z.Q., Ertl, H.C.J., Wunner, W.H. and Spitalnik, S.L. (1995) Stable secretion of a soluble oligomeric form of rabies virus glycoprotein: influence of *N*-glycan. Processing on secretion. *Biochemistry*, **34**, 2599-2609.
- Wright, A. and Morrison, S.L. (1994) Effect of altered C_H2-associate carbohydrate structure on the functional properties and *in vivo* fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J. Exp. Med.*, **180**, 1087-1096.
- Wu, M., Song, S.C., Wu, J.H. and Kabat, E.A. (1995) Affinity of *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* lectin-I, isolectin B4 for Galα1-4Gal ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 814-820.
- Yeh, J., Seals, J.R., Murphy, C.I., van Halbeek, H. and Cummings, R.D. (1993) Site-specific *N*-glycosylation and oligosaccharide structures of recombinant HIV-1 gp120 derived from a baculovirus expression system. *Biochemistry*, **32**, 11087-11099.
- Yiu, S.C.K. and Lingwood, C.A. (1992) Polyisobutylmethacrylate modifies glycolipid binding specificity of verotoxin 1 in thin-layer chromatogram overlay procedures. *Anal. Biochem.*, **202**, 188-192.

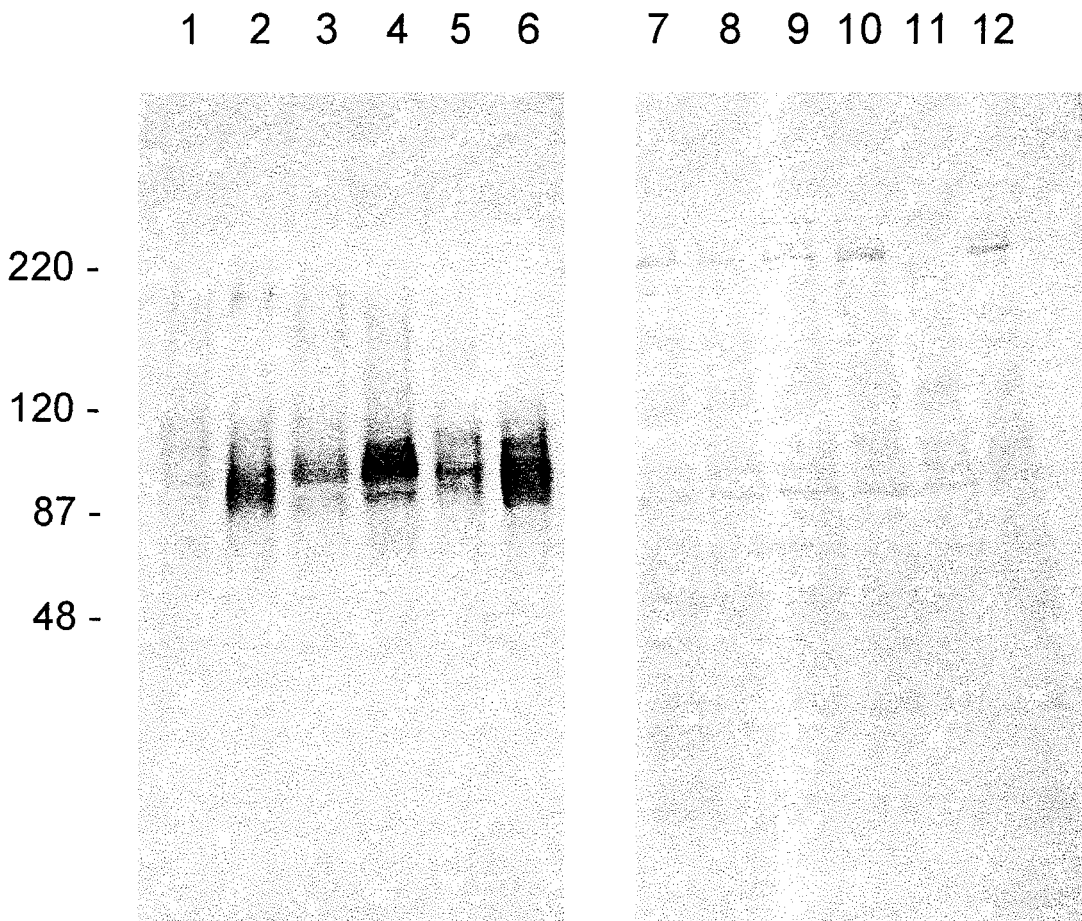


Figure 4: Binding of SBA on endogenous glycoproteins from *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cell lines. After fractionation on 4-20 % SDS-PAGE gradient gel and Western blotting of the glycoproteins from *Sf-9* cultured in BM-25 (lane 1) or in EX-CELL 401™ (lane 2); *Mb* cultured in BM-25 (lane 3) or in EX-CELL 401™ (lane 4); and *Tn* cultured in BM-25 (lane 5) or in EX-CELL 401™ (lane 6), the blot was separated in two parts. On the left (lanes 1-6), glycoproteins were detected with SBA. On the right (lanes 7-12), negative controls were performed by competition with 0.5 M Gal. The position of the pre-stained molecular weight markers is indicated on the left side of the figure.

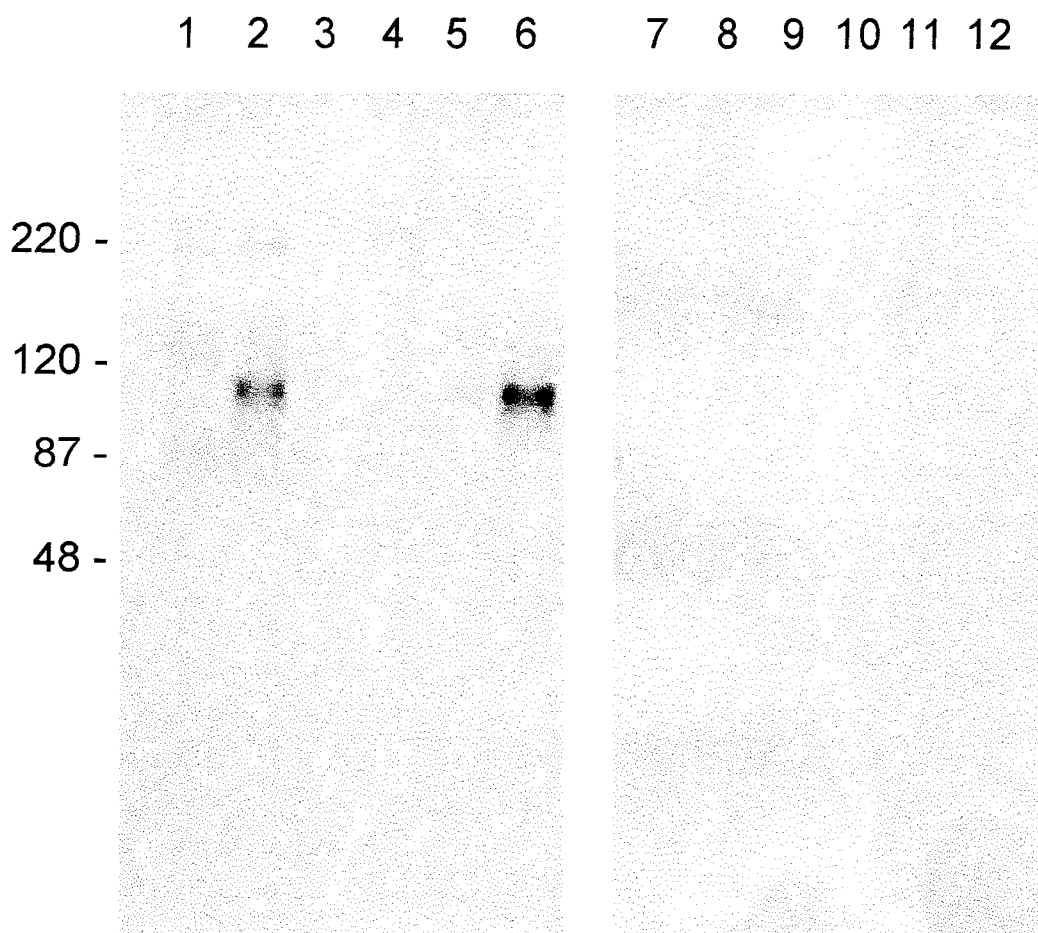


Figure 5: Binding of PNA on endogenous glycoproteins of *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cell lines. After fractionation on 4-20 % SDS-PAGE gradient gel and Western blotting of the glycoproteins from *Sf-9* cultured in BM-25 (lane 1) or in EX-CELL 401™ (lane 2); *Mb* cultured in BM-25 (lane 3) or in EX-CELL 401™ (lane 4); and *Tn* cultured in BM-25 (lane 5) or in EX-CELL 401™ (lane 6), the blot was separated in two parts. On the left (lanes 1-6), glycoproteins were detected with PNA. On the right (lanes 7-12), negative controls were performed by competition with 0.2 M lactose. The position of the pre-stained molecular weight markers is indicated on the left side of the figure.

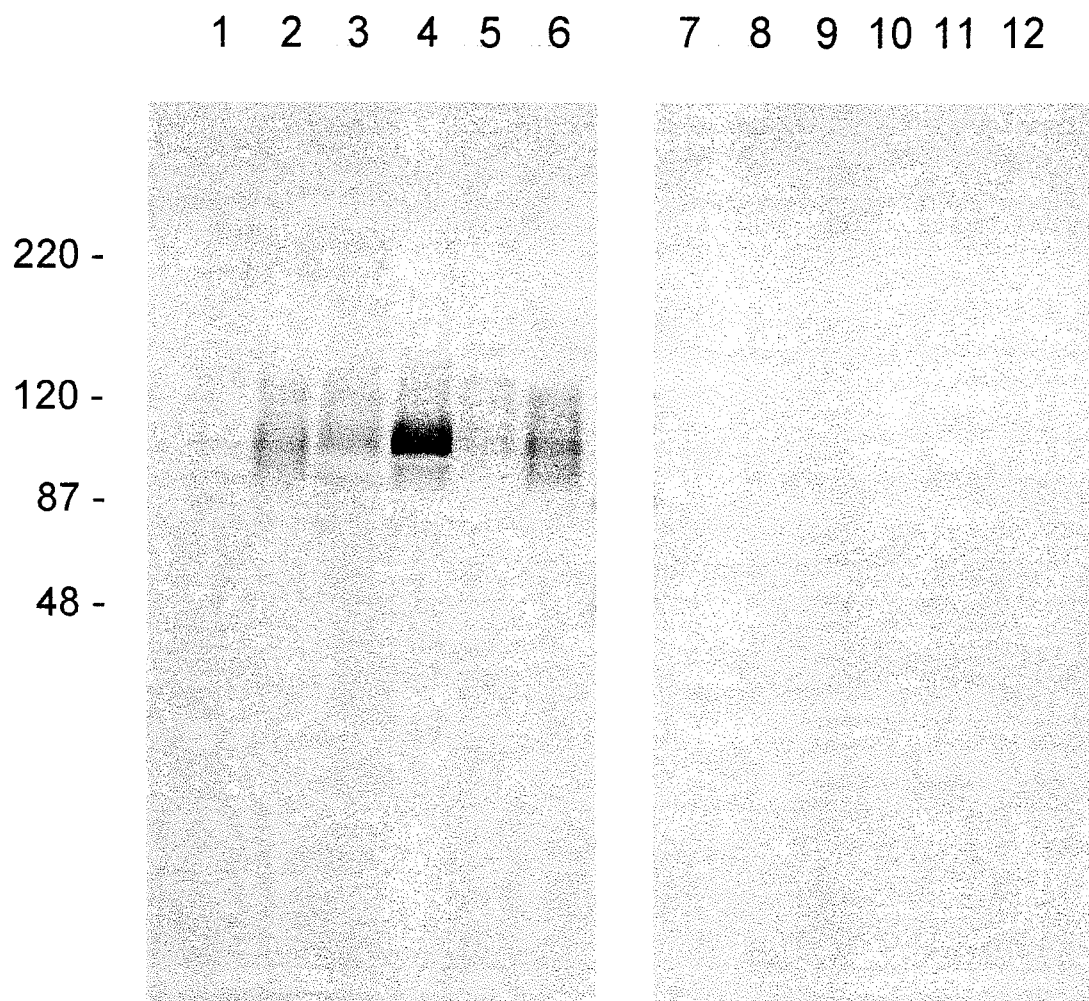


Figure 6: Binding of BSI-B₄ onto endogenous glycoproteins of *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cell lines. After fractionation on 4-20 % SDS-PAGE gradient gel and Western blotting of the glycoproteins from *Sf-9* cultured in BM-25 (lane 1) or in EX-CELL 401™ (lane 2), *Mb* cultured in BM-25 (lane 3) or in EX-CELL 401™ (lane 4) and *Tn* cultured in BM-25 (lane 5) or in EX-CELL 401™ (lane 6), the blot was separated in two parts. On the left (lanes 1-6), glycoproteins were detected with BSI-B₄. On the right (lanes 7-12), negative controls were performed by competition with 0.5 M αMe-Gal. The position of the pre-stained molecular weight markers is indicated on the left side of the figure.

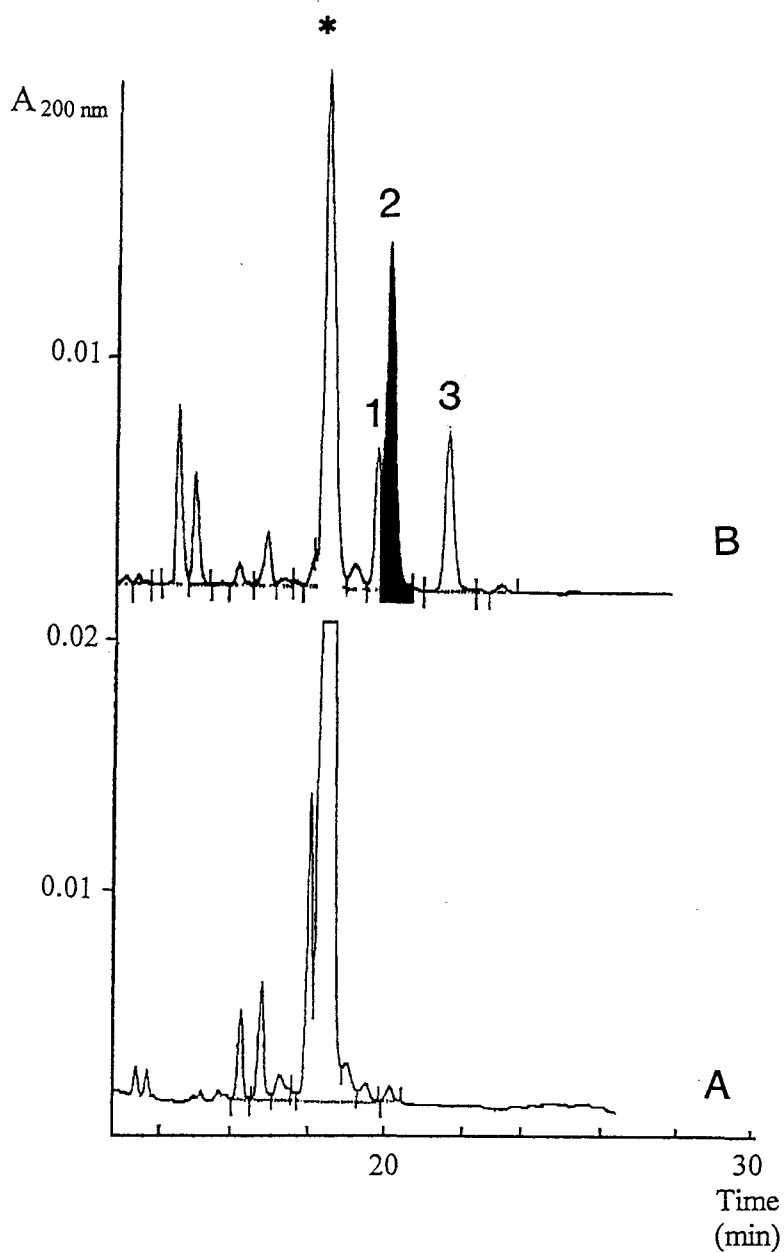


Figure 7: Capillary electrophoretic profiles of the O-GalNAc products from the incubation of the GTTPSPVP peptide with or without lepidopteran microsomal preparation.

Analysis of the glycopeptides formed (1) mono-O-linked-GalNAc peptides TTPSPVP + 1 GalNAc, (2) mono-O-linked-GalNAc peptides GTTPSPVP + 1 GalNAc and (3) di-O-linked-GalNAc peptides GTTPSPVP + 2 GalNAc by the pp α GalNAc-T assays (A) without lepidopteran microsome, and (B) using microsomes of *Sf*-9 cells adapted in the culture medium BM-25. * GTTPSPVP peptide substrate.

**CHARACTERIZATION OF AN UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-GALACTOSYL-
TRANSFERASE ACTIVITY IN *MAMESTRA BRASSICAE* CELL LINE.**

Michel Lopez¹, Maud Gazon², Sylvie Julian², Yves Plancke¹, Yves Leroy¹, Gérard Strecker¹, Jean-Pierre Cartron³, Pascal Bailly³, Martine Cerutti², André Verbert¹ and Philippe Delannoy^{1*}

¹ *Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

² *Station de Pathologie Comparée INRA / Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1184, route d'Alès, F-30380 Saint Christol-les-Alès, France.*

³ *INSERM U-76, Glycoconjugués des Cellules Sanguines, Institut National de Transfusion Sanguine, 6, rue Alexandre Gabanel, Paris, France.*

* To whom correspondence should be addressed at: Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Telephone number: (33).03.20.43.69.23; Fax number: (33).03.20.43.65.55; e-Mail address: delannoy@pop.univ-lille.fr

Running title: Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase in insect cells.

Keywords: Insect cells / *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄ / α 1,4-galactosyltransferase / O-glycosylation / *Mamestra brassicae*.

Abstract

The binding of *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄ on the endogenous glycoproteins of different insect cell lines leads us to characterize for the first time an UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase in a *Mamestra brassicae* cells. The study of the acceptor specificity indicated that the *Mb* α -galactosyltransferase prefers Gal β 1-3-*R* as acceptor and among such glycans, the relative substrate activity $V_{\text{Max}} / K_{\text{M}}$ was equal to 5.6 $\mu\text{l.ng}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl and to 330 $\mu\text{l.ng}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-benzyl, showing undoubtedly that Gal β 1-3GalNAc disaccharide was the more suitable acceptor substrate for *Mb* α -galactosyltransferase activity. NMR and MS data allow us to establish that the *Mb* α -galactosyltransferase synthesizes one unique product Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-benzyl. Gal β 1-3GalNAc disaccharide is usually present on *O*-glycosylation sites of numerous asialo-glycoproteins and glycolipids. The transfer of galactose catalyzed by *Mb* α 1,4-galactosyltransferase onto both natural acceptors shown that *Mb* α 1,4-galactosyltransferase preferentially acts on glycoproteins than on glycolipids. Finally, we demonstrated that the trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-benzyl was able to inhibit anti-P^K monoclonal antibodies mediated hemagglutination of human blood group P^K₁ and P^K₂ erythrocytes.

Abbreviations

Ac, acetyl; α 1,4-Gal-T, UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase; α Me-Gal, Gal α 1-O-methyl; bn, benzyl; BSI-B₄, *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄; Cer, ceramide; COSY, two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Fuc, fucose; Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; Glc, glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; HMQC, two-dimensional heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy; Me, methyl; MALD-MS, matrix-assisted laser desorption mass spectrometry; Man, mannose *Mb*, *Mamestra brassicae* clone SPCMb-92-C6; Me, methyl; MES, 4-morpholine-ethanesulfonic acid; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; PBS, sodium phosphate buffer ; *p*Np, *p*-nitrophenol; *Sf*-9, *Spodoptera frugiperda* clone ATCC CRL 1711; *Sf*-21, *Spodoptera frugiperda* cell line IPLB-*Sf*-21-AE; TBS, Tris/HCl 10 mM, NaCl 0.15 M, pH7.4 buffer; *Tn*, *Trichoplusia ni* clone *Tn*-5-B14.

Introduction

In recent years, the development of the therapeutic glycoprotein production using the baculovirus expression system in insect cells (for reviews see: Kang, 1988; Luckow and Summers, 1988; Miller, 1988; O'Reilly *et al.*, 1994) has stimulated concerns to determine the post-translational modifications capacity, in particular, the glycosylation potential of insect cells. In fact, it is now well established that protein bound carbohydrate side chains play important roles on the physico-chemical properties and functions of glycoproteins such as antigenicity, immunogenicity and metabolic clearance (Klenk, 1990; Takeuchi and Kobata, 1991; Munk *et al.*, 1992, Thotakura and Blithe, 1995).

The *N*-glycosylation pattern of recombinant glycoproteins expressed by lepidopteran cells using baculovirus vector is now well documented and revealed that the *N*-linked oligosaccharides found are essentially of high-mannose type ($\text{Man}_{9,5}\text{GlcNAc}_2$) and short truncated structures ($\text{Man}_{3,2}[\text{Fuc}_{0,1}]\text{GlcNAc}_2$) frequently substituted by a Fuc residue $\alpha 1,6$ -linked to the asparagine-bound GlcNAc residue (Kuroda *et al.*, 1986; Jarvis and Summers, 1989; Kuroda *et al.*, 1989, Kuroda *et al.* 1990; Kuroda *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Wathen *et al.*, 1991, Williams *et al.*, 1991; Noteborn *et al.*, 1992; Grabenhorst *et al.*, 1993; Veit *et al.*, 1993; Voss *et al.*, 1993; Yeh *et al.*, 1993; Manneberg *et al.*, 1994; Ponimaskin *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1997). Only few studies have shown complex *N*-linked glycans in insect cells. Recent data have suggested that an insect *Estigmene acrea* cell line can add some terminal galactose residues to the recombinant human interferon γ (Ogonah *et al.*, 1996), and only one group has reported that recombinant human plasminogen carries complex type *N*-glycans with terminal sialic acid residues when expressed in *Spodoptera frugiperda* 21 or *Mamestra brassicae* (Davidson *et al.*, 1990; Davidson and Castellino, 1991a and 1991b).

As mainly observed on recombinant glycoproteins expressed by the baculovirus-insect cell system, endogenous *N*-glycan structures found in insect cell glycoproteins have no complex type glycans (Butters and Hughes, 1981; Hsieh and Robbins, 1984; Williams *et al.*, 1991, Staudacher *et al.*, 1992a), but a small amount of oligosaccharides contains terminal GlcNAc or GalNAc residues (Hard *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1993; Kubelka *et al.* 1994). Activity measurements of several glycosyltransferases involved in the addition of terminal sugars to *N*-linked oligosaccharides have demonstrated that lepidopteran cells contain α 1,6-fucosyltransferase (Staudacher *et al.*, 1992b), low level of β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I (Altmann *et al.*, 1993; Velardo *et al.*, 1993), but lack β 1,4-galactosyltransferase and sialyltransferase activities.

Compared to the information available on the structure and biosynthesis of lepidopteran *N*-glycans, our knowledge about the synthesis of *O*-linked oligosaccharides remains rather poor. A comparison of *O*-glycans on recombinant pseudorabies virus envelope protein gp50 expressed in *Sf*-9, *Vero* and *Chinese Hamster Ovary* cells, has shown that the protein synthesized by both mammalian cell lines contained exclusively the core 1 disaccharide Gal β 1-3GalNAc (T-antigen) mainly substituted by one or two sialic acid residues. On the contrary, the main part of *O*-glycosylation sites of insect-produced protein were only substituted by GalNAc residues, forming Tn-antigen. The *Sf*-9 cell line also synthesized Gal β 1-3GalNAc but in very low amount and, none of these *O*-glycans are substituted by sialic acid residues (Thomsen *et al.*, 1990). A characterization of the *O*-linked oligosaccharidic structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein as well as on a human interleukin 2 with artificially introduced *O*-glycosylation sites, expressed respectively in *Sf*-9 and *Sf*-21 cells, yielded to similar results : only GalNAc and Gal β 1-3GalNAc were found (Wathen *et al.*, 1991 ; Grabenhorst *et al.*, 1993). Measurement of the two relevant *O*-glycosyltransferase activities

performed in *Sf-9*, *Vero* and *Chinese Hamster Ovary* cells has revealed that, even if the three cell lines expressed comparable level of polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase activity, there were high variations in core-1 β 1,3-Gal-T activity, with *Sf-9* cells containing the lowest level (Thomsen *et al.*, 1990).

In summary, the determination of the glycosylation potential of lepidopteran cells achieved through the measurement of the different glycosyltransferase activities, as well as through the identification of the *N*- and *O*-glycan structures present on endogenous insect cell glycoproteins or on recombinant glycoproteins expressed by the baculovirus / insect cell system, showed that the glycosylation potential of insect cell lines are deficient in comparison to mammalian cells. As *N*- and *O*-glycan structures found on the insect recombinant glycoproteins are often different from those occurring in the corresponding natural glycoproteins, the aberrant glycosylation pattern can limit the development of the therapeutic glycoprotein production in lepidopteran cells using the baculovirus expression system. Indeed, these changes in glycosylation can cause a decrease of the half-life of the recombinant glycoproteins after blood injection (Wright and Morrison, 1994; Thotakura and Blithe, 1995), or induce an immunogenic response against normally cryptic peptide epitopes (Burchell *et al.*, 1989; Jerome *et al.*, 1991 ; Kotera *et al.*, 1994), but also against glycan epitopes normally absent in human.

It is clear that some oligosaccharide epitopes present on glycoproteins or glycolipids expressed at the cell surface of most mammalian species cause a rapid rejection after exposure to human blood. The major responsible for such human rejection has been identified to a unique carbohydrate structure, the α -galactosyl epitope Gal α 1-3Gal (Galili *et al.*, 1988, Rother and Squinto, 1996). Indeed, as much as 1 % of the circulating human IgG were found

to interact with Gal α 1-3Gal epitopes, both on glycoproteins (Castronovo *et al.*, 1987; Towbin *et al.*, 1987) and glycosphingolipids (Galili *et al.*, 1984, 1985 and 1987).

The α -galactosyl epitope being strongly antigenic in human, it appeared particularly interesting to look for such carbohydrate epitopes on endogenous insect cell glycoproteins, since the glycosylation patterns of the expressed glycoproteins are determined to a large extent by the host cell glycosylation machinery. For that purpose, after electrophoresis and Western blotting of non-infected insect cell homogenates, we have tested the affinity of the insect glycoproteins for an α Gal-specific lectin, *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I isolectin B₄ (BSI-B₄), which strongly recognizes Gal α 1-3/4Gal sequences (Hayes *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1995) and demonstrated the binding of BSI-B₄ to insect cell glycoproteins, especially to *Mb* endogenous glycoproteins, and characterized a new α 1,4-Gal-T activity specific to Gal β 1-3GalNAc acceptor substrates in these cells.

Materials and methods

Materials

All reagents were of analytical grade. UDP-[6-³H]-Gal (650 GBq/mmol) was purchased from Amersham (France), and used after dilution with non-radioactive nucleotide sugar from Sigma (St Louis, MO, USA). Peroxydase-labeled BSI-B₄, DAB tablets insoluble peroxidase substrate, BSI-B₄, G_{M1a}, G_{A1}, G_{D1b}, Gal β 1-3GalNAc α -O-bn, lactose (Gal β 1-4Glc), Gal, Gal α 1-*p*Np, Gal β 1-*p*Np, Gal α 1-O-Me, fetuin, angiotensin I and Triton X-100 were purchased from Sigma. *N*-acetyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) and *N*-acetyl-isolactosamine (Gal β 1-3GlcNAc) were from Calbiochem (CA, USA). Lacto-*N*-tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) and

lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) were prepared from bovine colostrum (Paulson *et al.*, 1978). Lactosylceramide was the generous gift of Dr. J.-F. Bouhours (INSERM U-437, Nantes, France). Gal β 1-3GalNAc, Gal β 1-3(2-*O*-Ac)Gal β 1-*O*-Me and Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl was the generous gift of Dr. C. Augé (URA CNRS 462, Orsay, France). Asialofetuin was prepared by mild acid hydrolysis of fetuin. Sugar composition of desialylated compounds was controlled by gas chromatography after methanolysis and trimethylsilylation. Dowex 1x2 (Cl⁻-form, 100-200 mesh), Bio-Gel P-2 (200-400 mesh) and P-4 (200-400 mesh) were purchased from BioRad (France). Sep-Pak C₁₈ cartridge was purchased from Waters Corp. (Milford, MA, USA). Nitrocellulose membrane BioTrace NT was from Gelman Sciences. Murine monoclonal antibodies anti-P₁, anti-P^k, anti-P, and red blood cells from individuals typed in the P / P₁ blood group system were from the *Institut National de la Transfusion Sanguine* (Paris, France).

Insect cells culture and preparation of cellular homogenates

The *Spodoptera frugiperda* clone Sf-9 of IPLB-Sf-21-AE cells (Vaughn *et al.*, 1977) was obtained from ATCC (CRL 1711) and the *Trichoplusia ni* clone Tn-5-B14 was provided by A. Bernard (Glaxo Institute). The *Mamestra brassicae* clone SPCMb-92-C6 were established by J.M. Quiot at the *Station de Pathologie Comparée INRA / CNRS URA 1184* (unpublished data). The three cell lines were adapted, maintained and cultivated at 28°C in EX-CELL 401™ (Sera-Lab, UK), a semi-defined medium for the serum-free culture of lepidopteran insect cells.

Cells were harvested at confluence and cell homogenates were prepared by lysing the cells at 0°C with 10 mM sodium cacodylate buffer pH 6.5, containing 1 % Triton X-100, 20 % glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, and 5 mM MnCl₂ (1 ml per 3 x 10⁷ cells). After a 10 minutes incubation under continuous stirring, cell homogenates were centrifuged at 10,000 g for 15 minutes and the supernatants were used for SDS-PAGE. Protein concentration was determined

according to the method described by Peterson (1977) using bovine serum albumin as standard.

Electrophoresis and Western blotting

SDS-PAGE was performed under reducing conditions on 4 % to 20 % gradient polyacrylamide gel (Laemmli, 1970) using 40 μg of protein per lane for each cell homogenates. After migration, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane as described by Vaessen *et al.* (1981). The blot was then separated in two parts and treated with polyvinylpyrrolidone (2 % in TBS) prior the incubation with the peroxidase-labeled BSI-B₄ (2 μg / ml in TBS containing 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) with or without 0.5 M $\alpha\text{Me-Gal}$ used as a competitor. After washing, labeled glycoproteins were revealed according to Sigma *Fast staining* protocol using DAB and Urea / H₂O₂.

Enzymatic assay

2×10^8 *Mb* cells cultured in EX-CELL 401™ were lysed by ultrasonication, 5 sec pulsed at 0°C in 10 ml 0.25 M sucrose / 0.2 M NaCl solution. Microsome suspensions were prepared by centrifugation as previously described (Tetaert *et al.*, 1994) and stored at -80°C in NaCl / sucrose solution until use.

Assays were performed at least in duplicate. The incorporation of [6-³H]-Gal was determined by subtraction of the radioactivity measured in the absence of exogenous acceptors and results were expressed as average values as nmol of Gal residues transferred per mg of protein and per hour.

Microsomal fractions (35 μg of protein) were brought to a final volume of 50 μl with 0.125 M MES buffer pH 7.0, 0.15 % Triton X-100, 5 mM γ -galactonolactone, 10 mM ATP, 12.5 mM MnCl₂, 1 mM UDP-[6-³H]-Gal (235 MBq / mmol; 11.75 kBq / 50 μl), containing 4 mM

of oligosaccharide or aryl-glycoside, 1 mM of ganglioside, or 2 mg / ml of glycoprotein acceptor and incubated for 1 hour at 37°C.

Reaction products were separated from UDP-[³H]-Gal depending on the acceptor substrate. For oligosaccharide acceptors, assay mixtures were diluted to 0.5 ml with H₂O to stop the reaction and the amount of incorporated [³H]-Gal was determined by ion-exchange chromatography on 1 ml Dowex 1x2 column (Cl⁻-form, 100-200 mesh) equilibrated in water. The radioactivity of the corresponding products was detected by scintillation counting (Vandamme *et al.*, 1992). For glycoproteins, reactions were stopped by adding 1 ml of ice-cold phosphotungstic acid (5 % in 2 M HCl). Precipitates were collected on glass fiber filters, washed extensively with 5 % trichloroacetic acid, distilled water and ethanol, and processed for scintillation counting (Vandamme *et al.*, 1992). For aryl-glycosides and glycolipids, the reactions were stopped by adding 1 volume of ethanol. Samples were centrifuged at 3,000 g for 5 minutes and supernatants were applied to a Sep-Pak C₁₈ cartridge. After washing with 5 ml of water, aryl-glycosides were eluted with 5 ml of 30 % acetonitrile in water and glycolipids with 2 ml of CH₃OH, followed by a 5 ml elution with CHCl₃ / CH₃OH (1/1, by vol.) and processed for scintillation counting. The rates of all reactions were linear with time, at least for 1 hour. For kinetic analysis, incubations were performed for 1 hour using various concentrations (0.125 - 4 mM) of Galβ1-3GalNAcα1-*O*-bn and Galβ1-3GlcNAcβ1-*O*-octyl.

*Large scale preparation of the galactosylated product of Galβ1-3GalNAcα1-*O*-bn.*

Mb microsomal fractions (850 μg of protein) were brought to a final volume of 600 μl in conditions described above with 4 mM UDP-[6-³H]-Gal (62 MBq / mmol; 0.148 MBq / 600 μl), 4 mM of Galβ1-3GalNAcα1-*O*-bn and incubated for 24 hours at 37°C. The incubation mixture was applied to a Sep-Pak C₁₈ cartridge, eluted as previously described, and lyophilized. Aliquots of the incubation mixture (5 μl) were collected after 0, 2, 4, 8 and 24

hours and assayed for radioactivity (data not shown). The yield of transfer after 24 hours of incubation was 66 % (\approx 970 μ g of galactosylated product). The purified product was further analyzed by NMR and MS.

For the immunoreactivity study, we have produced 4 mg of that compound with 90 % of purity. That large scale preparation was performed as described above, in a final volume of 1,85 ml (1.4 mg of *Mb* microsomal proteins) and incubated for 48 hours at 37°C.

Two-dimensional homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy

¹H-NMR spectroscopy was performed on a Brüker ASX 400WB spectrometer. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from internal sodium 4,4'-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured by reference to internal acetone (δ = 2.225 ppm in D₂O at 25 °C). The two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy (COSY), with simple and double relay transfer and the heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) spectroscopy experiments were performed using Brüker standard pulse-sequences.

Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry (MALD-MS) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

100 μ g of the galactosylated product were permethylated according to Ciucanu and Kerek (1984) previous MALD-MS analysis. The methylated compound was then methanolized and the formed methyl-glycosides were analyzed by GC-MS after peracetylation as described by Fournet *et al.* (1981).

Molecular weight of the permethylated galactosylated product was measured by MALD-MS on a Vision 2000 time-of-flight Mass Spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. The mass spectra were acquired in reflectron mode under 6 kV acceleration voltage and positive detection. The sample was prepared by mixing directly

onto the target 1 μ l of the analyze solution (typically 50 pmol) and 1 μ l of a 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix solution (12 mg / ml in CH₃OH / H₂O, 70:30), then allowed to crystallize at room temperature. External calibration was performed using angiotensin I standard (MW : 1296.7). 10 shots were accumulated for the mass spectrum.

GC separation of partially methylated and acetylated methyl-monosaccharides from galactosylated product was performed on a fused silica capillary column from SGE (0.32 mm x 25 m) using helium as carrier gas at pressure of 0.5 bar with the following temperature program (110-240°C at 3°C / min). The GC-MS analyzer (Delsi DI 700 gas chromatograph) was coupled with a Nermag R10-10 mass spectrometer (Rueil Malmaison, France) using an electron energy of 70 eV and an ionizing current of 0.2 mA.

Release of [6-³H]-Gal-labeled oligosaccharides from asialofetuin

1.25 mg of asialofetuin (5 mg / ml final concentration) were incubated for 24 h at 37°C in conditions described above with *Mb* microsomal fraction (210 μ g of protein) and 0.5 mM of UDP-[6-³H]-Gal (0.57 GBq / mmol; 74 kBq / μ l). Sample was made free of UDP-[6-³H]-Gal by desalting on Bio-Gel P2 column (200-400 mesh) equilibrated in 0.1 M pyridine acetate pH 5.6. Further, [³H]-labelled asialofetuin sample was submitted to alkaline treatment under reducing conditions in 0.1 M NaOH containing 1 M NaBH₄ for 48 h at 45°C (Spiro and Bhoyroo, 1974). At the end of the incubation time, sample was acidified at pH 6 by addition of Dowex 50 x 8 (H⁺-form, 20-50 mesh) and evaporated. The sample was then resuspended in methanol and evaporated 3 times, dissolved in water and applied to a Bio-Gel P4 column (80 x 1.2 cm, 200-400 mesh) equilibrated in 0.1 M pyridine acetate pH 5.6, to separate released O-glycans from N-glycopeptides.

Immunoreactivity of Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn.

Monoclonal antibodies anti-P₁, anti-P^k, anti-P and BSI-B₄ were previously tested by agglutination assays using 0.7% (by vol.) suspensions of papain-treated P₁, P^k₁, P^k₂ and p (Tja) human red cells, for 7 min at 37°C, in PBS, pH 6.8, containing 150 mM NaCl. This agglutinant system titration allowed to control the specificity of reagents and to determine the correct concentration needed for each antibody or lectin, in order to perform the inhibition assays with both aryl-glycosides Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn and Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn. Then, the monoclonal antibodies and the BSI-B₄ at the appropriate dilution were incubated for 4 h at 22°C in a final volume of 20 μ l with a serial dilution of Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn or Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn. The mixtures were further tested as described above by agglutination assays against 20 μ l of papain-treated P₁, P^k₁, or P^k₂ erythrocytes.

Results*BSI-B₄ binds to Mb glycoproteins*

40 μ g of cellular glycoproteins from *Sf-9*, *Mb*, or *Tn* cultured in EX-CELL 401™ medium were fractionated by SDS-PAGE and revealed with peroxidase-labeled BSI-B₄. As indicated in Figure 1, the three lepidopteran cell lines expressed glycoproteins recognized by BSI-B₄. The specificity of the binding of the lectin was proven by the total absence of staining observed when BSI-B₄ was incubated in the presence of 0.5 M α Me-Gal used as a competitor.

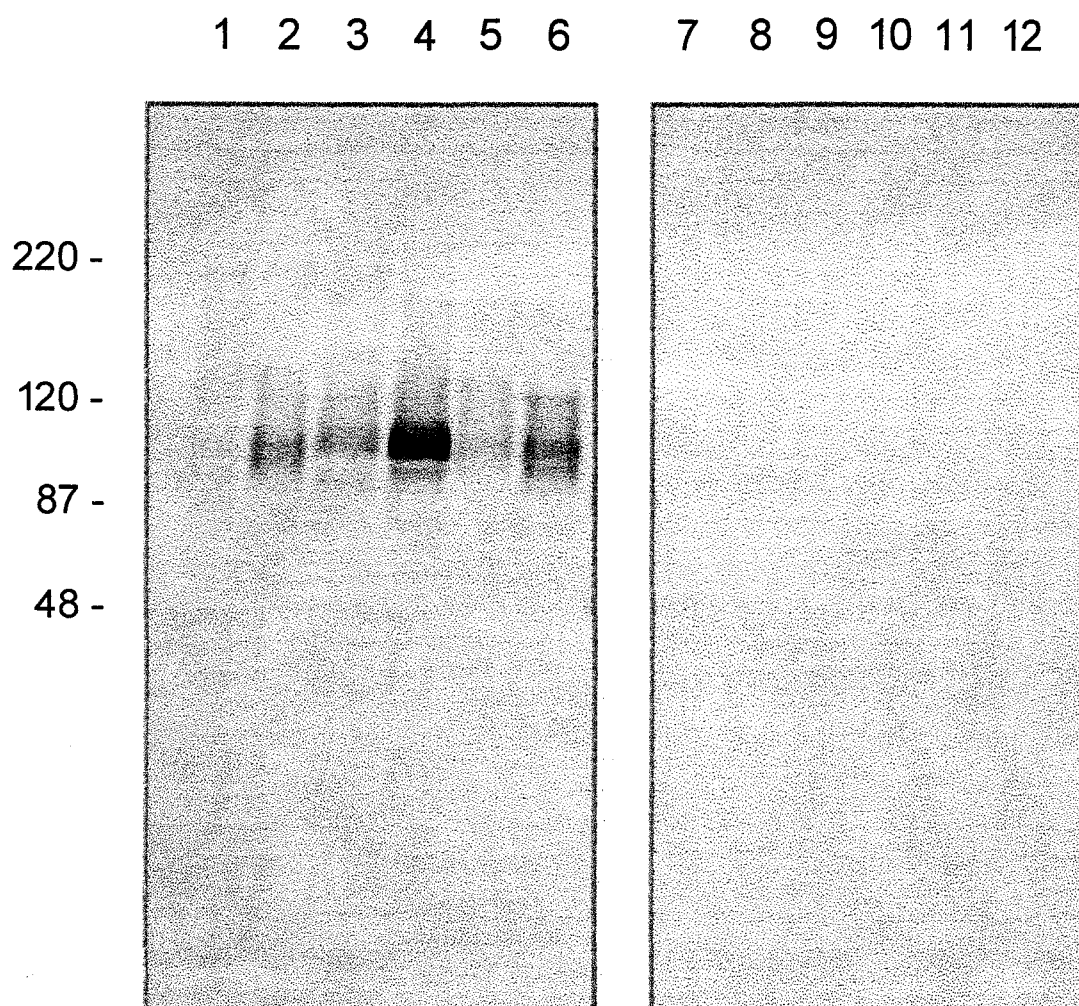


Figure 1: Binding of BSI-B₄ onto endogenous glycoproteins of *Sf-9*, *Mb* and *Tn* cell lines. After fractionation on 4 - 20 % SDS-PAGE gradient gel and Western blotting of the glycoproteins from *Sf-9* (lanes 1 and 4), *Mb* (lanes 2 and 5) and *Tn* (lanes 3 and 6) cells, the blot was separated in two parts. On the left (lanes 1-3), glycoproteins were detected with BSI-B₄. On the right (lanes 4-6), negative controls were performed by competition with 0.5 M α Me-Gal. The position of the pre-stained molecular weight markers is indicated on the left side of the figure.

The pattern of expression of revealed bands was dependent of the cell lines, showing that the higher staining intensity was obtained with *Mb* glycoproteins. In *Mb*, a 100-110 kDa band was strongly revealed by BSI-B₄ compared to *Sf-9* or *Tn* in which the staining was of a lower intensity. In *Sf-9*, BSI-B₄ revealed a large 95-105 kDa band with two other weak signals at 85 and 190 kDa. *Tn* glycoproteins staining was observed between 95 and 120 kDa with a main signal at 100-110 kDa. According to the specificity of BSI-B₄ which recognize Gal α 1-3/4Gal sequences (Hayes *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1995), these data indicated the presence of α -Gal residues in terminal position of endogenous high molecular weight glycoproteins of *Sf-9*, *Mb* and *Tn*, reflecting the activity of an α -galactosyltransferase into these cell lines. According to the fact that the most important binding was observed onto *Mb* glycoproteins, we have focused our interest on this cell line in order to characterize the activity of the galactosyltransferase responsive to the biosynthesis of these structures.

Mb preferentially transfer galactose in terminal position of Gal β 1-3GalNAc sequence.

To characterize the substrate specificity of the putative α -galactosyltransferase activity, we have incubated microsomes with various potential acceptors containing a terminal galactose residue. As indicated in Table I, the galactosyltransferase activity expressed in the microsomal fraction of *Mb* transferred preferentially galactose residue onto Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn, Gal β 1-3GalNAc, or onto Gal β 1-3-(2-*O*-Ac)-Gal β 1-*O*-Me, a synthetic substrate which was previously shown to be a good acceptor for the transfer of sialic acid residues in α 2,3-linkage to terminal Gal (Lubineau *et al.*, 1997). The microsomal fraction of *Mb* also transferred galactose residue onto *N*-acetyl-isolactosamine (Gal β 1-3GlcNAc) or Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl but with a lower yield (36.9 % and 39.9 % respectively) compared to Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn. As indicated in Table I, the transfer of galactose residue to *N*-acetyl-lactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) or to lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-

4Glc) was 2.7 or 1.5 lower than for *N*-acetyl-neolactosamine (Gal β 1-3GlcNAc) or lacto-*N*-tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) respectively, showing that *Mb* α -galactosyltransferase preferred Gal β 1-3-*R* than Gal β 1-4-*R* acceptor substrates. Small amount of galactose residue was transferred to lactose (Gal β 1-4Glc) but Gal, or α - and β -arylglycosides of Gal were not acceptor substrates for that enzymatic activity. According to these data, it appeared that the substrate specificity of *Mb* α -galactosyltransferase activity completely differed from UDP-Gal : Gal β 1-4GlcNAc α 1,3-galactosyltransferase previously purified and cloned from different sources (Blanken and Van den Eijnden, 1985; Joziasse *et al.*, 1989; Joziasse *et al.*, 1992).

Table I. Determination of the substrate specificity of *Mamestra brassicae* cells UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase towards oligosaccharidic acceptors. The table shows the relative activities to the incorporation of galactose onto Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn as an acceptor substrate.

Substrate ^a	Relative activity
Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn	100.0 (103.3) ^b
Gal β 1-3GalNAc	84.7
Gal β 1-3(2-O-Ac)Gal β 1-O-Me	78.3
Gal β 1-3GlcNAc β 1-O-octyl	39.9
Gal β 1-3GlcNAc	36.9
Gal β 1-4Glc	15.2
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	13.7
Gal β 1-4GlcNAc	13.5
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	9.3
Gal β 1- <i>p</i> Np	3.4
Gal	2.6
Gal α 1- <i>p</i> Np	1.6
Gal α 1-O-Me	0.2

^a Substrates were used at the final concentration of 4 mM.

^b Actual activities (nmol.h⁻¹.mg⁻¹) of galactosyltransferase are shown in brackets.

Since both Gal β 1-3GalNAc and Gal β 1-3GlcNAc sequences appeared to be acceptor substrates for *Mb* α -galactosyltransferase activity, we further compared the kinetic parameters of transfer of galactose residues by *Mb* microsomal fraction using Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn and Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl as acceptors. As shown on Table II, the K_M value for Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn was 13-fold lower compared to Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl. In addition, the relative substrate activity V_{Max} / K_M was equal to 5.6 $\mu\text{l.ng}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for Gal β 1-3GlcNAc β 1-*O*-octyl and to 330 $\mu\text{l.ng}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn, showing undoubtedly that Gal β 1-3GalNAc disaccharide is the most suitable acceptor substrate for *Mb* α -galactosyltransferase activity.

Table II. Comparison of the kinetic properties of *Mamestra brassicae* cells UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase towards Gal β 1-3GalNAc and Gal β 1-3GlcNAc sequences.

Substrate	K_M (mM)	V_{Max} (mmol.mg ⁻¹ .h ⁻¹)	V_{Max} / K_M^a ($\mu\text{l.ng}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Gal β 1-3GalNAc α 1- <i>O</i> -bn	0.3	99.1	330
Gal β 1-3GlcNAc β 1- <i>O</i> -octyl	3.9	21.5	5.6

^a : relative substrate activity.

Galactose residue is α 1,4-linked in non-reducing position of Gal β 1-3GalNAc.

In order to precisely determine the linkage (anomerism and substitution) of Gal transferred onto Gal β 1-3GalNAc by the *Mb* α -galactosyltransferase activity, NMR analysis were performed on the product of the transfer reaction onto Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (compound A) as acceptor (Table III and Figure 2). The main characteristics of the NMR spectrum of the acceptor are the signals relative to the terminal β -Gal unit, observed at $\delta = 4.454$ ppm (H-1), $\delta = 3.620$ ppm (H-3) and $\delta = 3.900$ ppm (H-4). These signals are present in the spectrum of the

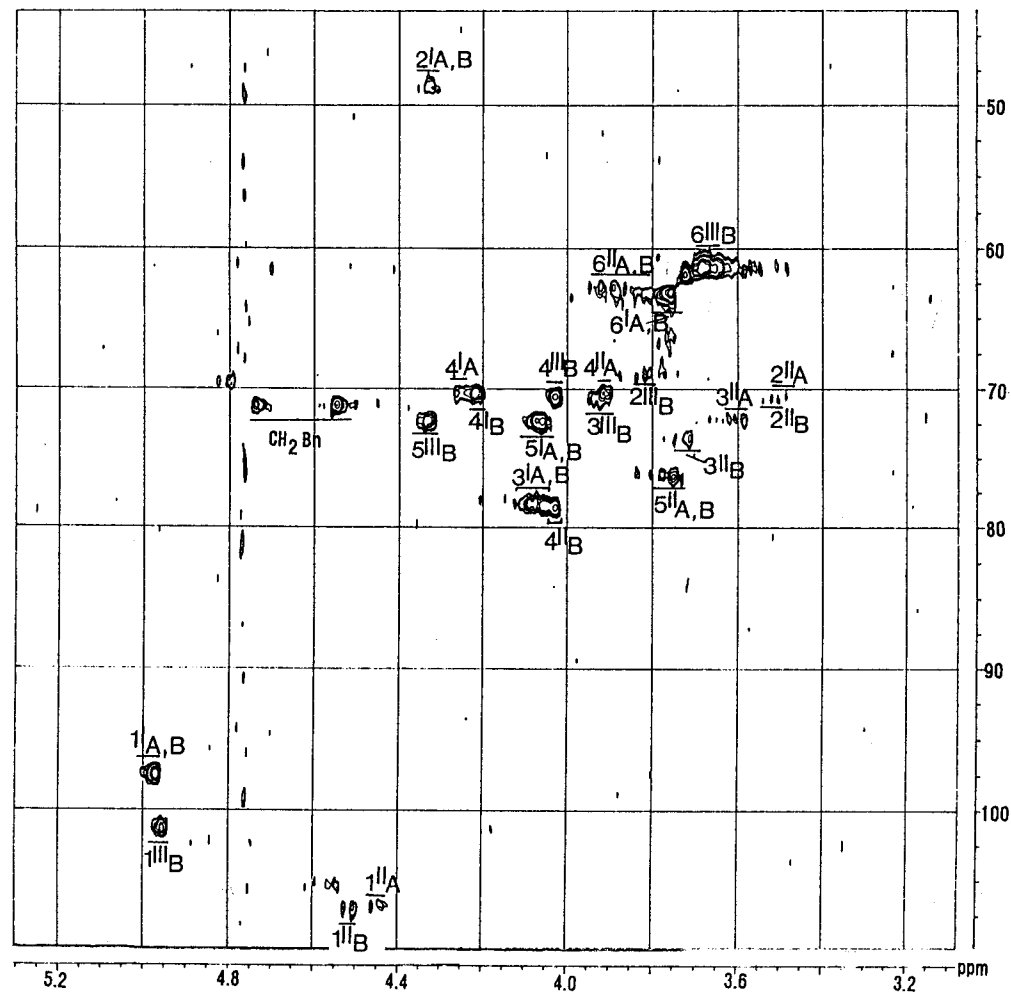
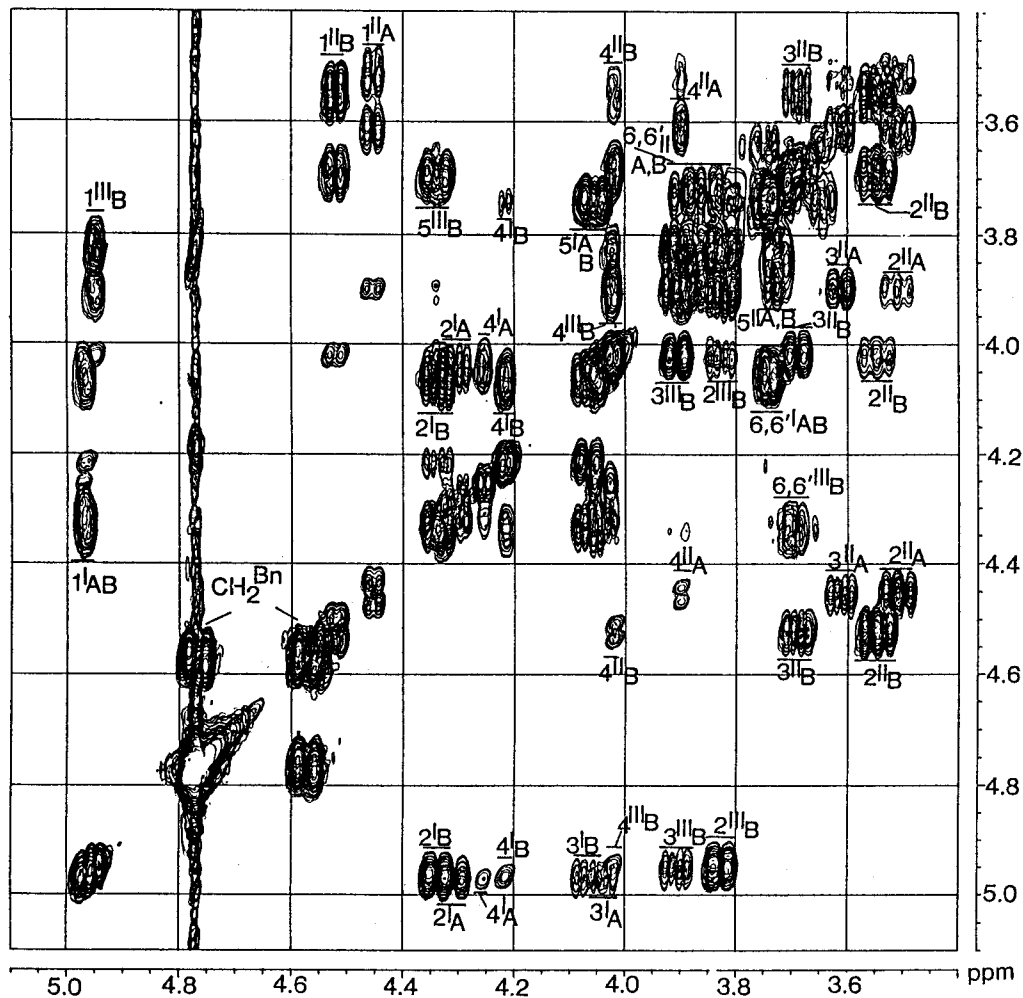
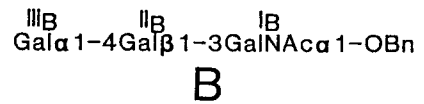
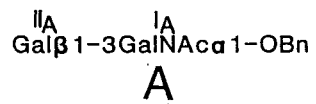
material resulting from the enzymatic reaction, together with new resonance relevant from the neosynthesized compound. By integration of the signals relative to terminal β -Gal_{II A} (δ H-1 = 4.454 ppm) and substituted β -Gal_{II B} (δ H-1 = 4.521 ppm) a ratio 3:7 was measured, corresponding to an effective transfer of galactose reaching up to 70 %. The new anomeric proton resonance observed at $\delta = 4.949$ ppm ($J_{1,2} \sim 3$ Hz) is characteristic of the α -form of galactose, the conformation of which was confirmed by the set of its vicinal coupling constants $J_{H1,H2}$, $J_{H2,H3}$ and $J_{H3,H4}$. The downfield shift which affects the β -Gal_{II B} H-3 ($\Delta\delta = + 0.072$ ppm) and H-4 ($\Delta\delta = + 0.125$ ppm) resonance is in favor of an *O*-4 substitution of this sugar unit. This interpretation was confirmed by examination of the HMQC spectrum, which clearly shows two C-4 resonance at $\delta = 70.20$ ppm (terminal α -Gal_{III B}) and $\delta = 78.47$ ppm (*O*-4 substituted β -Gal_{II B}).

Table III. ¹H- and ¹³C-Chemical shifts from Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (compound A) and Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (compound B).

Sugar		Chemical shifts (ppm)							
unit		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc
Gal β 1-3	II _A	4.454	3.508	3.620	3.900	3.75	3.87	3.82	
GalNAc α 1-	I _A	4.965	4.293	4.040	4.256	4.056	3.74	3.74	1.964
Gal α 1-4	III _B	4.949	3.825	3.909	4.025	4.341	3.69	3.69	
Gal β 1-3	II _B	4.521	3.546	3.692	4.025	3.75	3.87	3.82	
GalNAc α 1-	I _B	4.965	4.325	4.068	4.216	4.056	3.74	3.74	1.966

Sugar		Chemical shifts (ppm)						
unit		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	NAc
Gal β 1-3	II _A	106.63	70.33	72.19	70.17	76.26	62.7	
GalNAc α 1-	I _A	97.40	48.7	78.22	70.18	72.21	63.04	23.4
Gal α 1-4	III _B	101.26	69.17	70.58	70.20	72.19	61.25	
Gal β 1-3	II _B	106.94	70.60	73.63	78.47	76.26	62.7	
GalNAc α 1-	I _B	97.40	48.7	78.21	70.18	72.21	63.04	23.4

Figure 2: ^1H - and ^{13}C -NMR analysis of the material resulting from the transfer of galactose to the acceptor $\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc}\alpha\text{-}1\text{-O-bn}$. On the left: Two-step relayed COSY; On the right: HMQC spectrum. compound A: $\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc}\alpha\text{-}1\text{-O-bn}$ (acceptor); compound B: $\text{Gal}\alpha 1\text{-}4\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GalNAc}\alpha\text{-}1\text{-O-bn}$ (formed).



On the basis of these observations, the structure of the neosynthesized compound was established as follow: Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (compound B).

NMR result was confirmed by the MS analysis. The MALD-MS spectrum of the permethylated aryl-glycosides (Figure 3) showed only two predominant salted (Na⁺ or K⁺) molecules. The first pseudomolecular ions masses corresponded to the expected mass of the permethylated acceptor Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn ([M+Na]⁺= 594.4 m/z or [M+K]⁺= 610.7 m/z / compound A). The second pseudomolecular masses observed corresponded to the theoretical mass of the permethylated compound B ([M+Na]⁺= 798.9 m/z or [M+K]⁺= 814.7 m/z). The signals integration allowed to determine the intensity ratio 20:80 between the compound A and B. Moreover, the acetylated methyl-galactosides identified by CG-MS, the methyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-4-mono-*O*-acetyl-galactopyranoside and the methyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-5-mono-*O*-acetyl-galactofurannoside confirmed that the transferred galactose residue was linked to the galactose residue acceptor through an 1,4-linkage (Table IV).

Table IV. Methylated and acetylated methyl monosaccharide methyl ethers identified by CG-MS after acetylation of the methanolysate permethylated material resulting from the transfer of galactose to the acceptor Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn. compound A : Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (acceptor); compound B: Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-*O*-bn (formed).

Monosaccharide methyl-ether	Ratio ^a	Origin	
		Compound A (acceptor)	Compound B (formed)
(2, 3, 4, 6)-Me ₄ -Gal	2.6	+	+
(2, 3, 6)-Me ₃ - 4-Ac ₁ -Gal	1.0		+
(2, 3, 6)-Me ₃ - 5-Ac ₁ -Gal ^b	0.9		+
(4,6)-Me ₂ -GalN(Me)Ac	1.9	+	+

^a (2, 3, 6)-Me₃-**4-Ac**₁-Gal set to 1.0.

^b Furanic form providing from the liberation of (2, 3, 6)-Me₃-Gal by methanolysis which give a balance between α/β pyran and α/β furan structures. After the acetylation, the pyranic forms give (2, 3, 6)-Me₃-4-Ac₁-Gal, since furanic forms give (2, 3, 6)-Me₃-5-Ac₁-Gal.

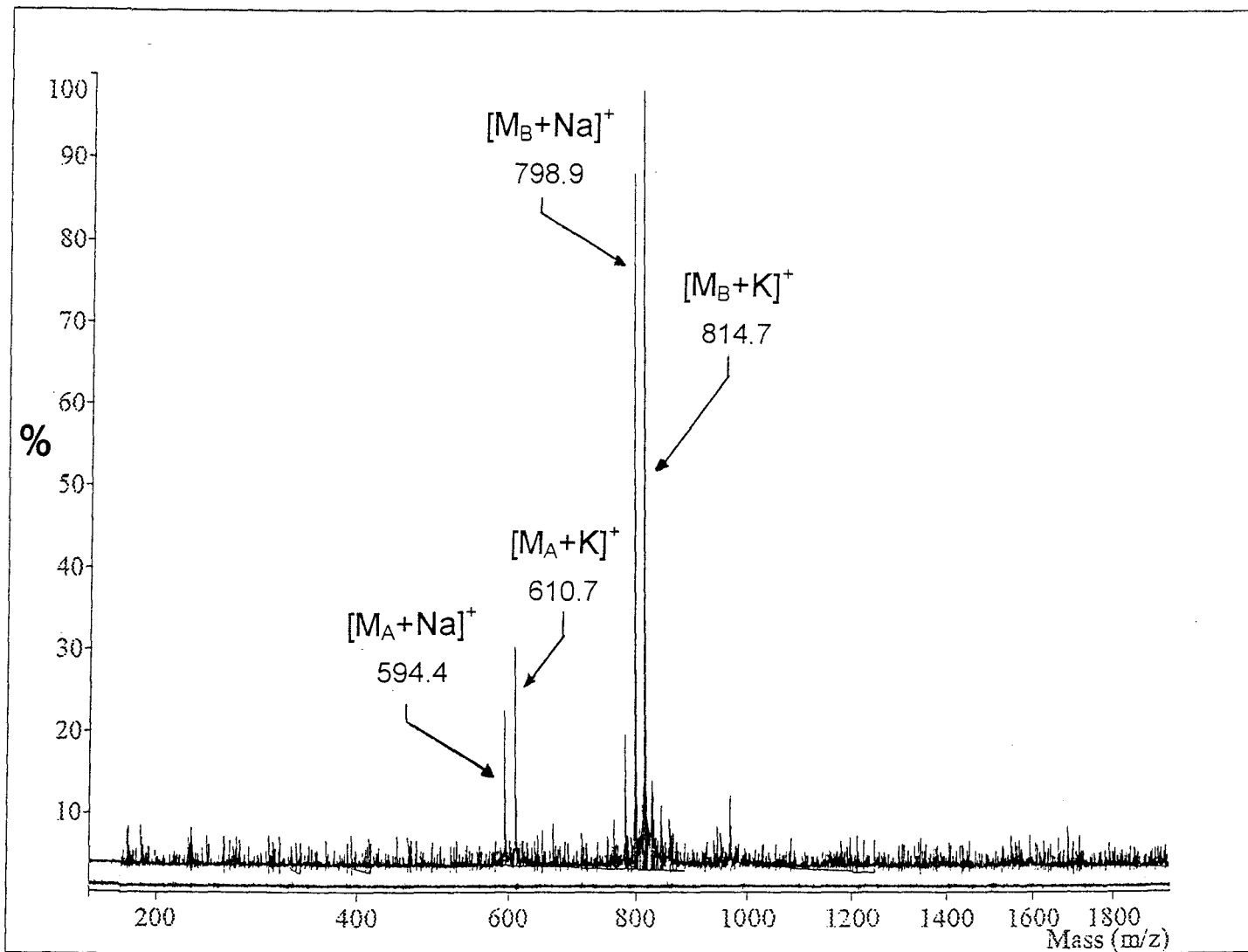


Figure 3: MALD-MS spectrum of the permethylated material resulting from the transfer of galactose to Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn. compound A : Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn (acceptor); compound B: Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -1-O-bn (formed); M_A : observed mass of the permethylated compound A; M_B : observed mass of the permethylated compound B.

Activity of UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase towards glycolipids and asialo-glycoproteins

In order to precise the substrate specificity of *Mb* α 1,4-Gal-T activity, incubations were performed using several glycolipids and asialo-glycoproteins. As indicated in Table V, glycolipids and asialo-glycoproteins seem to be rather poor acceptor substrates for this enzymatic activity, even if most of them (asialofetuin, G_{A1}, G_{M1a}, and G_{D1b}) contain one or more Gal β 1-3GalNAc terminal sequences. As expected among the five tested glycolipids, G_{M1a} and G_{A1} were acceptors of *Mb* α 1,4-Gal-T. A low transfer was also observed onto lactosylceramide which can be correlated with the transfer obtained onto free lactose and almost no transfer was observed onto GM₂ which possesses a GalNAc residue in terminal position.

Table V. Determination of the substrate specificity of *Mamestra brassicae* cells UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase towards glycoproteins and glycolipids. The table shows the relative activities to the incorporation of galactose onto Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn as an acceptor substrate.

Substrate ^a	[Gal β 1-3GalNAc-R] terminal sequences (mM)	Relative activity
Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn	1.0	100.0 (77.3) ^b
Asialofetuin	0.13 [Gal β 1-4GlcNAc-R] ~ 0.4 mM	8.1
<i>Glycolipids</i>		
G _{A1}	1.0	8.7
G _{M1a}	1.0	8.3
G _{D1b}	1.0	2.2
Lactosylceramide	0.0	2.0
G _{M2}	0.0	1.4

^a Substrates were used at the final concentration 2 mg / ml for glycoproteins, or 1 mM for glycolipids.

^b Actual activities (nmol.h⁻¹.mg⁻¹) of galactosyltransferase are shown in brackets.

Surprisingly, G_{D1b} which has a Gal β 1-3GalNAc terminal sequence, is a poor acceptor substrate. This is probably due to a steric incompatibility between the α 1,4-Gal-T and the α 2,8-linked disialylated chain present on this glycolipid (Table I). As related in Table V, the final concentration used for glycolipids assays was 1 mM, when the concentration for glycoproteins was fixed to 2 mg / ml, which corresponds to a final concentration in Gal β 1-3GalNAc equal to 0.1 mM for asialofetuin. Despite the fact that terminal Gal β 1-3GalNAc was at least 10-fold lower concentration in asialo-glycoprotein assays, the relative transfer activity onto asialo-glycoproteins was equivalent of that obtained onto G_{M1a} and G_{A1} glycolipids. It seems therefore, that the *Mb* α 1,4-Gal-T prefers Gal β 1-3GalNAc *O*-glycosidically linked to a peptidic aglycon than in terminal position of a glycosphingolipid.

Release of [6-³H]-Gal-labelled oligosaccharides from asialofetuin

Asialofetuin (M_r : 45,500 kDa) contains three tri-antennary complex-type *N*-glycan chains with Gal β 1-4GlcNAc terminal sequence and three *O*-linked Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr chains (Nilsson *et al.*, 1979). Therefore, 5 mg/ml of asialofetuin in the reaction mixture allow to reach a concentration of terminal galactose acceptor sites equal to \approx 330 μ M for Gal β 1-3GlcNAc-*R* and to \approx 990 μ M for Gal β 1-4GlcNAc-*R* terminal sequences. After 24 hours of incubation at 37 °C, 36.2 % of the terminal galactose residues of asialofetuin were substituted with [³H]-Gal. In order to discriminate between [³H]-Gal added onto respectively *N*- or *O*-glycans of asialofetuin, a reductive β -elimination was performed and released *O*-oligosaccharides were separated from *N*-glycopeptides by fractionation on Bio-Gel P4 column previously calibrated (Figure 4). Gel permeation resolved two main peaks, appearing respectively at the elution volume of *N*-glycopeptides (arrow at position 1) and of *O*-linked glycans of asialofetuin (arrow in position 2).

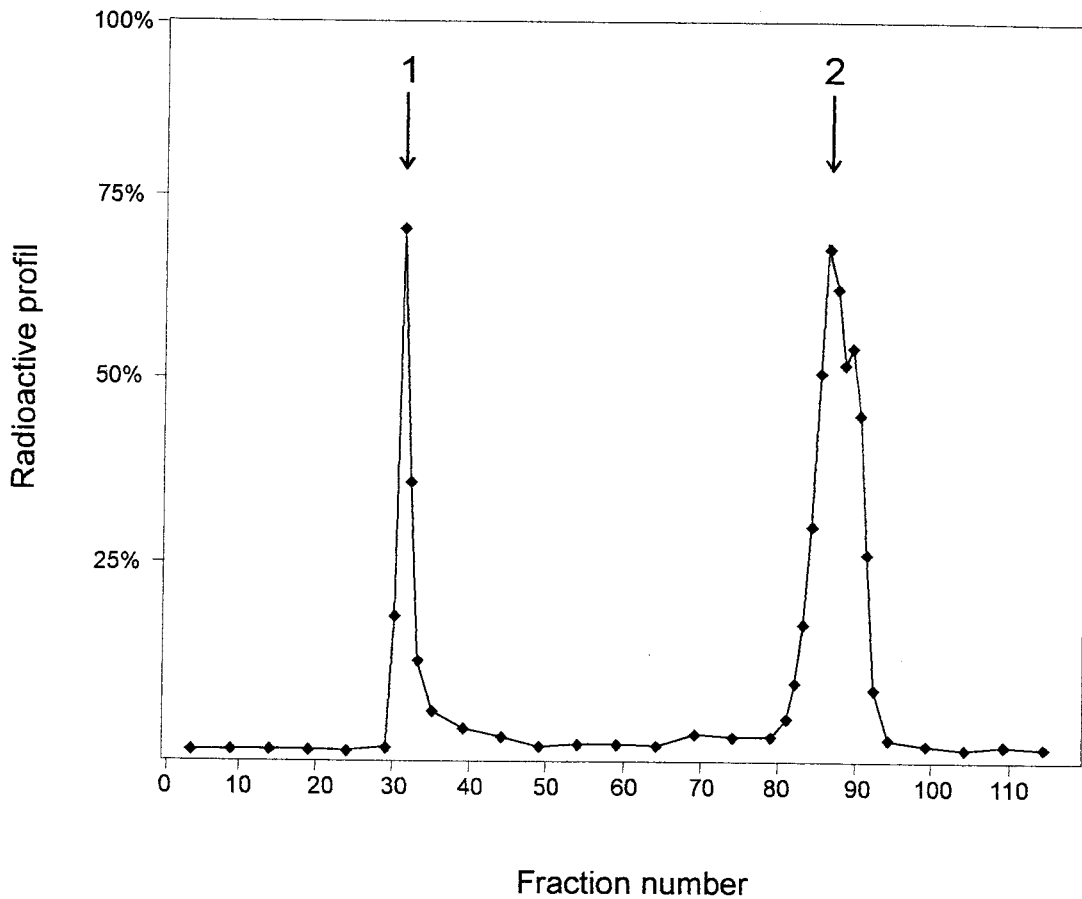


Figure 4: Fractionation by gel permeation of the $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-Gal}$ -labelled O-oligosaccharides and N-glycopeptides from asialofetuin using *Mb* microsomal fraction as enzyme source.

Reduced O-oligosaccharides and N-glycoproteins were separated on a Bio-Gel P4 column (80 x 1.2 cm) in pyridine acetate pH 5.6 and eluted with the same buffer at a flow rate of 10 ml / h. fractions of 1 ml were collected and assayed for radioactivity. The column was previously calibrate with (1) N-glycopeptides; (2) O-linked chains of fetuin.

At first, this experiment confirmed that $\alpha 1,4$ -Gal-T activity expressed in microsomal fraction of *Mb* transferred galactose on glycoproteins containing terminal galactose residues. Secondly, we observed that the transfer of [3 H]-Gal is mainly onto *O*-oligosaccharides (74.7 % of the transferred radioactivity) rather than on the *N*-glycopeptides (25.3 % of the transferred radioactivity). Finally, this result indicated that 40,9 % of the Gal β 1-3GalNAc terminal sequences were substituted by a Gal residue, while only 4.6 % of the Gal β 1-4GlcNAc terminal sequences were occupied. These data allowed to confirm that, as expected, the *Mb* $\alpha 1,4$ -Gal-T formed preferentially Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr onto asialofetuin.

*Immunoreactivity of Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn*

The human blood group P system consists of five phenotypes P_1 , P_2 , P^k_1 , P^k_2 and p , depending on the presence or absence of the three antigens P (GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer), P^k (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) and P_1 (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer). The red cells P_1 express P and P_1 antigens; the erythrocytes P^k_1 express P^k and P_1 antigens; while red cells P^k_2 express only P^k antigens. We have determined the minimum concentration of Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn able to inhibit human blood group P erythrocytes agglutination (Table VI). Negative controls were previously performed using Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn, and as expected, no inhibition was observed. In contrast, Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn was able to inhibit the agglutinations mediated by anti- P^k mAbs (0.4 mM minimum concentration) and by BSI-B₄ (0.08 mM minimum concentration). However, the agglutination of P_1 erythrocytes mediated by both anti-P or anti- P_1 mAbs was not inhibited by the Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn.

Table VI. Inhibition of human blood group P erythrocyte agglutinations by Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -O-bn. Minimum concentration (mM) of Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -O-bn for inhibition of papain-treated erythrocytes agglutination caused by antibodies or BSI-B₄.

mAb or Lectin	human blood group P erythrocyte		
	P ₁	P ^k ₁	P ^k ₂
Anti-P ₁	nt ^a	> 6.5	nt
Anti-P ^k	nt	0.4	0.4
Anti-P	> 6.5	nt	nt
BSI-B ₄	0.08	0.08	nt

^a nt: not tested.

Discussion

In this paper, we demonstrated for the first time the occurrence of an UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransferase in a lepidopteran cell line. This observation is supported by several sets of evidence.

Western blot analysis of endogenous glycoproteins from *Sf-9*, *Mb* and *Tn* have shown the specific binding of BSI-B₄ onto high molecular weight glycoproteins, which differed from one cell line to another. That staining was particularly of a high intensity for a 100-110 kDa band in *Mb* cells and, according to the specificity of BSI-B₄ (Hayes *et al.*, 1974; Murphy *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1995), that fitted well with the presence of Gal α 1-3/4Gal terminal sequences in the glycoproteins of the different examined lepidopteran cell lines.

Based on that first observation, we have focused our experiments on the characterization of an α -galactosyltransferase activity in *Mb*. The specificity of the glycosyltransferase activity responsible for the biosynthesis of the *Mb* α -Gal terminal sequences was studied using several acceptor substrates containing a terminal galactose residue. That choice took into account the specificity of BSI-B₄, but also the fact that the different α -galactosyltransferase characterized so far transferred Gal residue in α -linkage onto a terminal galactose to form the terminal disaccharides Gal α 1-3Gal (Blanken and Van den Eijnden, 1985; Joziassse *et al.*, 1989; Joziassse *et al.*, 1992) or Gal α 1-4Gal (Taniguchi *et al.*, 1985; Bailly *et al.*, 1992; Stults *et al.*, 1995). Oligosaccharide substrates revealed that the *Mb* α -galactosyltransferase preferred the Gal β 1-3-*R* unit as acceptor (Table I) and among such glycans, the relative substrate activity V_{Max} / K_M shows that the Gal β 1-3GalNAc is the most suitable acceptor (Table II).

To determine the nature of the linkage of the transferred Gal residue, we have performed a large scale preparation using Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn acceptor. NMR and MS data allowed us to establish that the *Mb* α -galactosyltransferase synthesized one unique product : Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn. The fact that only one product was formed, without any trace of β -linkage or of other substitution than onto the C-4 position of the galactose acceptor, leads us to conclude that *Mb* microsomes contained essentially a galactosyltransferase activity able to catalyze the addition of galactose residues α 1,4-linked to Gal β 1-3GalNAc terminal sequences.

Gal β 1-3GalNAc disaccharide is usually present on *O*-glycosylation sites of numerous asialo-glycoproteins, but also on glycolipids, including G_{A1}, G_{M1a} or G_{D1b}. We determined that *Mb* α 1,4-Gal-T acted preferentially on glycoproteins rather than on glycolipids. Such result is in agreement with the first observation of the binding of BSI-B₄ onto endogenous *Mb* glycoproteins. Furthermore, we have confirmed that the Gal residue was added preferentially

onto Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr rather than onto Gal β 1-4GlcNAc sequence present in terminal position of *N*-glycans of asialofetuin.

Using a microsomal fraction as enzyme source, the presence of other galactosyltransferases using UDP-Gal as a donor substrate could not be excluded. Nowadays, only one core 1 β 1,3-galactosyltransferase (UDP-Gal : GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr β 1,3-galactosyltransferase) has been described in lepidopteran cells (Thomsen *et al.*, 1990), and the β 1,4-galactosyltransferase (UDP-Gal : GlcNAc β 1,4-galactosyltransferase) which added a Gal residue onto *N*-glycan structures has never been detected in insect cells. Moreover, both enzymes did not use terminal Gal oligosaccharide as acceptors. Consequently, interference in α -galactosyltransferase assays was rather improbable, even if *Mb* microsomes may contain numerous different glycosyltransferases.

Previous studies have led to conclude that glycolipids were the sole carriers of Gal α 1-4Gal based on the galabiosylceramide (Gal α 1-4Gal β 1-Cer), and the P blood group determinants on human red blood cell membranes (Yang *et al.*, 1994). Human blood group P system contains three antigens, two of them : P₁ (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer) and P^k (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer) sharing the same terminal disaccharide unit Gal α 1-4Gal (Bailly *et al.*, 1992). Surprisingly, our results show that *Mb* α 1,4-Gal-T catalyzes the synthesis of a Gal α 1-4Gal epitope β 1,3-linked onto a GalNAc residue and acts preferentially on glycoproteins rather than on glycolipids.

The high activity of the *Mb* α 1,4-Gal-T allowed us to synthesize sufficient amount of Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn to study the possible applications of that trisaccharidic epitope. Gal α 1-4Gal-specific mAbs are important tools for the characterization of tissues or isolated glycoconjugates (Lanne *et al.*, 1996). We examined therefore, the capacity of Gal α 1-

4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn to inhibit the agglutination of P₁, P^k₁, or P^k₂ red blood cells mediated by anti-P^k, anti-P₁, anti-P mAbs, or by BSI-B₄ (Tableau VI). Inhibition of hemagglutination assays shown that Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -*O*-bn was recognized a good competitor for anti-P^k mAb, as well as for BSI-B₄. As expected, Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn could not inhibit neither the anti-P-mediated agglutination of P₁ erythrocytes nor the anti-P₁-mediated agglutination of P^k₁ red blood cells. Such results were in agreement with previous results indicating that the anti-P^k mAb recognized mainly the terminal disaccharide Gal α 1-4Gal, whereas anti-P₁ was specific for the terminal P₁ trisaccharide Gal α 1-4Gal1-4GlcNAc (Watkins and Morgan, 1976 ; Cowles and Blumberg, 1986 ; Bailly *et al.*, 1987). In addition, the observation that Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α -*O*-bn strongly inhibited the BSI-B₄-mediated hemagglutination fitted well with the binding of that lectin on *Mb* glycoproteins observed by Western blotting (Figure 1) and is in favor of the presence of such glycans in that insect cell line.

Interestingly, chemical and immunochemical studies have indicated that galabiosylceramide, P₁ and P^k antigens are expressed in many pig and human tissues (Holgersson *et al.*, 1990; Lundblad *et al.*, 1980; Bock *et al.*, 1985; Lanne *et al.*, 1996). In addition, several studies have shown that Gal α 1-4Gal-containing glycolipids act as receptors for the binding of pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* to human uroepithelial cells (Bock *et al.*, 1985) and *Streptococcus suis* which is responsible for meningitis in pig and man (Haataja, 1993 and 1994). Gal α 1-4Gal-mediated binding is also display by bacterial toxins, such as *Escherichia coli* verotoxin (Lingwood, 1987; Yiu and Lingwood, 1992), Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type1 (Lindberg, 1987) and staphylococcal enterotoxin-B (Chatterjee, 1995). Accordingly, Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc, free or linked onto a *O*-glycoprotein could be a good candidate to inhibit pathogens attachment (bacteria or toxins) to host cells.

Finally, this work shows the presence of a new α 1,4-Gal-T activity in *Mb* cells responsible of the presence of the disaccharide epitope Gal α 1,4Gal onto endogenous *Mb* O-glycoproteins. Our results have to be linked to studies showing new glycosyltransferase activities in lepidopteran cells, as the β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase enzymatic activity in *Tn*, *Sf-9* and *Mb* catalyzing the transfer of GalNAc residues to oligosaccharides carrying a terminal β -linked GlcNAc residue (Van Die *et al.*, 1996), or the α 1,3-fucosyltransferase activity in *Mb* which is able to transfer fucose into α 1,3-linkage to the asparagine-bound GlcNAc residue of N-glycans (Staudacher *et al.*, 1992b). The knowledge of these new insect glycosyltransferase activities will allow to select among the lepidopteran cell clones now available, those deficient in such activities for recombinant glycoproteins production. In addition, these new insect glycosylation potentials could represent an abundant source of enzymes for the biosynthesis of epitopes which could be of a great interest in therapy.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pr. Gérard Devauchelle, « Station de Pathologie Comparée INRA / Unité de Recherche Associée du CNRS n° 1184 », for his constant interest and support and to Pr. Jean Montreuil and Dr. Jean-Claude Michalski, members of the « Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111 » for their helpful discussions. This work has been supported by the M.E.N.E.S.R.: « Actions Concertées Coordonnées des Sciences du Vivant, ACC-SV14 n°9514111, Réseau G-Trec ».

References

- Altmann, F. and März, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II. *Glycoconjugate J.*, **12**, 150-155.
- Bailly, P., Chevaleyre, J., Sondag, D., François-Gérard, C., Piquet, Y., Vezon, G. and Cartron, J.P. (1987) characterization of a murine monoclonal antibody specific for the human P₁ blood group antigen. *Mol. Immunol.*, **24**, 171-176.
- Bailly, P., Piller, F., Gillard, B., Veyrières, A., Marcus, D. and Cartron, J.P. (1992) Biosynthesis of the blood group P^k and P₁ antigens by human kidney microsomes. *Carbohydr. Res.*, **228**, 277-287.
- Blanken, W.M. and Van den Eijnden, D.H. (1985) Biosynthesis of terminal Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal : N-acetyllactosaminide α 1,3-galactosyltransferase from calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12927-12934
- Bock, K., Breimer, M.E., Brignole, A., Hansson, G.C., Karlsson, K.-A., Larson, G., Leffler, H., Samuelsson, B.E., Strömberg, N., Edén, C.S. and Thurin, J. (1985) Specificity of binding of the strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal α 1-4Gal-containing glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8545-8551.
- Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S. and Duhig, T. (1989) A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *Int. J. Cancer*, **44**, 691-696.
- Butters, T.D. and Hughes, R.C. (1981) Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 655-671.
- Castronovo, V., Foidart, J.M., Li Vecchi, Foidart, J.B., Bracke, M., Mareel, M. and Mahieu, P. (1987) Human anti-galactosyl IgG reduces the lung colonization by murin MO4 cells. *Invasion Metastasis* **7**, 325-345.
- Chatterjee, S., Klullar, M. and Shi, W.Y. (1995) Digalactosylceramide is the receptor for staphylococcal enterotoxin-B in human kidney proximal tubular cells. *Glycobiology*, **5**, 327-333.
- Chen, W., Shen, Q. and Bahl, O.P. (1991) Carbohydrate variant of the recombinant β -subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4081-4087.
- Ciucanu, I. and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrate. *Carbohydr. Res.*, **131**, 209-217.
- Cowles, J.W. and Blumberg, N. (1986) Neutralization of P blood group antibodies by synthetic solid-phase antigens. *Transfusion*, **27**, 272-275.

- Davidson, D.J., Fraser, M.J. and Castellino, F.J. (1990) Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochemistry*, **29**, 5584-5590.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991a) Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503) *Biochemistry*, **30**, 6689-6696.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b) Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf-21AE) cells. *Biochemistry*, **30**, 6167-6174
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) Gas-Liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.*, **116**, 489-502.
- Galili, U., Buehler, J., Shohet, S.B. and Macher, B.A. (1987) The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J. Exp. Med.*, **165**, 693-704.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shohet, S.B. (1985) Human natural anti- α -galactosyl IgG. II. The specific recognition of $\alpha(1-3)$ -linked galactose residues. *J. Exp. Med.*, **162**, 573-582.
- Galili, U., Rachmilewitz, E. A., Peleg, A. and Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.*, **160**, 1519-1531.
- Galili, U., Shohet, S.B., Kobrin, E., Stults, C.L.M. and Macher, B.A. (1988) Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cell. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17755-17762.
- Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jäger, V. and Conradt, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus -infected Sf-21 cells. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189-197.
- Haataja, S., Tikkanen, K., Luikkonen, J. François-Gérard, C. and Finne, J. (1993) Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4311-4317.
- Haataja, S., Tikkanen, K., Nilsson, U., Magnusson, G., Karlsson, K.A. and Finne, J. (1994) Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal α 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. *J. Biol. Chem.* **269**, 27466-27472.
- Hard, K., Van Doorn, J.M., Thomas-Oates, J.E., Kamerling, J.P. and Van Der Horst, D.J. (1993) Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein III from the insect *Locusta migratoria*. Carbohydrate-linked 2-Aminoethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein. *Biochemistry*, **32**, 766-775.

- Hayes, C.E. and Goldstein, I.J. (1974) An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1904-1914.
- Holgersson, J., Jovall, P.A., Samuelsson, B.E. and Breimer, M.E. (1990) Structural characterization of non-acid glycosphingolipids in kidneys of single blood group O and A pigs. *J. Biochem.*, **108**, 766-777.
- Hsieh, P. and Robbins, P.W. (1984) Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing: Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2375-2382.
- Jarvis, D.L. and Summers, M.D. (1989) Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 214-223.
- Jenkins, N., Parekh, R.B. and James D.C. (1996) Getting the glycosylation right: implication for the biotechnology industry. *Nature Biotechnol.*, 975-981
- Jerome, K.R., Barnd, D.L., Bendt, K.M., Boyer, C.M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I.F.C.Jr and Finn, O.J. (1991) Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.*, **51**, 2908-2916.
- Joziase, D.H., Shaper, J.H., Van den Eijnden, D.H., Van Tunen, A.J. and Shaper, N.L. (1989) Bovine α 1,3-galactosyltransferase : isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14290-14297.
- Joziase, D.H., Shaper, N.L., Kim, D., Van den Eijnden, D.H., and Shaper, J.H. (1992) α 1,3-galactosyltransferase. A single gene locus specifies four isoforms of the enzyme by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5534-5541.
- Kang, C.Y. (1988) Baculovirus vectors for expression of foreign genes. *Adv. Virus Res.*, **35**, 177-192.
- Klenk, H.-D. (1990) Influence of glycosylation on antigenicity of viral proteins, In: van Regenmortel, M.H.V and Neurath, A.R. (eds), *Immunochemistry of Viruses, II. The Basis of Serodiagnosis and Vaccines*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 25-37.
- Kotera, Y., Fontenot, J., Pecher, G., Metzgar, R. S. and Finn, O. J. (1994) Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.*, **54**, 2856-2860.
- Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1993) Primary structure of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1193-1204.

- Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and März, L. (1994) Structures of the *N*-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (*Sf*-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 148-157.
- Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D. and Doerfler, W. (1986) Expression of the influenza virus hemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.*, **5**, 1359-1365.
- Kuroda, K., Gröner, A., Frese, K., Drenckhahn, D., Hauser, C., Rott, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae. *J. Virol.*, **63**, 1677-1685
- Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector *Virology*, **174**, 418-429.
- Kuroda, K., Veit, M. and Klenk, H.-D. (1991) Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology*, **180**, 159-165.
- Laemmly, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-681.
- Lanne, B., Jondal, M. and Karlsson, K.A. (1996) Gal α 1-4Gal-binding antibodies: specificity and use for the mapping of glycolipids of burkitt lymphoma and other human tumors. *Glycobiology*, **6**, 423-431.
- Lindberg, A.A., Brown, J.E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J. E. and Karlsson, K. A. (1987) Identification of a carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type1. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1779-1785.
- Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S. and Karmali, M. (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8834-8839.
- Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautiere, P., Chabihi, H., Chirat, F., Harduin-Lepers, A., Cerutti, M., Verbert, A. and Delannoy, P. (1997) Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in *Mamestra brassicae* cells. *Glycobiology*, **7**, in press.
- Lubineau, A., Basset-Carpentier, K. and Augé, C. (1997) Porcine liver α (2-3)-sialyltransferase : substrate specificity studies and application of immobilized enzyme to the synthesis of various sialylated oligosaccharides sequences. *Carbohydr. Res.*, in press.
- Luckow, V.A and Summers. M.D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, **6**, 47-55.
- Lundblad, A., Svensson, S., Löw, B., Messeter, L. and Cedergren, B. (1980) Release of oligosaccharides from human erythrocyte membranes of different blood group-P phenotypes by trifluoroacetolysis. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 323-330.

- Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H.-W. and Fountoulakis M. (1994) Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of the soluble human interferon receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Protein Science*, **3**, 30-38.
- Miller, L.K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177-199.
- Munk, K., Pritzer, E., Kretzschmar, E., Gutte, B., Garten, W. and Klenk, H.-D. (1992) Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus hemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*, **2**, 233-240.
- Murphy, L.A. and Goldstein, I.J. (1977) Five α -D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4739-4742.
- Nilsson, B., Norden, N.E. and Svensson, S (1979) Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4545-4553.
- Noteborn, M.H.M., Kant, A., Eijdens, E.W.H.M., De Boer, GF, Van Der Eb, A.J. and Koch, G. (1992) Immunogenic properties of avian leukosis virus env-proteins synthesized with a baculovirus expression vector. In Vlak, J.M., Schlaeger, E.-J. and Bernard, A.R. (eds), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes* Editiones Roche, Basel, Switzerland, 92-97.
- Ogonah, W.O., Freedman, R.B., Jenkins, N., Patel, K. and Rooney, B.C. (1996) Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins. *Bio/Technology*, **14**, 197-202.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. (1994) Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. Oxford University Press, New York.
- Paulson, J.C., Prieels, J.P., Glasgow, L. R. and Hill, R.L. (1978) Sialyl- and fucosyltransferases in the biosynthesis of asparaginyl-linked oligosaccharides in glycoproteins. Mutually exclusive glycosylation by β -galactoside α 2 goes to 6 sialyltransferase and N-acetylglucosaminide α 1 goes to 3 fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5617-5624.
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**, 346-356.
- Ponimaskin, E., Veit, M. and Schmidt, M.F.G. (1994) Expression of the Sendai virus fusion protein in insect cells and characterization of its posttranslational modifications. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1163-1167.
- Rother, R. P. and Squinto, P.S. (1996) The α -galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell*, **86**, 185-188.
- Spiro, R.G. and Bhojroo, V.D. (1974) Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5703-5717.

- Staudacher, E., Altmann, F., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. (1992a) α 1-6(α 1-3)-Difucosylation of the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A₂. *Glycoconjugate J.*, **9**, 82-85
- Staudacher, E., Kubelka, V. and März, L. (1992b) Distinct *N*-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 987-993
- Stults, C.L.M., Larsen, R.D. and Macher, B.A. (1995) α 1,4galactosyltransferase activity and Gb₃Cer expression in human leukemia / lymphoma cell lines. *Glycoconjugate J.*, **12**, 680-689.
- Takeuchi, M. and Kobata, A. (1991) Structures and fonction roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*, **349**, 196-197.
- Taniguchi, N., Yanagisawa, K., Makita, A. and Naiki, M. (1985) Purification and properties of rat liver globotriaosylceramide synthase, UDP-galactose : lactosylceramide α 1,4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4908-4913.
- Tetaert, D., Soudan, B., Lo-Guidice, J. M., Richet, C., Degand, P., Boussard, G., Mariller, C. and Spik, G. (1994) Combination of high-performance anion-exchange chromatography and electrospray mass spectrometry for analysis of the in vitro *O*-glycosylated mucin motif peptide. *J. Chromatogr.*, **658**, 31-38.
- Thomsen, D.R., Post, L.E. and Elhammer, A.P. (1990) Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line Sf9. *J. Cell. Biochem.*, **43**, 67-79.
- Thotakura, N.R. and Blithe, D.L. (1995) Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotrophins, thyrotrophin and free α subunit. *Glycobiology*, **5**, 3-10.
- Towbin, H., Rosenfelder, G., Wieslander, J., Avila, J.L., Rojas, M., Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H. and Timpl, R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.*, **166**, 419-432.
- Vaessen, R.T., Kreike, J. and Groot, G.S.P. (1981) Protein transfer to nitrocellulose filters. *FEBS Lett.* **124**, 193-196.
- Vandamme, V., Cazlaris, H., Le Marer, N., Laudet, V., Lagrou, C., Verbert, A. and Delannoy, P. (1992) Comparison of sialyl- and α 1,3-galactosyltransferase activity in NIH3T3 transformed with the *ras* oncogene : increased β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *Biochimie*, **74**, 89-100.
- Van Die, I., Van Tetering, A., Bakker, H., Van den Eijnden, D.H. and Joziase, D.H (1996) Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a β 1-4-*N*-acetylgalactosyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, **6**, 157-164
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. and McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, **13**, 213-217.

- Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.
- Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N. and Castellino, F.J (1993) The presence of UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-Sf-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17902-17907.
- Voss, T., Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.
- Watkins, W.N. and Morgan, W.T.J. (1976) Immunochemical observations on the human blood group P system. *J. Immunogenet.*, **3**, 15-27.
- Wathen, M.W., Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1991) Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf-9. *Biochemistry*, **30**, 2863-2868.
- Williams, P.J., Wormald, M.R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Parker, G.F. and Roberts, D.R. (1991) Characterization of oligosaccharides from *Drosophila melanogaster* glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1075**, 146-153.
- Wright, A. and Morrison, S.L. (1994) Effect of altered C_H2-associate carbohydrate structure on the functional properties and *in vivo* fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J. Exp. Med.*, **180**, 1087-1096.
- Wu, M., Song, S.C., Wu J.H. and Kabat E.A. (1995) Affinity of *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* lectin-I, isolectin B4 for Gal α 1-4Gal ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 814-820.
- Yang, Z., Bergström, J. and Karlsson, K.A. (1994) Glycoproteins with Gal α Gal are absent from human erythrocyte membranes, indicating that glycolipids are the sole carriers of blood group P activities. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14620-14624.
- Yeh, J., Seals, J.R., Murphy, C.I., van Halbeek, H. and Cummings, R.D. (1993) Site-specific *N*-glycosylation and oligosaccharide structures of recombinant HIV-1 gp120 derived from a baculovirus expression system. *Biochemistry*, **32**, 11087-11099.
- Yiu, S.C.K. and Lingwood, C.A. (1992) Polyisobutylmethacrylate modifies glycolipid binding specificity of verotoxin 1 in thin-layer chromatogram overlay procedures. *Anal. Biochem.*, **202**, 188-192.

CONCLUSION

L'importance grandissante de la production de glycoprotéines recombinantes dans les cellules d'insectes en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression a incité la société *PROTEINE PERFORMANCE* et l'*INRA* de S^t Christol-les-Alès (tous deux spécialistes de l'expression de protéines dans le système baculovirus / insecte) à s'intéresser au potentiel de glycosylation de leurs lignées de lépidoptères. C'est au *Laboratoire de Chimie Biologique* de Villeneuve d'Ascq que ces investigations ont été principalement menées, en se focalisant successivement sur le potentiel de *N*-glycosylation puis de *O*-glycosylation de ces lignées de lépidoptères.

Tout d'abord, une sélection des clones présentant les meilleurs potentiels de glycosylation a été réalisée sur la base des interactions d'un ensemble de lectines végétales de spécificité parfaitement définie (Tableau II, page 54), avec les glycannes substituant les glycoprotéines de vingt clones cellulaires de *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera littura* et de *Trichoplusia ni*, non infectés par le baculovirus et cultivés dans un milieu sans sérum de veau foetal (milieu BM-25).

Il nous est alors apparu que des glycoprotéines d'insectes, particulièrement celles de *Mamestra brassicae*, étaient reconnues par des lectines spécifiques des résidus de galactose en position terminale non réductrice RCA, PNA, et BSI-B₄. Par conséquent, nous avons orienté nos travaux vers l'identification des glycannes *N*-acétyllactosaminiques porteurs de tels résidus de galactose, ces structures n'ayant à ce jour pas été clairement mises en évidence dans les lignées de lépidoptères.

Premièrement, nous avons voulu savoir si les structures galactosylées présentes sur les glycoprotéines endogènes de *Mamestra brassicae* pouvaient se retrouver sur les *N*-glycannes d'une protéine recombinante exprimée dans cette lignée, et ceci dans les conditions de production habituellement utilisées par la société *PROTEINE PERFORMANCE*.

Ainsi, l'étude des *N*-glycannes présents sur la lactoferrine bovine recombinante exprimée chez *Mamestra brassicae* par le système baculovirus montre une faible hétérogénéité des glycannes portés par un même site de glycosylation (de 5 à 8 structures par site) comparée à celle observée sur la lactoferrine bovine naturelle (Coddeville *et al.*, 1992), ou plus généralement, par rapport à la microhétérogénéité des *N*-oligosaccharides retrouvés sur les glycoprotéines recombinantes exprimées dans les cellules de mammifères (Rush *et al.*, 1995). De plus, la glycosylation est fonction du site de glycosylation, les sites porteurs de structures oligomannosidiques dans la glycoprotéine naturelle sont en majorité porteurs de structures oligomannosidiques *lourdes* (Man₉₋₅GlcNAc₂) dans la glycoprotéine recombinante. En revanche, le site Asn₄₇₆ naturellement substitué par des glycannes *N*-acétyllactosaminiques est porteur de glycannes *légers* réduits au noyau commun à tous les *N*-glycannes, avec ou sans fucose lié en α 1-6 sur le résidu de *N*-acétylglucosamine impliqué dans la liaison *N*-glycosidique (Man₃₋₂[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂). Le point de départ de ces travaux ayant été la recherche de glycannes *N*-acétyllactosaminiques possédant des résidus de α/β galactose en position terminale non réductrice chez les lépidoptères, il faut remarquer que les uniques marqueurs de la présence, même éphémère, de structures hybrides ou *N*-acétyllactosaminiques synthétisées par la lignée *Mamestra brassicae* ont été : (i) les glycannes de type oligomannosidique *légers* (Man₂₋₃[Fuc₀₋₁]GlcNAc₂), pouvant provenir du catabolisme de structures *N*-acétyllactosaminiques ou hybrides et, (ii) les traces de galactose observées lors de l'établissement de la composition en monosaccharides aussi bien sur la lactoferrine bovine recombinante totale que sur certains glycopeptides.

Deuxièmement, l'analyse en Western blot des glycoprotéines endogènes des clones de *Spodoptera frugiperda* 9, *Mamestra brassicae* et *Trichoplusia ni*, nous ont montré que ces lignées exprimaient des *O*-glycosylprotéines substituées par un unique résidu de *N*-acétylgalactosamine lié *O*-glycosidiquement à la protéine : GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, ou des

glycannes du type Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr. Ces observations sont en accord avec Thomsen *et al.* (1990) qui concluent à la synthèse par *Spodoptera frugiperda* 9 de deux structures *O*-glycanniques GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr et Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr. Nous avons donc étudié plus en détail le potentiel de *O*-glycosylation des trois lignées cellulaires *Spodoptera frugiperda* 9, *Mamestra brassicae* et *Trichoplusia ni*, cultivées dans deux milieux de culture sans sérum (BM-25 et EX-CELL 401™) et non infectées par le baculovirus (pour prévenir toute interférence pouvant être causée par l'infection virale ou la production d'une glycoprotéine recombinante).

Au cours de cette étude, nous avons relié les structures *O*-glycanniques identifiées sur les glycoprotéines de lépidoptères par l'interaction avec les lectines végétales SBA (α/β -GalNAc), PNA (Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser) et BSI-B₄ (Gal α 1-3/4Gal), et les activités des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de ces *O*-glycannes courts : GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr et Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr.

Nous avons ainsi mis en évidence que le potentiel de glycosylation était fonction de la lignée de lépidoptère choisie. Premièrement, les trois lignées expriment sur leurs glycoprotéines endogènes des antigènes Tn (GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) en accord avec des activités polypeptide GalNAc-transférases élevées. De plus, il apparaît que la spécificité de substrat de chaque activité polypeptide GalNAc-transférase varie d'une lignée à l'autre. L'activité core-1 β 1,3-galactosyltransférase quant à elle, est très faible chez toutes les lignées de lépidoptères en comparaison avec celle généralement mesurée dans des tissus de mammifères. Ceci pourrait expliquer la faible synthèse d'antigène T (Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) substituant les glycoprotéines cellulaires de lépidoptères. C'est effectivement le cas pour la lignée *Spodoptera frugiperda*, où peu de disaccharides Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr ont été mis en évidence par la lectine PNA. De façon surprenante pour *Trichoplusia ni*, lignée d'insectes pour laquelle est

observée une forte fixation de PNA, l'activité core-1 β 1,3-galactosyltransférase est presque nulle. C'est sûrement la preuve que chez *Trichoplusia ni* la glycosyltransférase qui catalyse la substitution du monosaccharide *N*-acétylgalactosamine par un résidu de galactose β 1,3 lié, est différente de celles retrouvées dans les deux autres lignées d'insectes sélectionnées. Enfin, la lignée *Mamestra brassicae* se singularise de nouveau puisqu'elle possède l'activité core-1 β 1,3-galactosyltransférase la plus élevée (4 fois plus forte que celle mesurée chez *Spodoptera frugiperda*) alors qu'aucune fixation de PNA n'est observée sur ses glycoprotéines. En fait chez *Mamestra brassicae*, les disaccharides Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr semblent substitués par un résidu d' α -galactose pour former un nouvel *O*-glycane Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr spécifiquement reconnu par la BSI-B₄. Nous avons ainsi pu identifier et caractériser une nouvelle activité α 1,4-galactosyltransférase chez *Mamestra brassicae* ayant comme substrat spécifique le disaccharide Gal β 1-3GalNAc. Il est intéressant de constater que la BSI-B₄ interagit aussi avec des glycoprotéines de *Spodoptera frugiperda* et *Trichoplusia ni*, mais aucune activité UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase n'ayant été mesurée dans ces deux lignées, on peut en conclure qu'elles renferment des glycanes non encore identifiés avec en position terminale le disaccharide Gal α 1-3/4Gal. De plus, après avoir adapté chaque lignée de lépidoptères dans deux milieux de culture sans sérum de veau foetal, BM-25 et EX-CELL 401™, nous avons observé que le milieu de culture influence fortement le potentiel de glycosylation des trois clones d'insectes. En effet, chaque lignée adaptée en EX-CELL 401™ présente qualitativement un profil lectinique semblable à celui observé avec le milieu BM-25, alors que quantitativement, le fait de cultiver les lignées de lépidoptères dans le milieu EX-CELL 401™ entraîne une fixation plus importante des lectines, corrélée à une augmentation des différentes activités glycosyltransférales. Par conséquent, on peut envisager de contrôler quantitativement le potentiel de glycosylation des lignées de

lépidoptères en faisant varier la composition du milieu de culture. Finalement, signalons que quelque soit le milieu de culture utilisé, jamais nous n'avons observé de liaisons entre des glycoprotéines d'insectes et les lectines spécifiques des résidus d'acide sialique SNA ou MAA et de plus, toutes nos tentatives pour mesurer des activités sialyltransférasiques chez les lignées de lépidoptères se sont soldées par des échecs, quelque soit l'accepteur utilisé : asialo-fétuine, mucine sous-maxillaire bovine désialylée, Gal β 1-3GalNAc α 1-O-bn ou Gal β 1-4GlcNAc. Par conséquent, nous pensons que les lignées de lépidoptères aujourd'hui utilisées pour la production de glycoprotéines recombinantes sont incapables de sialyler les glycannes qu'elles synthétisent et donc, de reproduire à l'identique la glycosylation des glycoprotéines naturelles présentes dans les tissus de mammifères.

Ces travaux soulignent les lacunes du potentiel de glycosylation des lignées cellulaires d'insectes en comparaison avec celui des lignées de mammifères. Néanmoins, ce potentiel pourrait être amélioré comme nous l'avons montré lors de l'étude de la microhétérogénéité des sites de glycosylation de la lactoferrine bovine recombinante produite dans *Mamestra brassicae*. En effet, cette lignée a la capacité de discerner entre les sites de *N*-glycosylation, en particulier ceux qui portent naturellement des glycannes de type oligomannosidique, de ceux substitués naturellement par des oligosaccharides de type *N*-acétyllactosaminique. Ces derniers sont, sur la glycoprotéine recombinante, porteurs de courtes structures tronquées probablement issues du catabolisme de glycannes *N*-acétyllactosaminiques. Pour améliorer les capacités de glycosylation des systèmes d'expression en cellules de lépidoptères, il nous paraît souhaitable de faire évoluer les systèmes de production afin d'éviter tout *engorgement* de la voie de sécrétion des glycoprotéines et ainsi prévenir tout dépassement des capacités catalytiques des glycosyltransférases. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées comme : la mise au point de systèmes d'expression stables ou bien encore, l'utilisation de baculovirus vecteur où le gène étranger serait exprimé sous le contrôle de promoteur précoce et de force

modérée. Une autre voie qui commence à être explorée est d'ajouter dans les lignées de lépidoptères les glycosyltransférases manquantes ou déficientes puisque de nombreuses glycosyltransférases terminales sont aujourd'hui clonées. Déjà, des équipes ont exprimé avec succès la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (Wagner *et al.*, 1996) ou la β 1,4-galactosyltransférase (Jarvis & Finn, 1996) dans la lignée *Spodoptera frugiperda* 9 et leurs résultats montrent que la glycosylation en a été améliorée. Les travaux menés entre nos laboratoires pour exprimer la β 1,4-galactosyltransférase dans la lignée *Spodoptera frugiperda* 9, en utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression, confirme bien que l'enzyme est actif mais nous n'avons observé aucune modification de la glycosylation des glycoprotéines endogènes.

L'évolution la plus significative au cours de nos expériences a été plus sûrement l'intérêt croissant que nous avons porté aux structures oligosaccharidiques particulières synthétisées par les lignées de lépidoptères, et tout spécialement à leur potentiel de *O*-glycosylation. Si l'on met de côté nos schémas de la glycosylation en cellule de mammifères, et cette *utopie* qui consiste à vouloir reproduire à l'identique chez les insectes la glycosylation des mammifères, on s'aperçoit que des structures d'insectes originales existent et qu'elles pourraient avoir des applications possibles. J'en veux pour preuve la mise en évidence de glycannes contenant des résidus de α -galactose en position terminale et ceci chez tous les clones de lépidoptères étudiés. Nous avons choisi de détailler la structure renfermant de l' α -galactose chez *Mamestra brassicae* puisque cette lignée possède les glycoprotéines endogènes qui interagissent le plus fortement avec la BSI-B₄. Nous avons ainsi mis en évidence chez *Mamestra brassicae* une nouvelle structure *O*-glycannique Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, associée à une nouvelle activité glycosyltransférasique UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase. Cette activité α -galactosyltransférasique nous a permis de synthétiser plusieurs milligrammes de l'aryl-glycoside Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-bn et ainsi d'initier des

expériences visant à trouver des applications au trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc. Cet aryl-glycoside s'est avéré capable d'inhiber l'agglutination des hématies P^k₁ et P^k₂ par les anticorps anti-P^k, spécifiques du glycosylcéramide Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer. Comme l'agglutination des cellules P₁ par l'anticorps anti-P₁, spécifique du glycosylcéramide Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer, n'est pas inhibée par notre nouvel aryl-glycoside, nous en concluons qu'il existe une inhibition spécifique de l'antigène P^k, mais pas de réaction croisée avec l'antigène P₁. Ces résultats confirment des observations antérieures qui indiquent que les anticorps anti-P^k ont une spécificité relativement large vis-à-vis du disaccharide Gal α 1-4Gal, alors que la spécificité des anticorps anti-P₁ est plus stricte et met en évidence le rôle critique de la *N*-acétylglucosamine dans le trisaccharide terminal du glycosylcéramide P₁ (Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer). De nombreuses études ont montré que le disaccharide Gal α 1-4Gal présent sur les glycolipides était responsable, à la surface des tissus, de la fixation de bactéries pathogènes et de toxines bactériennes. Nous avons émis l'hypothèse que le trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc libres ou liés à une glycoprotéine pourrait inhiber l'adhésion sur les tissus hôtes des bactéries pathogènes, *Escherichia coli* uréopathogènes et *Streptococcus suis*, aussi bien que des toxines, Vero toxine d'*Escherichia coli* ou Shiga toxine de *Shigella dysenteriae*. Ces expériences sont actuellement en cours, et leurs résultats conditionneront la prise d'un brevet au sujet de l'activité α -galactosyltransférase capable de synthétiser chez *Mamestra brassicae* la structure Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc.

Néanmoins, il nous reste encore de nombreux travaux à effectuer sur des structures α -galactosylées chez les insectes, à savoir : (i) le clonage des différentes α -galactosyltransférases et principalement l'UDP-Gal : Gal β 1-3GalNAc α 1,4-galactosyltransférase de *Mamestra brassicae* si les applications potentielles du trisaccharide Gal α 1-4Gal β 1-3GalNAc se

confirment, mais aussi (ii) l'étude des activités α -galactosyltransférasiques des autres lignées de lépidoptères, apparemment différentes de celle identifiée dans *Mamestra brassicae*.

REFERENCES

Les références bibliographiques ci-dessous correspondent au chapitre d'introduction et à la conclusion générale.

Abeijon, C. and Hirschberg, C.B. (1992) Topography of glycosylation reaction in the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochem. Sci.*, **17**, 32-36.

Altmann, F. and März, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II. *Glycoconjugate J.*, **12**, 150-155.

Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E. and Glössl, J. (1993a) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. *N*-Acetylglucosaminyltransferase I and II activities in cultured lepidopteran cells. *Glycobiology*, **3**, 619-625.

Altmann, F., Tretter, V., Kubelka, V., Staudacher, E., Marz, L. and Becker, W.M. (1993b) Fucose in α 1-3 linkage to *N*-glycan core forms an allergenic epitope that occurs in plant and in insect glycoprotéins. *Glycoconjugate J.*, **10**, 301.

Arms, K. and Camp, P.S.T. (1989) Biologie-Tome 1. éditions étude vivantes, Montréal, 494-499.

Blissard, G.V. and Rohrmann, G. F. (1990) Baculovirus diversity and molecular biology. *Ann. Rev. Entomol.*, **35**, 127-155.

Borrebaeck, C.A.K., Malmberg, A.C. and Ohlin, M. (1993) Does endogenous glycosylation prevent the use of mouse monoclonal antibodies as cancer therapeutics? *Immunol. Today*, **14**, 477-479.

Brockhausen, I (1995) Biosynthesis of *O*-glycans of the *N*-acetylgalactosamine- α -Ser/Thr linkage type. In: *Glycoproteins* (edited by Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G. and Schachter, H. / Elsevier Science B.V) *New Comprehensive Biochemistry*, **29a**, 201-259

Busby, S., Kumar, A., Joseph, M., Halfpap, L., Insley, M., Berkner, K., Kurachi, K. and Woodbury, R. (1985) Expression of active human factor IX in transfected cells. *Nature*, **316**, 271-273.

Butters, T.D. and Hughes, R.C. (1981) Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 655-671.

Castronovo, V., Foidart, J.M., Li Vecchi, Foidart, J.B., Bracke, M., Mareel, M. and Mahieu, P. (1987) Human anti-galactosyl IgG reduces the lung colonization by murin MO4 cells. *Invasion Metastasis* **7**, 325-345.

Chaabihi, H. (1992) Thèse : étude de la régulation des gènes P10 et polyhédrine du baculovirus d'*Autographa californica* et développement de nouveaux vecteurs pour l'expression de gènes étrangers. Université d'Aix-Marseille II, Faculté des Sciences de Luminy, France.

Chai, W., Hounsell, E.F., Cashmore, G.C., Rosankiewicz, J.R., Bauer, C.J., Feeney, J. Feizi, T. and Lawson, A.M. (1992) Neutral oligosaccharide of bovine submaxillary mucin. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 257-268.

- Chen, W., Shen, Q. and Bahl, O.P. (1991) Carbohydrate variant of the recombinant β -subunit of human choriogonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4081-4087.
- Chiou, C.J. and Wu, M.C. (1990) Expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in insect cells by a baculovirus vector. *FEBS Lett.*, **259**, 249-253.
- Clausen, H. and Bennett, E.P. (1996) A family of UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type *O*-linked glycosylation. *Glycobiology*, **6**, 635-646.
- Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszkeski, J.M., Vliegenthart, J.F.G., Van Halbeek, H., Peter-Katalinic, J., Egge, H. and Spik, G. (1992) Heterogeneity of bovine lactoferrin glycans. Characterization of α -D-Gal- and α -NeuAc-(2-6)- β -D-GalpNAc-(1-4)- β -D-GlcNAc-substituted *N*-linked glycans. *Carbohydrate Research*, **236**, 145-164.
- Creeg, M.J., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, **11**, 905-910.
- Crowley, J.F., Goldstein, I.J., Arnarp, J. and Lönngrén, J. (1984) Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* Seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **231**, 524-533.
- Cumming, D.A. (1991) Mini Review / Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology*, **1**, 115-130.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991a) Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503) *Biochemistry*, **30**, 6689-6696.
- Davidson, D.J. and Castellino, F.J. (1991b) Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf-21AE) cells. *Biochemistry*, **30**, 6167-6174
- Davidson, D.J., Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J. (1991) α -Mannosidase-catalyzed trimming of high-mannosidase glycans in noninfected and baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-SF-21AE). A possible contributing regulatory mechanism for assembly of complex-type oligosaccharides in infected cells. *Biochemistry*, **30**, 9811-9815.
- Davidson, D.J., Fraser, M.J. and Castellino, F.J. (1990) Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells. *Biochemistry*, **29**, 5584-5590.
- Debray, H. and Montreuil, J. (1989) Aleuria aurentia agglutinin. A new isolation procedure and further study of its specificity towards various glycopeptides and oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4688-4693.
- Devauchelle, G. and Cerutti, M. (1993) Les baculovirus d'insectes vecteurs d'expression de gènes étrangers. Dans *Les Cahiers IMABIO : Expression des protéines recombinantes* (éditeur : Centre National de la Recherche Scientifique) **9**, 19-30.

- Duong, L.T., Caulfield, M.P. and Rosenblatt, M. (1987) Synthetic signal peptide and analogs display different activities in mammalian and plant *in vitro* secretion systems. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6328-6333.
- Faye, L., Gomord, A.C., Fitchette-Laine and Chrispeels, M.J. (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α 1-3 fucose or β 1-2 xylose. *Anal. Biochem.*, **209**, 104-108.
- Fleer, R. (1992) Engineering yeast for high level expression. *Current Opinion in Biotechnology*, **3**, 486-496.
- Flesher, A.R., Marzowski, J., Wang, W.C., and Raff, H.V. (1995) Fluorophore labeled glycan analysis of immunoglobulin fusion proteins: correlation of oligosaccharide content with *in vivo* clearance profile. *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 399-407.
- Fraser, M.J. (1989) Expression of eukaryotic genes in insect cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 225-235.
- Galili, U., Buehler, J., Shohet, S.B. and Macher, B.A. (1987) The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J. Exp. Med.*, **165**, 693-704.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J. and Shohet, S.B. (1985) Human natural anti- α -galactosyl IgG. II. The specific recognition of α (1-3)-linked galactose residues. *J. Exp. Med.*, **162**, 573-582.
- Galili, U., Rachmilewitz, E. A., Peleg, A. and Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J. Exp. Med.*, **160**, 1519-1531.
- Galili, U., Shohet, S.B., Kobrin, E., Stults, C.L.M. and Macher, B.A. (1988) Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cell. *J. Biol. Chem.*; **263**, 17755-17762.
- Grabenhorst, E., Hoffmann, A., Nimtz, M., Zettlmeissi, G. and Conradt, H.S. (1995) Construction of stable BHK-21-cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(β -1-4)GlcNAc- α -2,6-sialyltransferase α -2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(β -1-4)GlcNAc(β -1-2)Man(α -1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant β -trace protein. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 718-725.
- Grabenhorst, E., Hofler, B., Nimtz, M, Jager, V and Conrad, H.S. (1993) Biosynthesis and secretion of human interleukin-2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf-21 cells. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 189-197.
- Grace T.D. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, **195**, 788-789.
- Granados, R.R. and Federeci, B.A. (1986a) The biology of baculoviruses. Vol. I Biological properties and molecular biology, CRC Press Inc., Boca Raton, F.L.
- Granados, R.R. and Federeci, B.A. (1986b) The biology of baculoviruses. Vol. II Practical applications for insect control, CRC Press Inc., Boca Raton, F.L.

- Granados, R.R. and Hashimoto, Y. (1989) in « Invertebrate cell system applications » (Mitsuhashi J., ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, Vol. 2, pp. 3-13.
- Groner, A. (1986) in « The biology of baculoviruses » (Granados, R.R. and Federici, B.A., eds) CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 177-202.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, **315**, 680-683.
- Hard, K., Van Doorn, J.M., Thomas-Oates, J.E., Kamerling, J.P. and Van Der Horst, D.J. (1993) Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein III from the insect *Locusta migratoria*. Carbohydrate-linked 2-Aminoethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein. *Biochemistry*, **32**, 766-775.
- Hayes, C. E. and Goldstein, I. J. (1974) An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1904-1914.
- Herman, L., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1990) Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 248-256.
- Herscovics, A.O. and Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.*, **7**, 540-550.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, **342**, 76-78.
- Hogeland, K.E. and Deinzer, M.L. (1994) Mass spectrometric studies on the N-linked oligosaccharides of baculovirus expressed mouse interleukine-3. *Biological Mass Spectrometry*, **23**, 218-224.
- Hokke, C.H., Bergwerff, A.A., Vandedem, G.W.K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1995) Structural-analysis of the sialylated N-linked and O-linked carbohydrate chains of recombinant-human-erythropoietin expressed in chinese hamster ovary cells-sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetylglucosamine units. *Eur. J. Biochem.*, **228**, 981-1008.
- Houdebine, L.-M. (1993) La préparation de protéines recombinantes à partir du lait d'animaux transgéniques. Dans *Les Cahiers IMABIO : Expression des protéines recombinantes* (éditeur : Centre National de la Recherche Scientifique) **9**, 43-46.
- Hounsell, E.F. and Feizi, T (1982) Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med. Biol.*, **60**, 227-236.
- Hsieh, P. and Robbins, P.W. (1984) Regulation of asparagine-linked oligosaccharide processing: Oligosaccharide processing in *Aedes albopictus* mosquito cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2375-2382.

- Inohara, N., Shimomura, S., Fukui, T. and Futai, M. (1989) Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots: molecular cloning and complete primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3564-3568.
- Jarvis, D.L. and Finn, E.E. (1996) Modifying the insect cell *N*-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nature biotechnology*, **14**, 1288-1292.
- Jarvis, D.L., Weinkauf, C. and Guarino, L.A. (1996) Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expression And Purification*, **8**, 191-203.
- Jarvis, D.L. and Summers, M.D. (1989) Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Mol. Cell. Biol*, **9**, 214-223.
- Jenkins, N., Parekh, R.B. and James, D.C. (1996) Getting the glycosylation right: implication for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology*, **14**, 975-981.
- Jones, R.L and Robinson, D.G. (1989) Protein secretion in plants. *Transley Rev.*, **17**, 567-588.
- Joziasse, D.H., Shaper, J.H., Jabs, E.W. and Shaper, N. (1991) Characterization of an α 1-3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6991-6998.
- Kabat, E.A. (1982) Contribution of quantitative immunochemistry to knowledge of blood group A, B, H, Le, I and i antigens. *Am. J. Clin. Path.*, **78**, 281-292.
- Kalsner, I., Schneider, F.J., Geyer, R., Ahorn, H. and Maurerfogy, I. (1992) Comparison of the carbohydrate moieties of recombinant soluble Fc-epsilon receptor (sFc- ϵ -RII/scd23) expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and chinese hamster ovary cells-different *O*-glycosylation sites are used by yeast and mammalian cells. *Glycoconjugate J.*, **9**, 209-216.
- Khan, M.W., Musgrave, S.C. and Jenkins, N. (1995) *N*-linked glycosylation of tissue-plasminogen activator in Namalwa cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, S99.
- Kniskern, P.J., Hagopian, A., Burke, P., Schulz, L.D., Montgomery, D.L., Hurni, W.M. et al (1994) Characterization and evaluation of a recombinant hepatitis-B vaccine expressed in yeast defective for *N*-linked hyperglycosylation. *Vaccine*, **12**, 1021-1025.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 631-664.
- Kretzschmar, E., Geyer, R. and Klenk, H.-D. (1994) Baculovirus infection does not alter *N*-glycosylation in *Spodoptera frugiperda* cells. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 323-327.
- Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and März, L. (1994) Structures of the *N*-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (*Sf*-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch. Biochem. Biophys*, **308**, 148-157.

- Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, F.G. (1993) Primary structure of the *N*-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1193-1204.
- Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1990) The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector *Virology*, **174**, 418-429.
- Kuroda, K., Gröner, A., Frese, K., Drenckhahn, D., Hauser, C., Rott, R., Doerfler, W. and Klenk, H.-D. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae. *J. Virol.*, **63**, 1677- 1685.
- Kuroda, K., Hauser, C., Rott, R., Klenk, H.-D. and Doerfler, W. (1986) Expression of the influenza virus hemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.*, **5**, 1359-1365.
- Kuroda, K., Veit, M. and Klenk, H.-D. (1991) Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology*, **180**, 159-165.
- Larsen, R.D., Rivera-Marrero, C.A., Ernst, L.K., Cummings, R.D. and Lowe, J.B. (1990) Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:β-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc α(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7055-7061.
- Lee, E.U., Roth, J. and Paulson, J.C. (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on *N*-linked oligosaccharides of chinese hamster ovary cells by expression of β-galactoside α2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13848-13855.
- Lehle, L. Eiden, A., Lehnert, K., Haselbeck, A. and Kopetzki, E. (1995) Glycoprotein-biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* - ngd29, an *N*-glycosylation mutant allelic to och1 having a defect in the initiation of outer chain formation. *FEBS Lett.*, **370**, 41-45.
- Lehle, L., Tanner, W. and Brockhausen, I (1995) Biosynthesis of *O*-glycans of the *N*-acetylgalactosamine-α-Ser/Thr linkage type. In: *Glycoproteins* (edited by Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. and Schachter, H. / Elsevier Science B.V) *New Comprehensive Biochemistry*, **29a**, 475-509.
- Letourneur, O., Sechi, S., Willettebrown, J., Robertson, M.W. and Kinet, J.P. (1995) Glycosylation of human truncated Fc-epsilon-RI α-chain is necessary for efficient folding in the endoplasmic-reticulum. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8249-8256.
- Lifely, M.R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M.J. and Phillips, J. (1995) Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology*, **5**, 813-822.
- Lotan, R., Siegelman, H.W., Lis, H. and Sharon, N. (1974) Subunit structure of soybean agglutinin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1219-1224.
- Lotan, R., Skutelsky, E., Danon, D. and Sharon, N. (1975) The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from Peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.*, **250**, 8518-8523.

- Luckow, V.A. and Summers, M. D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio-Technology*, **6**, 47-55.
- Luckow, V.A. (1990) in « recombinant DNA technology and applications » (Prokop, A., Bajpai, R.K. and Ho, C.S., eds) McGraw-Hill Inc., pp. 97-152.
- Lunn, C.A., Takahara, M. and Inouye, M. (1986) Use of secretion cloning vectors for guiding the localization of proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **125**, 138-149.
- Ma, J.K.C. and Hein, M.B. (1995) Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.*, **13**, 522-527.
- Manneberg, M., Friedlein, A., Kurth, H., Lahm, H.-W. and Fountoulakis M. (1994) Structural analysis and localization of the carbohydrate moieties of the soluble human interferon receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *Protein Science*, **3**, 30-38.
- Marth, J.D. (1996) Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases. *Glycobiology*, **6**, 701-705.
- Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. and Sasaki, R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 1163-1172.
- McQuade, T.J., Pitts, T.W. and Tarpley, W.G. (1989) A rapid solution immunoassay to quantify binding of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein to soluble CD4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 172-176.
- Miller, D.W., Safer, P. and Miller, L.K. (1986) in « Genetic engineering » (Setlow, J.K. and Hollaender, A., eds) Plenum publ. Corp., New York, pp. 277-298.
- Miller, L. K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177-199.
- Mitsuhashi, J. (1989) in « invertebrate cell system applications » (Mitsuhashi J., ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, FL, Vol. 1, pp. 3-20.
- Monica, T.J., Williams, S.B., Goochee, C.F. and Maiorella, B.L. (1995) Characterization of the glycosylation of a human-IgM produced by a human-mouse hybridoma. *Glycobiology*, **5**, 175-185.
- Murphy, L. A. and Goldstein, I. J. (1977) Five α -D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4739-4742.
- Noguchi, A., Mukuria, C.J., Suzuki, E. and Naiki, M. (1995) Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin in chinese hamster ovary cells. *J. Biochem.*, **117**, 59-62.
- Noteborn, M.H.M., Kant, A., Eijdens, E.W.H.M., De Boer, GF, Van Der Eb, A.J. and Koch, G. (1992) Immunogenic properties of avian leukosis virus env-proteins synthesized with a baculovirus expression vector. In Vlak, J.M., Schlaeger, E.-J. and Bernard, A.R. (eds), *Workshop on baculovirus and recombinant protein production processes* Editiones Roche, Basel, Switzerland, 92-97.

- Ogonah, W.O., Freedman, R.B., Jenkins, N., Patel, K. and Rooney, B.C. (1996) Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex *N*-linked glycosylation on recombinant proteins. *Bio/Technology*, **14**, 197-202.
- Olsnes, S., Saltvedt, E. and Pihl, A. (1974) Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.*, **249**, 803-810.
- Orfanoudakis, G. and Egly, J.M. (juin 1993) Expression de protéines hétérologues-première partie : les systèmes procaryotes. *Biofutur*, n°124, cahier n°59.
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B. and Whitelam, G. (1992) Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Biotechnology (NY)*, **10**, 790-794.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. and Evans, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, **300**, 611-615.
- Palmiter, R.D., Norstedt, G., Gelinas, R.E., Hammer, R.E. and Brinster, R.L. (1983) metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, **222**, 809-814.
- Piwnicz-Worms, H. (1990) in « current protocols in molecular biology » (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.F., Moore, D.D., Scidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., eds) Wiley-Interscience, New-York, pp. 16.8.1-16.11.7.
- Ponimaskin, E., Veit, M. and Schmidt, M.F.G. (1994) Expression of the Sendai virus fusion protein in insect cells and characterization of its posttranslational modifications. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1163-1167.
- Powel, P.H., Enger-Valk, B.E. and Brammar, W.J. (1985) Cloning vectors, a laboratory manual. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, New York, Oxford.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Clare, J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**, 423-488.
- Rother, R. P. and Squinto, P.S. (1996) The α -galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell*, **86**, 185-188.
- Rush, R. S., Derby, P. L., Smith, D. M., Merry, C., Rogers, G., Rohde, M. F. and Katta, V. (1995) Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal. Chem.* **34**, 1442-1452.
- Schachter, H. and Brockhausen, I. (1992) The biosynthesis of serine (threonine)-*N*-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugate: composition, structure, and function* (Allen H.J. and Kisailus, E.C., eds) Marcel Dekker Inc, New York, 263-332.
- Schachter, H. (1991) The 'yellow brick road' to branched complex *N*-glycans. *Glycobiology*, **1**, 453-461.
- Schein, C. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology*, **7**, 1141-1149.

- Selden, R.F., Howie, K.B., Rowe, M.E., Goodman, H.M. and Moore, D.D. (1986) Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3173-3179.
- Shaper, N.L., Lin, S.P., Joziase, D.H., Kim, D.Y. and Yang-Feng, T.L. (1992) Assignment of two human alpha-1,3-galactosyltransferase gene sequences (GGTA1 and GGTA1P) to chromosomes 9q33-q34 and 12q14-q15 [published erratum appears in *Genomics* 1992]. *Genomics*, **12**, 613-615.
- Shibuya, N., Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. and Peumans W.J. (1987) The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark Lectin Recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1596-1601.
- Shibuya, N., Goldstein, I.J., Van Damme, E.J.M. and Peumans, W.J. (1988) Binding properties of a mannose specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) Bulb. *J. Biol. Chem.*, **263**, 728-724.
- Smith, D.F., Larsen, R.D., Mattox, S.A., Lowe, J.B. and Cummings, R.D. (1990) Transfer and expression of a murine UDP-Gal- α 1,3-galactosyltransferase gene in transfected chinese hamster ovary cells. Competition reactions between the α 1,3-galactosyltransferase and the endogenous α 2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6225-6234.
- Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., Montreuil, J., Pierce, A., Rochard, E. (1993) Binding properties of different lactotransferrins to human lactoferrin receptor (edited by Renner, R. and Sawatzki, G.) *New Perspectives in infant nutrition* (Symposium Antwerp 1992), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Staudacher, E., Altmann, F., März, L., Hard, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1992a) α 1-6(α 1-3)-Difucosylation of the asparagine-bound *N*-acetylglucosamine in honeybee venom phospholipase A₂. *Glycoconjugate J.*, **9**, 82-85.
- Staudacher, E., Kubelka, V. and März, L. (1992b) Distinct *N*-glycan fucosylation potentials of three lepidopteran cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **207**, 987-993.
- Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris, H.R., Payne, G., et al (1995) Meningococcal pilin-a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol. Microbiol.*, **17**, 1201-1214.
- Summer, M.D. and Smith, G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors insect cell culture procedures. *Bull. Texas Agric. Exp. Stat.*, n° 1555.
- Sumper, M. and Wieland, F.T. (1995) Bacterial glycoproteins. In: *Glycoproteins* (edited by Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G and. Schachter, H. / Elsevier Science B.V) *New Comprehensive Biochemistry*, **29a**, 455-473.
- Takeuchi, M., Takasaki, H., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe and Kobata, A. (1988) Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietin purified from urine and the culture medium of recombinant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3657-3663.

- Thomsen, D. R., Post, L. E. and Elhammer, A. P. (1990) Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides synthesized by the insect cell line *Sf-9*. *J. Cell. Biochem.*, **43**, 67-79.
- Towbin, H., Rosenfelder, G., Wieslander, J., Avila, J. L., Rojas, M., Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H. and Timpl, R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.*, **166**, 419-432.
- Tsuda, E., Goto, M., Murakami, A., Akai, K., Ueda, M. and Kawanishi, G. (1988) Comparative structural study of *N*-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochem.*, **27**, 5646-5654.
- Tsuji, J., Noma, S., Suzuki, J., Okumura, K. and Shimizu, N. (1990) Specificity of human natural antibody to recombinant tissue-type plasminogen activator (t-PA) expressed in mouse C127 cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 765-768.
- Van Die, I., Van Tetering, A., Bakker, H., Van den Eijnden, D.H. and Joziase, D.H (1996) Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a β 1-4-*N*-acetylgalactosyl-transferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology*, **6**, 157-164.
- van Halbeek, H., Strang, A.-M., Lhermitte, M., Rahmoune, H., Lamblin, G. and Roussel, P. (1994) Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Le^{a+b}) patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure. *Glycobiology*, **4**, 203-219.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130.
- Veit, M., Scott, C., Borchers, K., Ludwig, H. and Schmidt, M.F.G. (1993) Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpes virus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells. *Arch Virol.*, **133**, 335-347.
- Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold, B., Reinhold, V.N. and Castellino, F.J (1993) The presence of UDP-*N*-acetylglucosamine: α -3-D-mannoside β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-*Sf*-21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17902-17907.
- von Schaewen, A., Sturn, A., O'Neill, J. and Chrispeels, M.J. (1993) Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-acetylglucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex *N*-linked glycans. *Plant Physiol.*, **102**, 1109-1118.
- Voss, T., Ergülen, E., Ahorn, H., Kubelka, V., Sugiyama, K., Maurer-Fogy, I. and Glössl, J. (1993) Expression of human interferon ω 1 in *Sf-9* cells. No evidence for complex-type *N*-linked glycosylation or sialylation. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 913-919.

Wagner, R., Liedtke, S., Kretzschmar, E., Geyer, H., Geyer, R. and Klenk, H.-D. (1996) Elongation of the *N*-glycans of fowl plague virus hemagglutinin expressed in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells by coexpression of human β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology*, **6**, 165-175.

Watkins, W.M. (1980) in : Advances in human genetics, eds Harris, H. and Hirschhorn, K., Plenum Publishing Co, New York, 10, 1-136 and 379-385.

Wang, W.C. and Cummings, R.D. (1988) The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α -2,3 to penultimate galactose residues. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4576-4585.

Wathen, M.W., Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1991) Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf-9. *Biochemistry*, **30**, 2863-2868.

Weising, K., Schell, J. and Kahl (1988) Foreign genes in plants transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 421-477.

Williams, P.J., Wormald, M.R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Parker, G.F. and Roberts, D.R. (1991) Characterization of oligosaccharides from *Drosophila melanogaster* glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1075**, 146-153.

Wilson, M., Carstens, E., Couch, J., Doerfler, W. and Volkman, H. (1991) in « classification and nomenclature of viruses » (Francki, R.I., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. and Brown, F, eds) Springer Verlag, Wien and New York, 117-123.

Winckner, W, Driessen, A.J.M. and Hartl, F.-U. (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 101-124.

Wu, M., Song, S. C., Wu J. H. and Kabat E. A. (1995) Affinity of *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* lectin-I, isolectin B4 for Gal α 1-4Gal ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 814-820.

Yeh, J., Seals, J.R., Murphy, C.I., van Halbeek, H. and Cummings, R.D. (1993) Site-specific *N*-glycosylation and oligosaccharide structures of recombinant HIV-1 gp120 derived from a baculovirus expression system. *Biochemistry*, **32**, 11087-11099.

Yu-Ip, C.C., Miller, W.J., Silberklang, M., Mark, G.E., Ellis, R.W., Huang, L.H. and al. (1994) Structural characterization of the *N*-glycans of a humanized anti-CD8 murine immunoglobulin G. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 387-399.